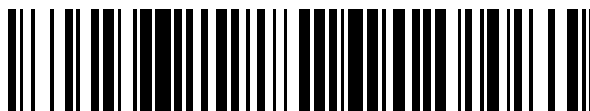


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 481**

51 Int. Cl.:

C12N 15/52 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/867 (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C07K 14/55 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2009 PCT/US2009/058512**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2010 WO10036986**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2009 E 09816967 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2018 EP 2344648**

54 Título: **Vectores recombinantes**

30 Prioridad:

08.12.2008 US 120618 P
26.09.2008 US 100666 P
13.06.2009 US 186823 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

GRUBER, HARRY, E.;
JOLLY, DOUGLAS;
PEREZ, OMAR y
LOGG, CHRISTOPHER, R.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 709 481 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

Vectores recombinantes

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere a vectores retrovíricos competentes en replicación para tratar la proliferación celular. La divulgación se refiere adicionalmente al uso de dichos vectores retrovíricos competentes en replicación para el suministro y expresión de ácidos nucleicos heterólogos.

10 Antecedentes

Los métodos eficaces de suministro de genes y ácidos nucleicos heterólogos a las células y sujetos ha sido un objetivo de los investigadores para el desarrollo científico y para posibles tratamientos de enfermedades y trastornos.

Tai et al (Molecular Therapy Vol. 12, No. 5, pp. 842-850) desvela que una terapia genética suicida multicíclica de inyección única mediante vectores retrovíricos competentes en replicación consigue un beneficio de la supervivencia a largo plazo en el glioma experimental.

Wang et al (Human Gene Therapy 14:117-127) desvela la transferencia genética restringida al tumor y altamente eficaz para gliomas malignos mediante vectores retrovíricos competentes en replicación.

Stewart et al (RNA (2003), 9:493-501) describe un silenciamiento genético estable suministrado por lentivirus mediante ARNi en células primarias.

Chen et al (Virology 377 (2008) 265-272) desvela la inhibición de la replicación del virus de la enfermedad de Marek mediante un ARN de interferencia basado en un vector retrovílico.

30 Sumario

En un aspecto, la presente invención proporciona un retrovirus recombinante competente en replicación que comprende:

una proteína retrovítica GAG;
una proteína retrovítica POL;
una envoltura retrovítica; y

un polinucleótido retrovítico que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 10 o 22. Más generalmente, la divulgación proporciona un retrovirus recombinante competente en replicación (RCR) que comprende: una proteína retrovítica GAG; una proteína retrovítica POL; una envoltura retrovítica; un polinucleótido retrovítico que comprende secuencias de repeticiones terminales largas (LTR) en el extremo 3' de la secuencia de polinucleótido retrovítica, una secuencia promotora en el extremo 5' del polinucleótido retrovítico, siendo dicho promotor adecuado para la expresión en una célula de mamífero, un dominio de ácido nucleico gag, un dominio de ácido nucleico pol, y un dominio de ácido nucleico env; un casete que comprende un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES) unido operativamente a un polinucleótido heterólogo, en el que el casete se posiciona a 5' de las LTR 3' y a 3' del dominio de ácido nucleico env que codifica la envoltura retrovítica; y secuencias actuantes cis necesarias para la transcripción inversa, empaquetamiento e integración en una célula diana, en la que el RCR mantiene una competencia de replicación más alta después de 6 pasajes en comparación con un vector pACE (SEQ ID NO: 21). En un aspecto de la divulgación, la secuencia de polinucleótido retrovítica se deriva del virus de la leucemia murina (MLV), virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV), virus de la leucemia felina (FeLV) o virus de la leucemia del Gibón (GALV). En otro aspecto de la divulgación, el MLV es un MLV anfotrópico. En otro aspecto más de la divulgación, el retrovirus es un oncorretrovirus o un retrovirus gamma. En otro aspecto más de la divulgación, la célula diana es una célula que tiene un trastorno proliferativo celular. El trastorno proliferativo celular se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en, pero no se limita a, cáncer de pulmón, cáncer de colon-recto, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer uterino, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, melanoma, cáncer de estómago y cáncer ovárico, artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunitarias. En un aspecto de la divulgación, el promotor comprende un promotor de CMV que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 582. En un aspecto adicional de la divulgación, el promotor comprende un polinucleótido del dominio CMV-R-U5. En un aspecto de la divulgación, el dominio CMV-R-U5 comprende el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano unido a una región R-U5 de MLV. En otro aspecto de la divulgación, el polinucleótido del dominio CMV-R-U5 comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 1202 o las secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 19, 20 o 22, en la que el polinucleótido promociona la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente al mismo. En otro aspecto de

la divulgación, el gag y pol del polinucleótido se derivan de un oncorretrovirus o un retrovirus gamma. El dominio de ácido nucleico gag puede comprender una secuencia desde aproximadamente el nucleótido 1203 a aproximadamente el nucleótido 2819 de la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de identidad con la misma. El dominio pol puede comprender una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 2820 a aproximadamente el nucleótido 6358 de la SEQ ID NO: 19, 20 o 22 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, 99 %, o 99,9 % de identidad con la misma. En un aspecto de la divulgación en dominio env codifica una proteína env anfotrópica. El dominio env puede comprender una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 a aproximadamente el nucleótido 8323 de SEQ ID NO: 19, 20 o 22 o una secuencia que tenga al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % de identidad con la misma. El dominio IRES del vector puede ser cualquier IRES, sin embargo, en un aspecto de la divulgación el IRES se deriva de un virus de la encefalomiocarditis. En un aspecto adicional de la divulgación, el IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327 a aproximadamente el nucleótido 8876 de la SEQ ID NO: 19 o 22 o una secuencia que tenga al menos un 95 %, 98 % o 99 % de identidad con la misma.

El vector puede comprender cualquier número de polinucleótidos heterólogos. Por ejemplo, el polinucleótido heterólogo puede comprender una citocina, un ARNip, un miARN o moléculas de ARNi, una secuencia de direccionamiento, un dominio de unión, un gen citotóxico, un anticuerpo de cadena sencilla o cualquier combinación de los mismos. Cuando el polinucleótido heterólogo es para un ARN no traducido tal como un ARNip, miARN o ARNi entonces no es necesario un IRES, pero se puede incluir para otro gen de ARN traducido, y se puede utilizar cualquier clase de retrovirus. En un aspecto más de la divulgación, el polinucleótido heterólogo comprende un polinucleótido que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 3, 5, 11, 13, 15 o 17. En un aspecto adicional de la divulgación, la secuencia heteróloga codifica un polipéptido que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4. El ácido nucleico heterólogo tiene el codón optimizado humano y codifica un polipéptido como se exponen en la SEQ ID NO: 4. En un aspecto adicional de la divulgación, el ácido nucleico heterólogo comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente en nucleótido número 8877 a aproximadamente 9353. En un aspecto de la divulgación, la LTR 3' se deriva de un oncorretrovirus o un retrovirus gamma. En un aspecto adicional de la divulgación, la LTR 30 comprende un dominio U3-R-U5. En un aspecto adicional más de la divulgación, la LTR 3' comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 desde aproximadamente el nucleótido 9405 a aproximadamente 9998 o una secuencia que es al menos un 95 %, 98 %, o 99,5 % idéntica a la misma.

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

La divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende de 5' a 3' : una fusión CMV-R-U5 del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano con una región R-U5 del MLV; un PBS, sitio de unión del cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme 50; una señal de empaquetamiento ψ ; una secuencia codificante de gag para el antígeno específico del grupo del MLV; una secuencia codificante de pol para la polimerasa poliproteica de MLV; un sitio de corte y empalme 3'; una secuencia codificante env 4070A para la proteína de envoltura de la cepa 4070A del MLV; un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES) del virus de la encefalomiocarditis; una secuencia codificante de la citosina desaminasa modificada; un tracto polipurina; y una repetición larga U3-R-U5 del MLV.

La divulgación proporciona un método de tratamiento de un sujeto con un trastorno proliferativo celular que comprende poner en contacto al sujeto con un polinucleótido que codifica un polipéptido de la divulgación que tiene una actividad citosina desaminasa en condiciones de manera que el polinucleótido se exprese, y poner en contacto al sujeto con 5-fluorocitosina.

La divulgación también proporciona un método de tratamiento de un trastorno proliferativo en un sujeto que comprende poner en contacto al sujeto con un retrovirus de la divulgación, en el que la secuencia de ácido nucleico heterólogo codifica una proteína terapéutica que inhibe la proliferación de una célula neoplásica. En un aspecto de la divulgación, el retrovirus comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 4, 12, 14, 16, o 18.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos acompañantes y la descripción posterior. Otras características, objetos y ventajas serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

Las **Figuras 1A-C** muestra un alineamiento de la citosina desaminasa de levadura de tipo silvestre (SEQ ID NO: 2) y una citosina desaminasa de la divulgación (SEQ ID NO: 4) y otras secuencias de la divulgación.

La **Figura 2** muestra un gráfico de datos de destrucción celular que demuestran que los vectores son más eficaces en comparación con el CD original de tipo silvestre. El gráfico también muestra que el nuevo armazón modificado (T5.0007) es más eficaz en la destrucción que el antiguo armazón (pACE-CD). También se muestra una tabla que cataloga las distintas construcciones de vector y sus nombres.

Las **Figuras 3A-D** muestran (a) un esquema del vector retrovítico recombinante de la divulgación; (b) un mapa de plásmido de un polinucleótido de la divulgación; (c y d) una secuencia de un polinucleótido de la divulgación (SEQ ID NO: 19).

La **Figura 4** muestra que se observan niveles más altos de proteína γ CD2 en comparación con la proteína γ CD de tipo silvestre en células U-87 infectadas.

La **Figura 5** muestra que un vector de la divulgación es genéticamente estable después de 12 ciclos de pasajes víricos como se evalúa utilizando una amplificación por PCR. La figura también demuestra que los vectores de la divulgación son más estables después de pasajes más largos en comparación con el vector pACE-CD (Kasahara et al.). En particular, el pAC3-CD es más estable que el pACE-CD, que demuestra que el armazón cambiado ha hecho más estable al vector. Además, el pACE- γ CD1 (T5.0001) y - γ CD2 (T5.0002) son mucho más estables que el pAC- γ CD demostrando que pequeños cambios silentes en la secuencia codificante del transgén pueden tener un efecto muy grande sobre la estabilidad, dando lugar a propiedades superiores. El T5.0003 es el menos estable y T5.0004 y T5.0005 parecen aproximadamente equivalentes al pACE-CD, que ha demostrado su eficacia en tumores de ratón (W. Wang et al. Hum Gene Ther 14:117 2003, Tai et al. Mol Ther 12:842 2005).

La **Figura 6** muestra (A) ensayos de destrucción celular; y (B) actividad específica citosina desaminasa de las células infectadas con diferentes vectores. (A) muestra que la citosina desaminasa y el vector de la divulgación destruye las células infectadas al menos tan bien o quizá mejor que el pACE-CD original cuando las células U87 infectadas se exponen a niveles crecientes de 5-FC. (B) muestra que la actividad específica de CD de la divulgación (T5.0007, T5.0001, y T5.0002) todas aumentan en comparación con pACE-CD (T5.0000), y están en el orden T5.0000<T5.0007<T5.0001<T5.0002.

La **Figura 7** muestra tumores U-87 tratados con el vector CD de la divulgación *in vivo* y explantados de ratones tratados con 4 ciclos de 5-FC siguen siendo sensibles al fármaco.

La **Figura 8** muestra la información de dosificación y efecto terapéutico en un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en un modelo de ratón de cáncer cerebral.

La **Figura 9** muestra la información de dosificación y efecto terapéutico en un análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en un modelo de ratón singénico.

Las **Figuras 10A-D** muestran esquemas de la generación de distintas realizaciones de la divulgación que comprenden el polipéptido con actividad CD, OPRT y UPRT.

Figura 11: A. es un mapa de vector esquemático del armazón pAC3 de un vector retrovítico MLV que contiene secuencias de polinucleótidos del precursor humano primario miR-128-1, el precursor humano primario miR-128-2 y el precursor humano miR-129 unido a un promotor H1 humano, denominado pAC3-miR128-1, pAC3-miR-128-2, y pAC3-H1-shRNAmiR128, respectivamente. B. es un mapa de un vector esquemático del armazón pAC3- γ CD2 del vector retrovítico MLV que contiene secuencias de polinucleótido de un precursor humano miR-128 unido a un promotor H1 humano, denominado pAC3- γ CD2-H1-shRNAmiR128.

Figura 12: A. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contienen miR-128 (pAC3-miR-128-1, pAC3-miR-128-2, y, pAC3-H1-shRNAmiR128) en células HT1080 de fibrosarcoma humano analizadas por qPCR. El gráfico se genera graficando los valores C(t) invertidos obtenidos de la qPCR frente a distintos momentos durante la replicación vírica. B. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían el miR-128 (pAC3-miR-128-1, pAC3-miR-128-2, y, pAC3-H1-shRNAmiR128) en células U87-MG de glioma humano analizadas por qPCR. El gráfico se generó graficando los valores de C(t) invertido obtenidos de la qPCR frente a distintos momentos durante la replicación vírica.

La Figura 13 muestra una cuantificación relativa de la expresión de miR-128 maduro de células transducidas con vectores que contenían miR-128.

La Figura 14 muestra una cuantificación relativa de la expresión del gen Bmi-1 de células transducidas con vectores que contenían miR-128.

La Figura 15 es un mapa de vector esquemático del vector retrovítico MLV pAC3-emd que contenía una única copia de la secuencia 142-3pT, denominado pAC3-emd-142-3pT y repeticiones en tándem de 4 de 142-3pT, denominado pAC3-emd-142-3pT4X.

La Figura 16 es un mapa de vector esquemático del vector retrovítico MLV pAC3- γ CD2 que contenía una única copia de la secuencia 142-3pT, denominado pAC3- γ CD2-142-3pT y repeticiones en tándem de 4 de 142-3pT, denominado pAC3- γ CD2-142-3pT4X.

Figura 17: A. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían 142-3pT (pAC3-emd-142-3pT pAC3-emd-142-3pT4X, pAC3- γ CD2-142-3pT y pAC3- γ CD2-142-3pT4X) y sus vectores parentales (pAC3-emd y pAC3- γ CD2) en células HT1080 de fibrosarcoma humano analizadas por qPCR. El gráfico se genera graficando los valores de C(t) invertidos obtenidos de la qPCR frente a distintos momentos durante la replicación vírica. B. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían GFP (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) en células HT1080 de fibrosarcoma humano analizadas por análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en distintos momentos durante la diseminación del vector.

Figura 18: A. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían 142-3pT (pAC3-emd-142-3pT pAC3-emd-142-3pT4X, pAC3- γ CD2-142-3pT y pAC3- γ CD2-142-3pT4X) y sus vectores parentales pAC3-emd y pAC3- γ CD2) en células HT1080 de fibrosarcoma humano analizadas por qPCR. El gráfico se genera graficando los valores de C(t) invertidos obtenidos de la qPCR frente a distintos momentos durante la replicación vírica. B. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían GFP (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) en células U87-MG de glioma humano

analizadas por análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en distintos momentos durante la diseminación del vector.

La Figura 19 muestra las cinéticas de replicación de un vector que contienen la GFP (pAC3-emd) en células hematopoyéticas de ratón y humanas por análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en distintos momentos durante la diseminación del vector.

Figura 20: A. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían GFP (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) en linfocitos T EL4 de ratón analizadas por análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en distintos momentos durante la diseminación del vector. B. muestra una comparación de las cinéticas de replicación de vectores que contenían GFP (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) en linfocitos T SUP-T1 humanos analizadas por análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en distintos momentos durante la diseminación del vector. C. muestra una comparación de la cinética de replicación de vectores que contenían GFP (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) en monocitos U937 humano analizadas por análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en distintos momentos durante la diseminación del vector.

Las Figuras 21A y 21B son fotos de las imágenes del MRI obtenidas a partir de un perro paciente durante la infusión CED intratumoral de Toca 511 y gadolinio. Nótese el gran tumor del lado izquierdo de la imagen que comprime ambos lados del cerebro y desplaza las estructuras de la línea media hacia la derecha. Las áreas blancas son la infusión de gadolinio-Toca 511. La Figura 21B muestra la colocación de los dos catéteres en el tumor.

La Figura 22 es un mapa de vector esquemático de los vectores retrovíricos MLV que codifican el IFN-gamma humano (hIFNg) y el IFN-gamma de ratón (mIFNg), respectivamente, en un armazón pAC3.

La Figura 23 muestra la expresión de mIFN-gamma a nivel de ARN de la línea celular HT1080 del fibrosarcoma humano infectadas con el vector pAC3-mIFNg. La expresión se detecta por RT-PCR.

La Figura 24 muestra la expresión de hIFN-gamma proteico secretado por la línea celular HT1080 de fibrosarcoma humano infectadas con un vector pAC3-hIFNg.

La Figura 25 muestra la expresión de mIFN-gamma proteico secretado por la línea celular HT1080 de fibrosarcoma humano infectadas con un vector pAC3-mIFNg.

La Figura 26 muestra los análisis de citometría de flujo de la expresión de GFP en células U87 después del suministro intratumoral o intravenoso del vector AC3-GFP en un modelo de ratón desnudo. Las células se miden por citometría de flujo por porcentaje de positivos a GFP. Las células aisladas de los cerebros intactos de ratones desnudos, las células U87 del cultivo celular, o células U87 transducidas con una multiplicidad de infección de 1 con AC3-GFP (V) *in vitro* sirven como controles. Del ejemplo de referencia 27 (inyección iv del vector GFP).

La Figura 27 muestra un histograma del análisis que se hizo también en los grupos 1, 3, y 5 del ejemplo de referencia 27 (inyección iv del vector con GFP) para medir la distribución de la señal de GFP en células U87 aisladas. La expresión de GFP es de las células tumorales U87 aisladas de los cerebros de ratón 14 días después del tratamiento con el vector.

La Figura 28 es un mapa de vector esquemático de los vectores retrovíricos MLV que codifican la IL-2 humana en el armazón pAC3.

Símbolos de referencia similares en los distintos dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada

Como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de “un”, “una”, y “el” incluye los referentes plurales a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una pluralidad de dichas células y la referencia a “el agente” incluye referencias a uno o más agentes conocidos por los expertos en la técnica, y así.

También, el uso de “o” significa “y/o” a menos de que se establezca otra cosa. De manera similar, “comprender”, “comprende”, “que comprende”, “incluir”, “incluye”, y “que incluye” son intercambiables y no pretenden ser limitantes.

Se entenderá además que cuando las descripciones de distintos aspectos de la divulgación utilizan la expresión “que comprende”, los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos específicos, un aspecto de la divulgación se puede describir alternativamente utilizando la expresión “que consiste esencialmente en” o “que consisten en”.

A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos o científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente el experto habitado en la técnica a la que pertenece la presente divulgación.

Los textos generales que describen las técnicas de biología molecular útiles en el presente documento, incluyendo el uso de vectores, promotores y muchos otros tópicos relevantes, incluyen Berger y Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology Volume 152, (Academic Press, Inc., San Diego, Calif.) (“Berger”); Sambrook et al., Molecular Cloning—A Laboratory Manual, 2d ed., Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (“Sambrook”) y Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (suplementado a lo

largo de 1999) ("Ausubel"). Ejemplos de protocolos suficientes para dirigir a los expertos a través de los métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de polimerasa (PCR), la reacción en cadena de ligasa (LCR), amplificación de Q β -replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasas (por ejemplo, NAS-BA), por ejemplo, para la producción de los ácidos nucleicos homólogos de la divulgación se encuentran en Berger, Sambrook, y Ausubel, así como en Mullis et al. (1987) Pat. de EE. UU. N.º 4.683.202; Innis et al., eds. (1990). Protocolos de PCR: A Guide to Methods and Applications (Academic Press Inc. San Diego, Calif.) ("Innis"); Arnheim & Levinson (oct. 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991) 3: 81-94; Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem 35: 1826; Landegren et al. (1988) Science 241: 1077-1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8: 291-294; Wu y Wallace (1989) Gene 4:560; Barringer et al. (1990) Gene 89:117; y Sooknanan y Malek (1995) Biotechnology 13: 563-564. Se describen métodos mejorados para la clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro* en Wallace et al., Pat. de EE. UU. N.º 5.426.039. Se resumen los métodos mejorados para la amplificación de grandes ácidos nucleicos por PCR en Cheng et al. (1994) Nature 369: 684-685 y las referencias citadas en este, en el que se generaban amplicones de PCR de hasta 40 kb. Un experto en la técnica apreciará que se puede convertir esencialmente cualquier ARN en un ADN de cadena doble adecuado para la digestión por restricción, la expansión por PCR y la secuenciación utilizando una transcriptasa inversa y una polimerasa. Véase, por ejemplo, Ausubel, Sambrook y Berger, *supra*.

La divulgación proporciona métodos y composiciones útiles para el suministro de un gen o proteína a una célula o sujeto. Dichos métodos y composiciones se pueden utilizar para tratar distintas enfermedades y trastornos en un sujeto incluyendo el cáncer y otras enfermedades y trastornos proliferativos. La divulgación proporciona la replicación de vectores retrovíricos competentes para el suministro genético.

Los términos "vector", "construcción de vector" y "vector de expresión" significa el vehículo por el que la secuencia de ADN o ARN (por ejemplo, un gen ajeno) se puede introducir en una célula huésped, de manera que transforma el huésped y promueven la expresión (por ejemplo, la transcripción y traducción) de la secuencia introducida. Los vectores comprenden normalmente el ADN de un agente transmisible en el que se inserta el ADN ajeno que codifica una proteína por tecnología de enzimas de restricción. Un tipo común de vector es un "plásmido", que en general es una molécula autocontenida de ADN de cadena doble que puede aceptar fácilmente un ADN adicional (ajeno) y que se puede introducir fácilmente en una célula huésped adecuada. Se ha descrito un gran número de vectores, incluyendo plásmidos y vectores fúngicos, para la replicación y/o expresión en una variedad de huéspedes eucariotas o procariotas. Ejemplos no limitantes incluyen plásmidos pKK (Clontech), plásmidos pUC, plásmidos pET (Novagen Inc., Madison, Wis.), plásmidos pRSET o pREP (Invitrogen, San Diego, Calif.), o plásmidos pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.), y muchas células huésped adecuadas, utilizando métodos desvelados o citados en el presente documento o conocidos de otra manera por los expertos en la técnica relevante. Los vectores de clonación recombinante a menudo incluirán uno o más sistemas de replicación para la clonación o expresión, uno o más marcadores para la selección del huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión.

Los términos "expresar" o "expresión" significa que se permite o causa la información de un gen o secuencia de ADN se vuelva manifiesta, por ejemplo, produciendo una proteína activando las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un gen o secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un "producto de expresión" tal como una proteína. El propio producto de expresión, por ejemplo, la proteína resultante, también se puede decir que se "expresa" en la célula. Un polinucleótido o polipéptido se expresa recombinantemente, por ejemplo, cuando se expresa o produce en una célula huésped ajena bajo el control de un promotor ajeno o nativo, o en una célula huésped nativa bajo el control de un promotor ajeno.

La divulgación proporciona vectores víricos competentes en replicación que contienen un polinucleótido heterólogo que codifica, por ejemplo, una citosina desaminasa o mutante de la misma, un miARN o ARNi, una citocina, un dominio de unión de anticuerpo, etc., que se pueda suministrar a una célula o sujeto. El vector vírico puede ser un vector adenovírico, un vector de sarampión, un vector del herpes, un vector retrovírico (incluyendo un vector lentivírico), un vector rhabdovírico tal como un vector vírico de la estomatitis vesicular, un vector retrovírico, un vector de virus del valle Seneca, un vector de poxvirus (incluyendo vectores derivados de vaccinia o viruela animal), un vector de parvovirus (incluyendo un vector AAV), un vector de alfavirus u otros vectores conocidos por el experto en la técnica (véase también, por ejemplo, Concepts in Genetic Medicine, ed. Boro Dropulic y Barrie Carter, Wiley, 2008, Hoboken, NJ.; The Development of Human Gene Therapy, ed. Theodore Friedmann, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, New York, 1999; Gene and Cell Therapy, ed. Nancy Smyth Templeton, Marcel Dekker Inc., New York, New York, 2000 y Gene Therapy: Therapeutic Mechanism and Strategies, ed. Nancy Smyth Templeton y Danilo D Lasic, Marcel Dekker, Inc., New York, New York, 2000).

El vector vírico puede ser un vector retrovírico competente en replicación o que infecta solo las células de mamífero en replicación. El vector retrovírico competente en replicación puede comprender un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES) 5' del polinucleótido heterólogo que codifica, por ejemplo, una citosina desaminasa, miARN, ARNi, citocina, receptor, anticuerpo o similares. Cuando el polinucleótido heterólogo codifica un ARN no traducido tal como un ARNi, miARN, o ARNi entonces no es necesario un IRES, pero se puede incluir para otro gen traducido, y se

puede utilizar cualquier tipo de retrovirus (véase posteriormente). El polinucleótido puede estar a 3' de un polinucleótido ENV de un vector retrovítico.

Se proporcionan las células huésped transfectadas con un vector retrovítico competente en replicación de la divulgación. Las células huésped incluyen células eucariotas tales como células de levadura, células de insecto o células animales. Las células huésped también incluyen células procariotas tales como las células bacterianas.

También se proporcionan células huésped modificadas que se han transducido (transformado o transfectado) con un vector proporcionado en el presente documento (por ejemplo, un vector retrovítico competente en replicación). Las células huésped modificadas se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes, o amplificar un polinucleótido codificante. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son los que se utilizaban anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y será evidente para los expertos en la técnica y en las referencias citadas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Sambrook, Ausubel y Berger, así como, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique*, 3ª ed. (Wiley-Liss, New York) y las referencias citadas en el presente documento.

Ejemplos de huéspedes de expresión apropiados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *B. subtilis*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; células de insectos tales como de *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero tales como CHO, COS, BHK, HEK293, br de melanoma de Bowes; o células o explantes vegetales, etc. Se pueden utilizar células o líneas celulares humanas, sin embargo, puede ser deseable clonar vectores y polinucleótidos en células huésped no humanas para los fines de la secuenciación, amplificación y clonación.

La divulgación también proporciona vectores retrovíticos competentes en replicación que tienen una estabilidad aumentada con respecto a los vectores retrovíticos anteriores. Dicha estabilidad aumentada durante la infección y replicación es importante para el tratamiento de trastornos de proliferación celular. La combinación de eficacia de transducción, estabilidad del transgén y selectividad de diana se proporciona por el retrovirus competente en replicación. Las composiciones y métodos proporcionan estabilidad de la inserción y mantienen la actividad de transcripción del transgén y la viabilidad de la traducción del polipéptido codificado.

La divulgación proporciona vectores retrovíticos modificados. Los vectores retrovíticos modificados se pueden derivar de miembros de la familia Retroviridae. La familia Retroviridae consiste en tres grupos: los espumavirus (o virus espumosos) tales como el virus espumoso humano (HFV); los lentivirus, así como virus visna de la oveja; y los oncovirus (aunque no todos los virus de este grupo son oncogénicos). El término "lentivirus" se utiliza en su sentido convencional para describir un género de virus que contienen transcriptasa inversa. Los lentivirus incluyen los "virus de inmunodeficiencia" que incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) tipo 1 y tipo 2 (VIH-1 y VIH-2) y virus de inmunodeficiencia de simios (SIV). Los oncovirus adicionalmente se han subdividido históricamente en los grupos A, B, C y D basándose en la morfología de las partículas, según se observa por bajo el microscopio electrónico durante la maduración vírica. Las partículas tipo-A representan las partículas inmaduras de los virus tipo D de Banda que se ven en el citoplasma de células infectadas. Estas partículas no son infecciosas. Las partículas tipo B brotan como virión maduro desde la membrana plasmática por que se envuelven en partículas tipo A intracitoplasmáticas. En la membrana poseen un centro toroidal de 75 nm, a partir del cual proyecta largas espículas glicoproteicas. Después de brotar, las partículas tipo B contiene un centro electrodensidad localizado excéntricamente. El virus prototipo de tipo B es el virus del tumor mamario del ratón (MMTV). No se pueden observar partículas intracitoplasmáticas en las células infectadas por virus del tipo C. A su vez, las partículas maduras brotan directamente de la superficie celular mediante una condensación en forma creciente lunar de "C" que entonces se cierra en sí mismo y se encierra por la membrana plasmática. Las espículas glicoproteicas de la envoltura pueden estar visibles, junto con un centro uniformemente electrodensidad. El brote puede producirse a partir de la superficie de la membrana plasmática o directamente en vacuolas intracelulares. Los virus de tipo C son los más comúnmente estudiados e incluyen muchos de los virus de leucemia aviar y murina (MLV). El virus de leucemia bovina (BLV) y los virus de leucemia de células T humanas de tipo I y II (HTLV-I/II) se clasifican de manera similar a las partículas de tipo C debido a la morfología de su brote a partir de la superficie celular. No obstante, tienen también una morfología hexagonal regular y estructuras del genoma más complejas que los virus de tipo C prototípicos tales como los virus de leucemia murina (MLV). Las partículas de tipo B se parecen a las partículas de tipo B en que muestran estructuras tipo anillo en el citoplasma de la célula infectada, de la cual brotan a partir de la superficie celular, pero el virión incorpora espículas glicoproteicas de superficie cortas. Los centros electrodensos también se localizan excéntricamente en las partículas. El virus de mono Mason Pfizer (MPMV) es el virus prototipo del tipo D.

Los retrovirus se han clasificado de distintas maneras pero la nomenclatura se ha convencionalizado en la última década (véase, ICTVdB - The Universal Virus Database, v 4 en la World Wide Web (www) en ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/ y el libro de texto "Retroviruses" Eds Coffin, Hughs y Varmus, Cold Spring Harbor Press 1997). El vector retrovítico competente en replicación puede comprender un Ortoretrovirus o más normalmente un vector retrovítico gamma.

Los retrovirus se definen por la forma en que replican su material genético. Durante la replicación el ARN se convierte en ADN. A continuación de la invención de la célula se genera una molécula de cadena doble a partir de dos moléculas de ARN que se lleva a cabo en la partícula vírica por el proceso molecular conocido como transcripción inversa. El ADN que se forma llega a integrarse covalentemente en el genoma de la célula huésped como un provirus, desde el que se expresan ARN víricos con la ayuda de los factores celulares y/o víricos. Los ARN víricos expresados están empaquetados en partículas y se liberan como viriones infecciosos.

La partícula retrovítica está compuesta por dos moléculas de ARN idénticas. Cada genoma de tipo silvestre tiene una molécula de ARN de cadena sencilla, en sentido positivo, que está protegida en el extremo 5' y poliadenilada en la cola 3'. La partícula de virus diploide contiene las dos cadenas de ARN formando un complejo con proteínas gag, enzimas víricas (productos genéticos pol) y moléculas de ARNt del huésped en una estructura 'central' de proteínas gag. Rodeado y protegiendo esta cápside hay una bicapa lipídica, derivada de las membranas de la célula huésped y que contiene proteínas de la envoltura vírica (env). Las proteínas env se unen a un receptor celular para el virus y la partícula vírica entra normalmente en la célula huésped mediante endocitosis mediada por un receptor y/o la fusión con la membrana.

Después, la envoltura externa se corta, el ARN vírico se copia en ADN por transcripción inversa. Esto está catalizado por la enzima transcriptasa inversa codificada por la región pol y utilizan el ARNt de la célula huésped empaquetado en el virión como cebador para la síntesis de ADN. De esta manera el ARN genómico se convierte en ADN genómico más complejo.

El ADN lineal de doble cadena producido por transcripción inversa puede tener que circularizarse o no en el núcleo. El provirus ahora tiene dos repeticiones idénticas en cada extremo conocidas como las repeticiones terminales largas (LTR). Los extremos de las dos secuencias de LTR produce el sitio de reconocimiento por un producto pol – la integrasa proteica- que cataliza la integración, de manera que el provirus siempre está unido a dos pares de bases (pb) del ADN del huésped a partir de los extremos de las LTR. Se ve una duplicación de las secuencias celulares en los extremos de ambas LTR. Reminiscentes del patrón de integración de elementos genéticos que se transponen. La integración se creía que se producía aleatoriamente en el genoma de la célula diana. Sin embargo, modificando las repeticiones terminales largas es posible controlar la integración de un genoma retrovítico.

La transcripción, corte y empalme de ARN y traducción del ADN vírico integrado está mediado por las proteínas de la célula huésped. Se generan transcripciones cortadas y empalmadas de manera distinta. En el caso de las proteínas víricas de los retrovirus humanos VIH-1/2 y HTLV-I/II también se utilizan para regular la expresión genética. La interacción entre los factores celulares y víricos es un factor en el control de la latencia del virus y la secuencia temporal en la que los genes víricos se expresan.

Los retrovirus se pueden transmitir horizontal y verticalmente. La transmisión infecciosa eficaz de los retrovirus necesita la expresión en la célula diana de receptores que reconocen específicamente las proteínas de la envoltura vírica, aunque los virus pueden utilizar rutas de entrada no específicas independientes del receptor con baja eficacia. Además, el tipo celular diana puede ser capaz de soportar todos los estadios del ciclo de replicación una vez que el virus se ha unido y penetrado. La transmisión vertical se produce cuando el genoma vírico llega a integrarse en la línea germinal del huésped. El provirus pasará entonces de generación en generación como si fuera un gen celular. Por lo tanto, los provirus endógenos llegan a establecerse de manera que frecuentemente permanecen latentes que pueden ser capaces de activarse cuando el huésped se expone a agentes apropiados.

Como se ha mencionado anteriormente, se hace referencia al ADN integrado intermedio como provirus. La terapia genética o sistemas de suministro genético anteriores utilizan métodos y retrovirus que necesitan la transcripción del provirus y el ensamblaje en virus infecciosos mientras está en presencia de un virus auxiliar apropiado o en una línea celular que contiene las secuencias apropiadas que hacen posible la encapsidación sin la producción coincidente de un virus auxiliar contaminante. Como se describe posteriormente, un virus auxiliar no es necesario para la producción del retrovirus recombinante de la divulgación, ya que las secuencias para la encapsidación se proporcionan en el genoma proporcionando de esta manera un vector retrovítico competente en replicación para el suministro o terapia genética.

Los vectores retrovíticos competentes en replicación existentes también tienden a perderse de una célula infectada o célula huésped durante la transmisión horizontal o vertical y durante la replicación. Esto puede deberse en parte a la presencia de secuencias extranucleotídicas que incluyen repeticiones o que reducen la eficacia de una polimerasa.

El genoma retrovítico y el ADN provírico de la divulgación tienen al menos tres genes: el *gag*, el *pol*, y el *env*, estos genes pueden estar flanqueados por una o dos repeticiones terminales largas (LTR), o en el provirus están flanqueados por dos repeticiones terminales largas (LTR) y secuencias que contienen secuencias cis-actantes tales como psi. El gen *gag* codifica las proteínas estructurales internas (matriz, cápside y nucleocápside); el gen *pol* codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa), proteasa e integrasa; y el gen *env* codifica las glicoproteínas de la envoltura. Las LTR 5' y/o 3' sirven para promocionar la transcripción y la poliadenilación de los

ARN del virión. La LTR contiene todas las demás secuencias cis-actuantes necesarias para la replicación vírica. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *vpu*, *nef*, y *vpx* (en VIH-1, VIH-2 y/o SIV).

Adyacentes a la LTR 5' están las secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del cebador en ARNt) y para la encapsidación eficaz del ARN vírico en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o empaquetamiento del ARN retrovírico en un virión infeccioso) se pierden del genoma vírico, el resultado es un defecto cis que evita la encapsidación del ARN genómico vírico. Este tipo de vector modificado es el que se ha utilizado normalmente en los sistemas de suministro genético anteriores (es decir, sistemas que carecían de elementos que son necesarios para la encapsidación del virión).

La divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula que no está en división, una célula en división, o una célula que tiene un trastorno proliferativo. El retrovirus recombinante competente en replicación de la divulgación comprende una secuencia de polinucleótido que codifica un GAG vírico, un POL vírico, un ENV vírico, un polinucleótido heterólogo precedido por un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES) encapsulados en el virión.

La frase célula "que no está en división" se refiere a una célula que no está en mitosis. Las células que no están en división se pueden bloquear en cualquier punto del ciclo celular, (por ejemplo, G₀/G₁, G₁/S, G₂/M), a condición de que la célula no se esté dividiendo activamente. Para la infección *ex vivo*, se puede tratar una célula en división para bloquear la división celular por técnicas convencionales utilizadas por los expertos en la técnica, incluyendo, radiación, tratamiento con afidocolina, privación de suero e inhibición de contacto. Sin embargo, se debería entender que la infección *ex vivo* a menudo se lleva a cabo sin bloquear las células ya que muchas células ya están detenidas (por ejemplo, las células madre). Por ejemplo, un vector lentivírico recombinante es capaz de infectar cualquier célula que no esté en división, independientemente del mecanismo utilizado para bloquear la división o el punto del ciclo celular en el que la célula se bloquee. Ejemplos de células que no se están dividiendo preexistentes en el cuerpo incluye las células neuronales, musculares, hígado, piel, corazón, pulmón y médula ósea, y sus derivados. Para células en división se pueden utilizar vectores oncorretrovíricos.

Por célula "en división" se quiere decir una célula sometida a mitosis activa, o meiosis. Dichas células en división incluyen las células madre, células cutáneas (por ejemplo, fibroblastos y queratinocitos), gametos, y otras células en división conocidas en la técnica. De particular interés y englobadas en la expresión célula en división son las células que tienen trastornos proliferativos, tales como las células neoplásicas. La expresión, "trastorno proliferativo celular" se refiere a una afección caracterizada por un número anormal de células. La afección puede incluir el crecimiento celular hipertrófico (la multiplicación continua de células que resulta en un sobrecrecimiento de una población celular en un tejido) e hipotrófico (una falta o deficiencia de células en un tejido) o un flujo o migración excesiva de células en un área de un cuerpo. Las poblaciones celulares no necesariamente son de células transformadas, tumorigénicas o malignas, sino que pueden incluir también células normales. Los trastornos proliferativos celulares incluyen trastornos asociados con un sobrecrecimiento de tejidos conjuntivos tales como distintas afecciones fibróticas, incluyendo escleroderma, artritis y cirrosis hepática. Los trastornos proliferativos celulares incluyen los trastornos neoplásicos tales como carcinomas de cabeza y cuello. Los carcinomas de cabeza y cuello incluirían, por ejemplo, carcinoma de la boca, esófago, garganta, laringe, glándula tiroides, lengua, labios, glándulas salivares, nariz, senos paranasales, nasofaringe, puente nasal superior y tumores sinusales, estesieneuroblastoma, cáncer de células escamosas, melanoma maligno, carcinoma seno nasal no diferenciado (SNUC), cerebro (incluyendo glioblastomas) o neoplasias sanguíneas. También se incluyen carcinomas de los ganglios linfáticos regionales incluyendo los ganglios linfáticos cervicales, ganglios linfáticos prelaríngeos, ganglios linfáticos pulmonares yuxtatoesofágicos y ganglios linfáticos submandibulares (Harrison's Principles of Internal Medicine (eds., Isselbacher, et al., McGraw-Hill, Inc., 13ª Edición, ppl850-1853, 1994). Otros tipos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de colon-recto, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer uterino, linfoma, cáncer oral, cáncer pancreático, leucemia, melanoma, cáncer de estómago, cáncer de piel y cáncer ovárico. La enfermedad proliferativa celular también incluye la artritis reumatoide (O'Dell NEJM 350:2591 2004) y otros trastornos autoinmunitarios (Mackay et al NEJM 345:340 2001) que se caracterizan a menudo por la proliferación inapropiada de células del sistema inmunitario.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga está unida operativamente a un IRES. Como se utiliza en el presente documento, la expresión secuencia de ácido nucleico "heteróloga" o transgén se refiere (i) a una secuencia que no existe normalmente en un retrovirus de tipo silvestre, (ii) una secuencia que se origina de una especie ajena, o (iii) si es de la misma especie, puede estar modificado sustancialmente de su forma original. De manera alternativa, una secuencia de ácido nucleico sin cambiar que no se expresa normalmente en una célula es una secuencia de ácido nucleico heteróloga.

Dependiendo del uso que se pretenda del vector retrovírico de la divulgación cualquier número de secuencias de ácido nucleico o polinucleótido heteróloga se puede insertar en el vector retrovírico. Por ejemplo, para los estudios *in vitro* se utilizan marcadores genéticos o se pueden utilizar genes indicadores, incluyendo, moléculas de resistencia a antibióticos y fluorescentes (por ejemplo, GFP). Las secuencias de polinucleótido adicionales que codifican cualquier secuencia de polipéptido deseada también se puede insertar en el vector de la divulgación. Cuando se desea el suministro *in vivo* de una secuencia de ácido nucleico heteróloga se pueden utilizar secuencias terapéuticas como

no terapéuticas. Por ejemplo, la secuencia heteróloga puede codificar una molécula terapéutica incluyendo moléculas antisentido (miARN, ARNip) o ribozimas dirigidas a un gen particular asociado con un trastorno proliferativo celular u otra enfermedad o trastorno asociado a un gen, la secuencia heteróloga puede ser un gen suicida (por ejemplo, HSV-tk o PNP o citosina desaminasa; sea modificada o no modificada) un factor de crecimiento o una proteína terapéutica (por ejemplo, el Factor IX, IL-2, y similares). Otras proteínas aplicables a la divulgación se identifican fácilmente en la técnica.

En un aspecto de la divulgación, el polinucleótido heterólogo en el vector comprende una citosina desaminasa que se ha optimizado para la expresión en una célula human. En un aspecto adicional de la divulgación, la citosina desaminasa comprende una secuencia que tiene el codón optimizado para seres humanos y termoestabilidad aumentada) en comparación con una citosina desaminasa de tipo silvestre. En otro aspecto más de la divulgación, el polinucleótido heterólogo codifica una construcción de fusión que comprende una citosina desaminasa (sea con el codón humano optimizado o no optimizado, sea mutada o no mutada) unida operativamente a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad UPRT u OPRT. En otro aspecto de la divulgación, el polinucleótido heterólogo comprende un polinucleótido de CD de la divulgación (por ejemplo, las SEQ ID NO:3, 5, 11, 13, 15, o 17).

Un vector retroviral competente en replicación puede comprender un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido que comprende una citosina desaminasa (como se describe en el presente documento) y puede comprender adicionalmente un polinucleótido que comprende una molécula de miARN o ARNip sea como parte de la transcripción primera del promotor viral o unida a un promotor, que puede ser específica del tejido o tipo celular.

Los microARN (miARN) son ARN pequeños, no codificantes. Se localizan en intrones de genes codificantes o no codificantes, exones de genes no codificantes o regiones intergénicas. Los genes de miARN se transcriben por la ARN polimerasa II que genera polinucleótidos precursores llamados precursores primarios de miARN (pri-miARN). El pri-miARN del núcleo se procesa por la ribonucleasa Drosha para producir el precursor de miARN (pre-miARN) que forma una estructura corta ahorquillada. Posteriormente, el pre-miARN se transporta al citoplasma mediante la Exportina 5 y se procesa adicionalmente por otra ribonucleasa llamada Dicer para generar un miARN maduro, activo.

Un miARN maduro tiene aproximadamente 21 nucleótido de longitud. Ejerce una función uniéndose a la región 3' no traducida del ARNm de genes diana y suprimiendo la expresión proteica sea por represión o por traducción proteica o degradación de ARNm. El miARN está implicado en procesos biológicos que incluyen el desarrollo, proliferación celular, diferenciación y progresión del cáncer. Los estudios del perfil de miARN indican que algunas expresiones de miARN son específicos del tejido o están enriquecidos en ciertos tejidos. Por ejemplo, se ha demostrado que las expresiones de miR-142-3p, miR-181 y miR-223 están enriquecidos en tejidos hematopoyéticos en seres humanos y ratones (Baskerville et al., 2005 RNA 11, 241-247; Chen et al., 2004 Science 303, 83-86).

Se ha observado que algunos miARN están regulados positivamente (miARN oncogénicos) o regulados negativamente (represores) en varios tumores (Spizzo et al., 2009 Cell 137, 586e1). Por ejemplo, el miR-21 está sobre expresado en el glioblastoma, cáncer de pulmón, próstata, colon, estómago, esófago, y de cuello uterino, leiomiomasarcoma uterino, CLBL, cáncer de cabeza y cuello. Por el contrario, se ha expuesto que los miembros de let-7 está regulado negativamente en el glioblastoma, cánceres de pulmón, mama, gástrico, de ovario, próstata y colon. El restablecimiento de la homeostasis de la expresión de miARN en el cáncer es un mecanismo imperativo para inhibir o invertir la progresión del cáncer.

Una consecuencia de las funciones vitales moduladas por los miARN en los cánceres, se enfocan en el desarrollo potencial de estrategias terapéuticas se han dirigido hacia la inhibición mediada por antisentido (antigómeros) de los miARN oncogénicos. Sin embargo, la sustitución de miARN puede representar una estrategia igualmente eficaz. En esta estrategia, los miARN más útiles terapéuticamente son los que se expresan con bajos niveles en tumores, pero con un alto nivel, y por tanto tolerado, en tejidos normales.

Los miARN que están regulados negativamente en los cánceres podrían ser útiles como agentes anticáncer. Los ejemplos incluyen miR-128-1, let-7, miR-26, miR-124, y miR-137 (Esquela-Kerscher et al., 2008 Cell Cycle 7, 759-764; Kumar et al., 2008 Proc Natl Acad Sci USA 105, 3903-3908; Kota et al., 2009 Cell 137, 1005-1017; Silber et al., 2008 BMC Medicine 6:14 1-17). Se ha informado de que la expresión de miR-128 está enriquecida en el sistema nervioso central y se ha observado que está regulada negativamente en gliomas (Sempere et al., 2004 Genome Biology 5: R13.5-11; Godlewski et al., 2008 Cancer Res 68: (22) 9125-9130). El miR-128 se codifica mediante dos genes distintos, el miR-128-1 y el miR-128-2. Ambos se procesan en la una secuencia madura idéntica. Se ha informado de que Bmi-1 y E2F3a son las dianas directas del miR-128 (Godlewski et al., 2008 Cancer Res 68: (22) 9125-9130; Zhang et al., 2009 J. Mol Med 87:43-51). Además, se ha observado que la expresión de Bmi-1 está regulada positivamente en una variedad de cánceres humanos, incluyendo gliomas, linfomas de células en mantel, cáncer de pulmón de células no pequeñas, linfoma no Hodgkin de células B, cáncer de mama, colorrectal y de próstata. Además, se ha demostrado que el Bmi-1 es necesario para la autorrenovación de células madre en diversos tejidos, incluyendo las células madre neuronales, así como la población de células "tipo-madre" en los gliomas.

Aunque ha habido varias demostraciones *in vitro* de las posibilidades de la inhibición mediada por miARN de la función celular, ha sido difícil suministrar estos como oligonucleótidos o en vectores víricos tan eficazmente como era necesario para tener efectos *in vivo* (por ejemplo, Li et al. Cell Cycle 5:2103-2109 2006), como pasaba con otras moléculas. Los vectores no replicantes no parecen ser lo suficientemente eficaces en cualquier caso para conseguir el suministro de un gen terapéutico en una parte significativa de los tumores. Sin embargo, tampoco es simple saber cómo utilizar vectores replicantes para suministrar agentes del tipo miARN. En particular, no está claro cómo incorporar secuencias ARN extra en el ARN del genoma de retrovirus competentes en replicación y mantener la eficacia de replicación y guardar establemente la adición incorporada en el genoma.

Los vectores retrovíricos y lentivíricos deficientes en replicación se han utilizado para expresar establemente pri-miARN mediante un promotor de polimerasa II tal como CMV o LTR y se demostró la producción de miARN maduro. Sin embargo, estos vectores no tienen que ir a través del ciclo de vida completo del retrovirus o lentivirus muchas veces, como se necesita en los vectores replicantes. El genoma tiene que ser capaz de acomodar muchos más eventos que la simple entrada, integración y transcripción. Los problemas asociados con el uso de un virus basado en ARN para expresar miARN incluyen; (1) la integridad del ARN del genoma vírico en una etapa después de la transcripción durante el procesamiento del ARN; (2) la estabilidad del casete insertado durante la replicación; y (3) el procesamiento adecuado del pri-miARN como parte del ARN vírico transcrito desde el promotor de LTR que produce el miARN maduro.

Por lo tanto, la incorporación de promotores de ARN polimerasa tipo III tal como el promotor U6 y el H1 en los vectores retrovíricos y lentivíricos no replicantes se ha utilizado ampliamente para expresar ARN de interferencia pequeños (ARNip) funcionales que producen un ARN estructurado en una horquilla corta (Bromberg-White et al., 2004 J Virol 78:9, 4914-4916; Sliva et al., 2006 Virology 351, 218-225; Haga et al., 2006, Transplant Proc 38(10):3184-8). La secuencia del bucle es escindida por Dicer produciendo los ARNip maduros que tiene 21-22 nucleótidos de longitud. El ARNhp puede expresarse establemente en las células para regular negativamente la expresión del gene diana. Sin embargo, en la incorporación de dichos casetes en un vector retrovírico recombinante competente en replicación, la expresión y el procesamiento con Dicer para producir miARN maduro sigue siendo problemático. En un aspecto, la presente divulgación proporciona un vector retrovírico recombinante competente en replicación que contiene una secuencia de polinucleótido heteróloga de un precursor primario de miARN.

En un aspecto adicional de la divulgación en precursor primario de miARN es de origen humano. En otro aspecto de la divulgación el precursor primario de miARN está corriente abajo del gen env.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector retrovírico recombinante competente en replicación que contiene una secuencia de polinucleótido heteróloga del precursor primario humano miR-128-2 (SEQ ID NO: 32) corriente abajo del gen env. Se pueden incorporar miARN que están regulados negativamente en cánceres en el vector para el suministro genético terapéutico. Por ejemplo, let-7, miR-26, miR-124, y miR-137 (Esquela-Kerscher et al., 2008 Cell Cycle 7, 759-764; Kumar et al., 2008 Proc Natl Acad Sci USA 105, 3903-3908; Kota et al., 2009 Cell 137, 1005-1017; Silber et al., 2008 BMC Medicine 6:14 1-17).

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona un vector retrovírico recombinante competente en replicación que contiene una secuencia de polinucleótido heteróloga del pre-miR-128 humano estructurado en horquilla corta unido a un promotor H1 humano (SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34) corriente abajo del gen env. Se pueden incorporar miARN que están regulados negativamente en los cánceres en el vector para el suministro genético terapéutico. Por ejemplo, let-7, miR-26, miR-124, y miR-137 (Esquela-Kerscher et al., 2008 Cell Cycle 7, 759-764; Kumar et al., 2008 Proc Natl Acad Sci USA 105, 3903-3908; Kota et al., 2009 Cell 137, 1005-1017; Silber et al., 2008 BMC Medicine 6:14 1-17).

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

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

El uso de un oligonucleótido para parar la transcripción se conoce como la estrategia triple ya que el oligómero se enrolla alrededor de la doble hélice de ADN, formando una hélice de tres cadenas. Por lo tanto, estos compuestos

triples se pueden diseñar para que reconozcan un único sitio en un gen escogido (Maher, et al., *Antisense Res. and Dev.*, 1(3):227, 1991; Helene, C., *Anticancer Drug Design*, 6(6):569, 1991).

Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad de escindir específicamente otro ARN de cadena sencilla de manera análoga a las ADN endonucleasas de restricción. Mediante la modificación de secuencias de nucleótido que codifican estos ARN, es posible modificar moléculas que reconocen secuencias de nucleótido específicas en una molécula de ARN y escindirla (Cech, J. *Amer. Med. Assn.*, 260:3030, 1988). Una ventaja principal de esta estrategia es que, debido a que son específicas de la secuencia, solamente se activan ARNm con secuencias particulares.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ARN de interferencia" (ARNi) se refiere al proceso de silenciamiento genético postranscripcional específico de secuencia mediado por ácidos nucleicos de interferencia cortos (ARNip o microARN (miARN)). La expresión "agente capaz de mediar la interferencia de ARN" se refiere a ARNip, así como a vectores ADN y ARN que codifican los ARNip cuando se transcriben en una célula. El término ARNip o miARN significa que engloba cualquiera molécula de ácido nucleico que es capaz de mediar la interferencia de ARN específica de secuencia, por ejemplo, un ARN de interferencia corto (ARNip), ARN de doble cadena (dsARN), micro-ARN (miARN), ARN horquillado corto (ARNhp), oligonucleótido de interferencia corto, ácido nucleico de interferencia corto, oligonucleótido modificado de interferencia corto, ARNip modificado químicamente, ARN de silenciamiento genético postranscripcional (ptgsARN), y otros.

El intervalo adecuado de diseño la longitud del tallo de un dúplex horquillado incluye longitudes de tallo de 20-30 nucleótidos, 30-50 nucleótidos, 50-100 nucleótidos, 100-150 nucleótidos, 150-200 nucleótidos, 200-300 nucleótidos, 300-400 nucleótidos, 400-500 nucleótidos, 500-600 nucleótidos, y 600-700 nucleótidos. El intervalo adecuado para el diseño de longitudes de bucle de un dúplex horquillado incluye longitudes de 4-25 nucleótidos, 20-50 nucleótidos, o más largos si la longitud del tallo del dúplex horquillado es sustancial. En ciertos contextos, las estructuras horquilladas con regiones duplicadas son más largas de 21 nucleótidos pueden promover un silenciamiento dirigido por ARNip eficaz, independientemente de la secuencia y longitud del bucle.

Los vectores retrovíricos replicantes de la divulgación se puede utilizar para tratar una enfermedad expresando un ARNip o miARN modificados (Dennis, *Nature*, 418: 122 2002) que apaga o disminuye la expresión de genes clave que gobiernan la proliferación o supervivencia de células enfermas incluyendo las células tumorales. Dichas dianas incluyen genes como Rad 51 una enzima central en la reparación del ADN, y sin la cual el crecimiento celular se restringe drásticamente. Otras dianas incluyen muchas de las moléculas de la ruta de señalización que controla el crecimiento celular (Marquez & McCaffrey *Hum Gene Ther.* 19:27 2008). El ARNip o miARN pueden combinarse con la expresión de un gen citotóxico del mismo o diferente vector retrovírico de la divulgación. Un ejemplo de un gen citotóxico adecuado comprende una citosina desaminasa o una citosina desaminasa modificada de la divulgación.

En el uso, los vectores retrovíricos se replican a lo largo del tumor u otro tejido diana y antes de que se produzca la inhibición del crecimiento el virus primero se integra en el genoma huésped y continúa produciendo virus después de que el crecimiento de esa célula se inhiba. Los métodos para la selección de secuencias de miARN o ARNip se conocen en la técnica. La característica clave en general del diseño eficaz de secuencias de ARNip o miARN habitualmente es evitar los efectos "fuera de la diana". Sin embargo, el uso de vectores replicantes que sean altamente específicos de células tumorales tales como los de la divulgación, estos efectos secundarios no son muy importantes, ya que se espera que las células eventualmente mueren. Un vector retrovírico de esta divulgación se puede producir utilizando células de otras especies para las que la proteína correspondiente no se direcciona significativamente. Dichas células incluyen las líneas celulares de perro o líneas celulares de pollo. De manera alternativa el virus se produce por transfección transitoria en células derivadas de 293 humanas u otra línea celular que permita una transfección transitoria eficaz. Para este uso, el virus no necesita utilizar un IRES, y la secuencia de ARNip o miARN puede insertarse simplemente en un sitio conveniente del genoma vírico. Este sitio incluye la región corriente abajo de la envoltura y corriente arriba de la LTR 3' del retrovirus replicante. De manera alternativa se pueden insertar unidades de transcripción polIII en el genoma vírico con el ARNip o miARN apropiado, normalmente corriente abajo del gen de envoltura 3'. Se pueden insertar varias secuencias diferentes de ARNip o miARN para asegurar la regulación negativa eficaz del gen diana o la regulación negativa de más de un gen. Las secuencias y dianas adecuadas se pueden obtener de fuentes conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo:

- La base de datos MIT/ICBP siRNA <http://web.mit.edu/sirna/> - La base de datos de ARNip del MIT [Instituto de Tecnología de Massachusetts]/ICBP [Programa de Biología del Cáncer integrativo] es un esfuerzo universitario amplio para catalogar estos reactivos validados experimentalmente y hacer que esa información esté disponible para otros investigadores, tanto dentro como fuera de la comunidad del MIT. (Instituto de Tecnología de Massachusetts).
- RNAi Central - http://katahdin.cshl.org:9331/RNAi_web/scripts/main2.pl, Recursos de ARNi, que incluyen herramientas de diseño de ARNip y ARNhp (Hannon Lab, Cold Spring Harbor Laboratory)
- The RNAi Web - <http://www.rnaiweb.com/> Recurso general.
- siDIRECT - <http://genomics.jp/sidirect/> Programa de diseño de ARNip específico de diana en línea para ARN de interferencia de mamíferos (Universidad de Tokyo, Japón).

- siRNA Database – Una base de datos de ARNip exhaustiva que contiene dianas del ARNip contra todas las secuencias de ARNm a lo largo de una variedad de organismos. Parte del sitio de internet Protein Lounge systems biology).
- Base de datos de ARNip y Recursos para estudios del ARN de interferencia (<http://www.rnainterference.org/>)
- siRNA Selector - <http://www.bioinfo.wistar.upenn.edu/siRNA/siRNA.htm>. Un conjunto de reglas utilizado para evaluar la funcionalidad del ARNip basándose en parámetros termodinámicos (Khvorova et al., 2003, Schwarz et al., 2003) y los determinantes relacionados con la secuencia desarrollados por Dharmasiri (Reynolds et al., 2004). La especificidad se determina utilizando BLAST contra las bases de datos UniGene (Wistar Institute)
- siRNA Target Finder http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html (Ambion).

Los retrovirus replicantes de la divulgación también pueden expresar dianas para ARNip de origen natural que tienen la expresión restringida a tipos celulares particulares de manera que la replicación del vector está significativamente inhibida en esos tipos celulares. La generación de un vector retroviral recombinante competente en replicación basado en el virus de leucemia murina permite un alto nivel de transducción y por tanto una alta eficacia de suministro genético *in vivo*. Un problema principal del uso de un vector retroviral competente en replicación ha sido la diseminación incontrolada del virus como se ha informado previamente (Donahue et al., J. Exp Med. 1992, 176:1124-1135; Calmes et al., Blood 2005, 106: 2530-2533; Seggewiss et al., Blood 2006, 107: 3865-3867). Debido a la naturaleza del virus, la diseminación vírica se puede conseguir inicialmente en las células linfáticas y posteriormente se disemina a los tejidos periféricos. Con fines antitumorales algunas lelas del cuerpo que se replican naturalmente en cierto nivel son las células hematopoyéticas, las células de la lámina intestinal, y algunas células endoteliales. Estos son entonces sitios donde el virus que está en circulación podría infectar productivamente. En general esto sería no deseable. Cualquier infección remota de células tales como estas se pueden inhibir incluyendo una diana para los miARN de origen natural o por una combinación de miARN en estos tipos celulares. Ya se ha demostrado alguna fiabilidad del uso de miARN dianas (Brown et al. Nat Biotechnol. 2007 25:1457-67). Estas dianas son secuencias de ARN pequeño con un coincidente homólogo de las secuencias de miARN de origen natural. Estas secuencias se pueden insertar en cualquiera sitio conveniente en los vectores de la presente invención sin que tenga, en general, una consecuencia perjudicial significativa para la viabilidad del vector, en una célula distinta de la del tipo deseado. Los vectores se pueden producir y utilizar como se describe en el presente documento.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un vector retroviral recombinante competente en replicación que contiene una única copia de la secuencia diana miR-142-3p (142-3pT, SEQ ID NO: 35) corriente abajo del transgén, tal como γ CD2 o GFP, unida al IRES. Además de miR181 y miR-223, se puede incorporar la secuencia diana de otro tejido o célula enriquecidos en miARN en el vector para restringir la diseminación vírica de manera específica al tejido o tipo celular. Por ejemplo, las expresiones de miR-133 y miR-206 están altamente enriquecidas en las células musculares (Kelly et al., 2008 Nature Medicine 14:11 1278-1283).

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector retroviral recombinante competente en replicación que contiene 4 copias del 142-3pT (SEQ ID NO: 36) corriente abajo del transgén, tal como γ CD2 o GFP, unida al IRES. Además de miR181 y miR-223, se puede incorporar la secuencia diana de otro tejido o célula enriquecidos en miARN en el vector para restringir la diseminación vírica de manera específica al tejido o tipo celular. Por ejemplo, las expresiones de miR-133 y miR-206 están altamente enriquecidas en las células musculares. La presente divulgación proporciona la flexibilidad de una única, múltiples o una combinación de secuencias de miARN diana y de esta manera proporciona una restricción de la diseminación vírica incontrolada de una manera específica del tejido y/o la célula *in vitro* e *in vivo* (por ejemplo, en las células hematopoyéticas y/o musculares) (Kelly et al., 2008 Nature Medicine 14:11 1278-1283).

El miARN diana se puede insertar a 3' del transgén pero antes de la LTR 3' o corriente arriba del IRES pero después del extremo 3' de la envoltura. En general, la diana no se insertará en las secuencias codificantes de proteína.

En más aspectos adicionales de la divulgación, el polinucleótido heterólogo puede comprender una citocina tal como una interleucina, un interferón gamma o similares. Las citocinas que se pueden expresar de un vector retroviral de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, IL-1 alfa, IL-1beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, y IL-21, anti-CD40, CD40L, IFN-gamma y TNF-alfa, formas solubles del TNF-alfa, linfotóxina-alfa (LT-alfa, también conocida como TNF-beta), LT-beta (que se encuentra formando un complejo heterotrimerico LT-alfa2-beta), OPGL, FasL, CD27L, CD30L, CD40L, 4-1BBL, DcR3, OX40L, TNF-gamma (Publicación Internacional N.º WO 96/14328), AIM-I (Publicación Internacional N.º WO 97/33899), endocina-alfa (Publicación Internacional N.º WO 98/07880), OPG, y neutrocina-alfa (Publicación Internacional N.º WO 98/18921, OX40, y factor de crecimiento de nervios (NGF), y formas solubles de Fas, CD30, CD27, CD40 y 4-1BB, TR2 (Publicación Internacional N.º WO 96/34095), DR3 (Publicación Internacional N.º WO 97/33904), DR4 (Publicación Internacional N.º WO 98/32856), TR5 (Publicación Internacional N.º WO 98/30693), TRANK, TR9 (Publicación Internacional N.º WO 98/56892), TR10 (Publicación Internacional N.º WO 98/54202), 312C2 (Publicación Internacional N.º WO 98/06842), y TR12, y formas solubles de CD154, CD70, y CD153. Las proteínas angiogénicas pueden ser útiles en algunos aspectos de la divulgación, particularmente para la producción de proteína a partir de líneas celulares. Dichos factores angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, Factor de crecimiento derivado de glioma (GDGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas A (PDGF-A), actor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGF-B), factor de crecimiento placentario (PIGF), Factor de crecimiento

placentario 2 (PlGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A), factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGF-2), Factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B), Factor de crecimiento endotelial vascular B-186 (VEGF-B186), Factor de crecimiento endotelial vascular -D (VEGF-D), Factor de crecimiento endotelial vascular -D (VEGF-D), y Factor de crecimiento endotelial vascular -E (VEGF-E). También se pueden suministrar factores de crecimiento de fibroblastos mediante un vector de la divulgación e incluyen, por no se limitan a, FGF-1, FGF-2, FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-7, FGF-8, FGF-9, FGF-10, FGF-11, FGF-12, FGF-13, FGF-14, y FGF-15. Se pueden suministrar factores de crecimiento hematopoyético utilizando vectores de la divulgación, dichos factores de crecimiento incluyen, pero no se limitan a factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) (sargramostim), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) (filgrastim), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF, CSF-1), eritropoyetina (epoetina alfa), factor de células madre (SCF, ligando c-kit, factor acero), factor estimulante de colonias de megacariocitos, proteínas de fusión PIXY321 (a GM-CSF/IL-3) y similares.

En general, el virus recombinante de la divulgación es capaz de transferir una secuencia de ácido nucleico en una célula diana.

La expresión "secuencia de ácido nucleico reguladora" se refiere colectivamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores corriente arriba, orígenes de replicación, amplificadores y similares, que colectivamente proporciona la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todas estas secuencias de control tienen que estar siempre presentes a condición de que la secuencia codificante seleccionada sea capaz de replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped adecuada. Un experto en la técnica puede identificar fácilmente la secuencia de ácido nucleico reguladora a partir de bases de datos públicas y materiales. Además, un experto en la técnica puede identificar una secuencia reguladora que es aplicable para el uso que se pretende, por ejemplo, *in vivo*, *ex vivo*, o *in vitro*.

Un sitio interno de entrada en el ribosoma ("IRES") se refiere a un segmento de ácido nucleico que promueve la entrada o retención de un ribosoma durante la traducción de una secuencia codificante habitualmente a 3' del IRES. En algunos aspectos de la divulgación el IRES puede comprender un sitio receptor/donante de corte y empalme, sin embargo, los IRES preferidos carecen de un sitio receptor/donante de corte y empalme. Normalmente, la entrada de los ribosomas en el ARN mensajero tiene lugar mediante la protección localizada en el extremo 5' de todos los ARNm de eucariotas. Sin embargo, existen excepciones a esta regla universal. La ausencia de una protección en algunos ARNm víricos sugiere la existencia de estructuras alternativas que permiten la entrada en los ribosomas en un sitio interno de estos ARN. Hasta la fecha, se han identificado varias de estas estructuras, denominadas IRES teniendo en cuenta su función, en la región 5' no codificante de ARNm víricos no protegidos, tal como los de, en particular, picornavirus tales como el virus de la poliomielitis (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103-1112) y el virus EMCV (virus de la encefalomiocarditis (Jang et al., J. Virol., 1988, 62, 2636-2643). La divulgación proporciona el uso de un IRES en el contexto de un vector retrovítico competente en replicación.

La expresión "región promotora" se utiliza en el presente documento en su sentido ordinario para referirse a una región de nucleótidos que comprende una secuencia de ADN reguladora, donde la secuencia reguladora se deriva de un gen que es capaz de unirse a la ARN polimerasa e iniciar la transcripción de una secuencia codificante corriente abajo (en dirección 3'). La secuencia reguladora puede ser homóloga o heteróloga respecto a la secuencia genética deseada. Por ejemplo, se pueden utilizar un amplio intervalo de promotores, incluyendo promotores víricos o de mamífero, como se ha descrito anteriormente.

La secuencia de ácido nucleico heteróloga está normalmente ajo el control del promotor de LTR-amplificador de señales o un promotor interno, y las señales retenidas en la LTR retrovítica puede seguir haciendo eficaz la integración del vector en el genoma de la célula huésped. En consecuencia, los vectores retrovíticos recombinantes de la divulgación, se pueden insertar las secuencias deseadas, los genes y/o fragmentos genéticos en varios sitios y bajo diferentes secuencias reguladoras. Por ejemplo, un sitio de inserción puede ser el sitio proximal de amplificador/promotor vírico (es decir, el locus genético dirigido por LTR 5'). De manera alternativa, se pueden insertar las secuencias deseadas en un sitio distal de la secuencia reguladora (por ejemplo, la secuencia IRES a 3' del gen env) o cuando están presentes dos o más secuencias heterólogas, una secuencia heteróloga puede estar bajo el control de una primera región reguladora y una segunda secuencia heteróloga bajo el control de una segunda región reguladora. Otros sitios distales incluyen secuencias promotoras víricas, donde la expresión de la secuencia o secuencias deseadas es mediante corte y empalme del cistron proximal del promotor, se puede utilizar un promotor heterólogo interno como SV40 o CMV, o un sitio interno de entrada en el ribosoma (IRES).

En un aspecto, el genoma retrovítico de la divulgación contiene un IRES que comprende un sitio de clonación corriente abajo del IRES por inserción de un polinucleótido heterólogo/deseado. En un aspecto de la divulgación, el IRES se localiza a 3' del gen env en el vector retrovítico, pero a 5' del polinucleótido heterólogo deseado. En consecuencia, se puede unir operativamente un polinucleótido heterólogo que codifica un polipéptido deseado al IRES.

En otro aspecto de la divulgación, una secuencia de polinucleótido dirigido se incluye como parte del vector retrovítico recombinante de la divulgación. La secuencia de polinucleótido dirigido es un ligando dirigido (por ejemplo, hormonas peptídicas tales como heregulina, anticuerpos de cadena sencilla, un receptor o un ligando de un receptor), y elemento regulador específico de tejido o específico de un tipo celular (por ejemplo, un promotor o amplificador específico de tejido o específico de un tipo celular), o una combinación de un ligando dirigido y un elemento regulador específico de tejido/específico de un tipo celular. Preferentemente, el ligando dirigido está unido operativamente a la proteína env del retrovirus, creando una proteína env retrovítica quimérica. Las proteínas GAG vírica, POL vírica y ENV vírica se pueden derivar de cualquier retrovirus adecuado (por ejemplo, derivado de MLV o lentivirus). En otro aspecto de la divulgación, proteína ENV vírica no se deriva de un retrovirus (por ejemplo, de CMV o VSV).

En un aspecto, el retrovirus recombinante de la divulgación se modifica genéticamente de manera que el virus se dirige a un tipo celular particular (por ejemplo, células de músculo liso, células hepáticas, células renales, fibroblastos, queratinocitos, células madre mesenquimáticas, células de médula ósea, condrocitos, células epiteliales, células intestinales, células mamarias, células neoplásicas, células de glioma, células neuronales y otras conocidas en la técnica) de manera que el genoma recombinante del vector retrovítico se suministra a una célula diana que no se divide, una célula diana en división, o una célula diana que tiene un trastorno proliferativo.

En un aspecto, el vector retrovítico se dirige a la célula uniéndose a las células que tiene una molécula en la superficie externa de la célula. Este método de direccionamiento del retrovirus utiliza la expresión de un ligando de direccionamiento en el revestimiento del retrovirus para ayudar al direccionamiento del virus a las células o tejidos que tiene un receptor o molécula de unión que interactúa con el ligando de direccionamiento en la superficie del retrovirus. Después de la infección de una célula por el virus, el virus inyecta su ácido nucleico en la célula y el material genético del retrovirus puede integrarse en el genoma de la célula huésped.

En otro aspecto, el direccionamiento utiliza elementos reguladores específicos de la célula o específico del tejido para promover la expresión y transcripción del genoma vírico en una célula dirigida que utiliza activamente los elementos reguladores, como se describe más completamente posteriormente. El material genético del retrovirus transferido se transcribe entonces y se traduce en proteínas en la célula huésped. El elemento regulador de direccionamiento está unido normalmente a la LTR 5' y/o 3', creando una LTR quimérica.

Insertando un polinucleótido heterólogo de interés en el vector vírico de la divulgación, junto con otro gen que codifica, por ejemplo, el ligando de un receptor de una célula diana específica, el vector es ahora específico de la diana. Los vectores víricos pueden hacerse específicos de la diana adjuntando, por ejemplo, un azúcar, un glicolípido, o una proteína. El direccionamiento se puede conseguir utilizando un anticuerpo que dirige el vector vírico. Los expertos en la técnica conocerán, o fácilmente pueden concebir, secuencias de polinucleótido específicas que se puedan insertar en el genoma vírico o proteínas que se pueden añadir a la envoltura vírica para permitir el suministro específico de la diana del vector vírico que contiene la secuencia de ácido nucleico de interés.

Por lo tanto, la divulgación incluye en un aspecto, una proteína env quimérica que comprende una proteína ENV retrovítica unida operativamente a un polipéptido de direccionamiento. El polipéptido de direccionamiento puede ser una molécula receptora específica de la célula, un ligando para un receptor específico de una célula, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo contra un epítipo antigénico específico de una célula o cualquier otro ligando fácilmente identificado en la técnica y que sea capaz de unirse o interactuar con una célula diana. Ejemplos de polipéptidos de direccionamiento o moléculas incluyen anticuerpos bivalentes que utilizando biotina-estreptavidina como o enlazadores (Etienne-Julan et al., J. Of General Virol., 73, 3251-3255 (1992); Roux et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 86, 9079-9083 (1989)), virus recombinantes que contengan en su envoltura una secuencia que codifica una región variable de un anticuerpo de cadena sencilla contra un hapteno (Russell et al., Nucleic Acids Research, 21, 1081-1085 (1993)), clonación de ligandos de hormonas peptídicas en la envoltura del retrovirus (Kasahara et al., Science, 266, 1373-1376 (1994)), construcciones quiméricas EPO/env (Kasahara et al., 1994), un anticuerpo de cadena sencilla contra el receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL) en la envoltura de MLV ecotrópico, que da como resultado la infección específica de células HeLa que expresan el receptor de LDL (Somia et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 92, 7570-7574 (1995)), de manera similar se puede alterar el intervalo del huésped de ALV por la incorporación de un ligando de integrina, haciendo que el virus sea capaz ahora de cruzarse entre especies para infectar específicamente las células de glioblastoma de rata (Valsesia-Wittmann et al., J. Virol. 68, 4609-4619 (1994)), y Dornberg y colaboradores (Chu y Dornburg, J. Virol 69, 2659-2663 (1995)) han informado del direccionamiento específico del tejido del virus de necrosis esplénica (SNV), un retrovirus aviar, que utiliza envolturas que contienen anticuerpos de cadena sencilla dirigido contra marcadores tumorales.

La divulgación proporciona un método de producción de un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula diana que comprende la transfección de una célula huésped adecuada con lo siguiente: un vector que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica una gag vírica, una pol vírica y una env vírica, y un polinucleótido heterólogo, unido operativamente unido a una secuencia de ácido nucleico reguladora, y la recuperación del virus recombinante.

El retrovirus y métodos de la divulgación proporcionan un retrovirus competente en replicación que no necesita un virus auxiliar o una secuencia de ácido nucleico o proteínas adicionales con el fin de propagarse y producir viriones. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación codifican, por ejemplo, un grupo específico de antígeno y transcriptasa inversa, (e integrasa y enzimas proteasas necesarias para la maduración y la transcripción inversa), respectivamente, como se ha expuesto anteriormente. La gag y pol víricas se pueden derivar de un lentivirus, tal como el VIH o un oncovirus o un retrovirus gamma tal como MoMLV. Además, el genoma de ácido nucleico del retrovirus de la divulgación incluye una secuencia que codifica una proteína de la envoltura vírica (ENV). El gen env se puede derivar de cualquier retrovirus. La env puede ser una proteína de la envoltura anfitriónica que permite la transducción de células de ser humano y otras especies, o puede ser una proteína de envoltura ecotrófica que es capaz de transducir solamente células de ratón y rata. Además, puede ser deseable dirigir el virus recombinante por unión de la proteína de la membrana con un anticuerpo o un ligando particular para dirigirse a un receptor de un tipo celular particular. Como se ha mencionado anteriormente, los vectores retrovíricos se pueden hacer para que sean específicos de diana insertando, por ejemplo, un glicolípido o una proteína. El direccionamiento se consigue a menudo utilizando un anticuerpo para dirigir el vector retrovírico a un antígeno sobre un tipo celular particular (por ejemplo, un tipo celular que se encuentra en ciertos tejidos o un tipo celular de cáncer). Los expertos en la técnica sabrán, o pueden concebir fácilmente sin excesiva experimentación, métodos específicos para conseguir el suministro de un vector retrovírico a una diana específica. En un aspecto de la divulgación, el gen env se deriva de un no retrovirus (por ejemplo, CMV o VSV). Ejemplos de genes env derivados de retrovirus incluyen, pero no se limitan a: virus de la leucemia murina de Moloney (MoMuLV), virus del sarcoma murino de Harvey (HaMuSV), virus del tumor mamario murino (MuMTV), virus de la leucemia del gibón (GaLV), virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y virus del sarcoma de Rous (RSV). También se pueden utilizar otros genes de env tales como el del virus de estomatitis vesicular (VSV9) (Proteína G), envoltura de citomegalovirus (CMV), o hemaglutinina (HA) del virus de la gripe.

En un aspecto de la divulgación, el genoma retrovírico se deriva de un oncoretrovirus, y más particularmente un oncoretrovirus de mamífero. Por "derivado" se quiere decir que la secuencia de polinucleótido parental es un oncovirus de tipo silvestre que se ha modificado mediante la inserción o retirada de secuencias de origen natural (por ejemplo, inserción de un IRES, inserción de un polinucleótido que codifica un polipéptido o ácido nucleico de interés, el intercambio de un promotor más eficaz de un retrovirus o virus diferente en lugar del promotor de tipo silvestre, y similares).

A diferencia de los retrovirus recombinantes producidos por métodos convencionales en la técnica que son deficientes y necesitan asistencia con el fin de producir partículas víricas infecciosas, la divulgación proporciona un retrovirus que es competente en replicación.

En otro aspecto, la divulgación proporciona vectores retrovíricos que se dirigen utilizando secuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras específicas de la célula o el tejido (por ejemplo, promotores) se pueden utilizar para dirigir la expresión de secuencias genéticas en poblaciones celulares específicas. Los promotores víricos y de mamífero adecuados para la divulgación se han descrito en otra parte del presente documento. En consecuencia, la divulgación proporciona un retrovirus que tiene elementos promotores específicos del tejido en el extremo 5' del genoma retrovírico. Normalmente, los elementos/secuencias específicas del tejido están en la región U3 de la LTR del genoma retrovírico, incluyendo, por ejemplo, promotores y amplificadores específicos de la célula o el tejido para células neoplásicas (por ejemplo, amplificadores y promotores específicos de las células tumorales), y promotores inducibles (por ejemplo, tetraciclina).

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

En algunas circunstancias, puede ser deseable regular la expresión. Por ejemplo, se pueden utilizar diferentes promotores víricos con fuerzas de actividad variables dependiendo del nivel de expresión deseado en células de mamífero, se utiliza a menudo el CMV temprano inmediato para proporcionar una fuerte activación transcripcional. También se han utilizado versiones modificadas del promotor de CMV que son menos potentes cuando se desean niveles de expresión reducidos del transgén. Cuando se desea la expresión de un transgén en células hematopoyéticas, se pueden utilizar promotores retrovíricos tales como las LTR de MLV y MMTV. Otros promotores víricos que se pueden utilizar incluyen SV40, RSV LTR, HIV-1 y HIV-2 LTR, promotores de adenovirus tales como de las regiones E1A, E2A, o MLP, AAV LTR, virus del mosaico de la coliflor, HSV-TK, y virus del sarcoma aviar.

De manera similar, los promotores selectivos o específicos de tejido se pueden utilizar para efectuar la transcripción en tejidos o células específicos de manera que se reduzca la toxicidad potencial o los efectos no deseados a los tejidos no dirigidos. Por ejemplo, se pueden utilizar promotores tales como el PSA, probasina, fosfatasa ácida prostática o caliceína glandular específica de próstata (hK2) para dirigir la expresión genética a la próstata. La proteína accesoria Whey (WAP) se puede utilizar para la expresión en tejido mamario (Andres et al., PNAS 84:1299-1303, 1987). Otros dominios promotores/reguladores que se pueden utilizar se exponen en la Tabla 1.

“Elementos reguladores específicos de tejido” son elementos reguladores (por ejemplo, promotores) que son capaces de dirigir la transcripción de un gen en un tejido mientras que se mantiene sobre todo “silente” en otros tipos tisulares. Se entenderá, sin embargo, que los promotores específicos de tejido pueden tener una cantidad detectable de actividad de “fondo” o de “base” en los tejidos donde están silentes. El grado en el que un promotor se activa selectivamente en un tejido diana se puede expresar como una relación de selectividad (actividad en un tejido diana/actividad en un tejido de control). A este respecto, un promotor específico de tejido útil en la práctica de la divulgación normalmente tiene una relación de selectividad de más de aproximadamente 5. Preferentemente, la relación de selectividad es mayor de aproximadamente 15.

En ciertas indicaciones, puede ser deseable activar la transcripción en momentos específicos después de la administración del retrovirus recombinante competente en replicación de la divulgación (RRCR). Esto se puede hacer con promotores que son regulables por hormonas o citocinas. Por ejemplo, en aplicaciones terapéuticas en donde la indicación es un tejido gonadal donde se producen o enrután esteroides específicos, el uso de promotores regulados por andrógenos o estrógenos puede ser ventajoso. Dichos promotores que son regulables por hormonas incluyen MMTV, MT-1, ecdisona y RuBisco. Se pueden utilizar otros promotores regulados por hormonas tales como los que responden a hormonas tiroideas, pituitarias y adrenales. Los promotores que responden a citocinas y proteínas inflamatorias que se pueden utilizar incluyen quinínógeno K y T (Kageyama et al., 1987), c-fos, TNF-alfa, proteína C-reactiva (Arcone et al., 1988), haptoglobina (Oliviero et al., 1987), seroamiloide A2, C/EBP alfa, IL-1, IL-6 (Poli y Cortese, 1989), Complemento C3 (Wilson et al., 1990), IL-8, alfa-1 glicoproteína ácida (Prowse y Baumann, 1988), alfa-1 antitripsina, lipoproteína lipasa (Zechner et al., 1988), angiotensinógeno (Ron et al., 1990), fibrinógeno, c-jun (inducibles por ésteres de forbol, TNF-alfa, radiación UV, ácido retinoico y peróxido de hidrógeno), collagenasa (inducida por ésteres de forbol y ácido retinoico), metalotioneína (inducible por metales pesados y glucocorticoides), estromelina (inducible por éster de forbol, interleucina-1 y EGF), alfa-2 macroglobulina y alfa-1 antiqumiotripsina. Promotores específicos de tumor tales como osteocalcina, elemento que responde a hipoxia (HRE), MAGE-4, CEA, alfa-fetoproteína, GRP78/BiP y tirosinasa también se pueden utilizar para regular la expresión genética en células tumorales.

Además, esta lista de promotores no se debería considerar como exhaustiva o limitantes, los expertos en la técnica conocerán otros promotores que se pueden utilizar en conjunción con los promotores y métodos desvelados en el presente documento.

TABLA 1 PROMOTORES ESPECÍFICOS DE TEJIDO

Tejido	Promotor
Páncreas	Insulina Elastina Amilasa pdr-1 pdx-1 glucocinasa
Hígado	Albúmina PEPCK HBV amplificador α fetoproteína apolipoproteína C α -1 antitripsina vitelogenina, NF-AB Transtiretina
Músculo esquelético	Miosina cadena H creatina cinasa muscular Distrofina Calpaína p94 troponina 1 rápida alfa-actina
Piel	Queratina K6 Queratina K1
Pulmón	CFTR citoqueratina humana 18 (K18) proteínas surfactantes pulmonares A, B y C CC-10 P1
Músculo liso	sm22 α SM-alfa-actina
Endotelio	Endotelina-1 E-selectina factor de von Willebrand TIE (Korhonen et al., 1995) KDR/flk-1 Melanocitos Tirosinasa
Tejido adiposo	Lipoproteína lipasa (Zechner <i>et al.</i> , 1988) Adipsina (Spiegelman et al., 1989) acetil-CoA carboxilasa (Pape y Kim, 1989) glicerofosfato deshidrogenasa (Dani <i>et al.</i> , 1989) adipocito P2 (Hunt <i>et al.</i> , 1986)
Mama	Proteína ácida de Whey (WAP) (Andres et al. PNAS 84:1299-1303 1987)
Sangre	(β -globina)

Se entenderá adicionalmente que ciertos promotores, mientras no tiene la actividad restringida a un único tipo de tejido, puede no obstante presentar selectividad en que pueden ser activos en un grupo de tejidos, y menos eficaces o silentes en otro grupo. Dichos promotores se denominan también “específicos de tejido”, y se contemplan para su uso con la divulgación. Por ejemplo, los promotores que son activos en una variedad de neuronas del sistema nervioso central (SNC) pueden ser terapéuticamente útiles en la protección contra el daño debido a ictus, que puede tener efecto en cualquiera de diferentes regiones del cerebro. En consecuencia, los elementos reguladores

específicos de tejido utilizados en la divulgación tienen aplicabilidad para la regulación de las proteínas heterólogas, así como aplicabilidad como una secuencia de polinucleótido dirigida en los presentes vectores retrovíricos.

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

La divulgación proporciona una construcción de polinucleótido que comprende de 5' a 3': una región promotora o reguladora útil para iniciar la transcripción; una señal psi empaquetada; una secuencia de ácido nucleico que codifica gag, una secuencia de ácido nucleico que codifica pol; y una secuencia de ácido nucleico que codifica env; un sitio interno de entrada en el ribosoma; un polinucleótido heterólogo que codifica un marcador, polipéptido terapéutico o diagnóstico; y una secuencia de ácido nucleico LTR. Como se describe en otra parte del presente documento y a continuación los distintos segmentos de la construcción de polinucleótido de la divulgación (por ejemplo, un polinucleótido retrovílico recombinante competente en replicación) están modificados dependiendo en parte de la célula huésped deseada, el tiempo de expresión o la cantidad, y el polinucleótido heterólogo. Una construcción retrovímica competente en replicación de la divulgación se puede dividir en varios dominios que se pueden modificar individualmente por los expertos en la técnica.

Por ejemplo, el promotor puede comprender un promotor CMV que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 119, 20 o 22 del nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 582 y puede incluir una modificación en una o más (por ejemplo, 2-5, 5-10, 10-20, 20-30, 30-50, 50-100 o más bases de ácido nucleico) a condición de que el promotor modificado sea capaz de dirigir e iniciar la transcripción. En un aspecto de la divulgación, la región promotora o reguladora comprende un dominio CMV-R-U5 de polinucleótido. El dominio CMV-R-U5 comprende el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano de la región R-U5 de MLV. En un aspecto de la divulgación, el dominio CMV-R-U5 del polinucleótido comprende una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 1 a aproximadamente el nucleótido 1202 o las secuencias que son al menos un 95 % idénticas a una secuencia que se expone en las SEQ ID NO: 19, 20 o 22 donde el polinucleótido promueve la transcripción de una molécula de ácido nucleico unida operativamente al mismo. El dominio gag del polinucleótido puede derivarse de cualquier número de retrovirus pero normalmente se derivarán de oncorretrovirus y más particularmente de oncorretrovirus de mamífero. En un aspecto de la divulgación el dominio gag comprende una secuencia de aproximadamente el nucleótido número 1203 a aproximadamente 2819 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeando a la décima más próxima) de identidad con la misma. El dominio pol del polinucleótido se puede derivar de cualquier número de retrovirus, pero normalmente se derivará de un oncorretrovirus y más particularmente de un oncorretrovirus de mamífero. En un aspecto de la divulgación el dominio pol comprende una secuencia de aproximadamente el nucleótido número 2820 a aproximadamente el nucleótido 6358 o una secuencia que tenga al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeando a la décima más próxima) de identidad con la misma. El dominio env del polinucleótido puede derivarse de cualquier número de retrovirus pero se derivarán normalmente de un oncorretrovirus o retrovirus gamma y más particularmente de un oncorretrovirus de mamífero o un retrovirus gamma. En algunos aspectos de la divulgación el dominio codificante de env comprende un dominio env anfotrópico. En un aspecto de la divulgación el dominio env comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 6359 a aproximadamente el nucleótido 8323 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,8 % (redondeando a la décima más próxima) de identidad con la misma. El dominio IRES comprende una secuencia desde aproximadamente el nucleótido número 8327a aproximadamente el nucleótido 8876 o una secuencia que tiene al menos un 95 %, 98 %, o 99 % (redondeado a la décima más próxima) de identidad con la misma a condición de que el dominio permita la entrada de un ribosoma. El dominio heterólogo puede comprender una citosina desaminasa de la divulgación. En un aspecto de la divulgación, el polinucleótido de la CD comprende una secuencia con el codón humano optimizado. En otro aspecto más de la divulgación, el polinucleótido de CD codifica un polipéptido mutante que tiene una citosina desaminasa, donde las mutaciones confieren una estabilización térmica aumentada que aumenta la temperatura de fusión (Tm) unos 10 °C permitiendo sostener la actividad cinética sobre un intervalo de temperatura más amplio y un aumento de los niveles acumulados de proteína. En un aspecto de la divulgación, la citosina desaminasa comprende una secuencia que se exponen en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido número 8877 a aproximadamente 9353. El dominio heterólogo puede estar seguido por un dominio rico en polipurina. La LTR 3' puede derivarse de cualquier número de retrovirus, normalmente un oncorretrovirus y preferentemente un oncorretrovirus de mamífero. En un aspecto de la divulgación, la LTR 3' comprenden el dominio U3-R-U5. En otro aspecto más de la divulgación la LTR comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 19 o 22 desde aproximadamente el nucleótido 9405 a aproximadamente 9998 o una secuencia que es al menos un 95 %, 98 %, 99 % o 99,5 % (redondeando a la décima más próxima) idéntica a la misma.

La divulgación también proporciona un vector retrovílico recombinante que comprende de 5' a 3' CMV-R-U5, una fusión del promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano con la región R-U5 de MLV; un PBS, sitio de unión al cebador para la transcriptasa inversa; un sitio de corte y empalme 5'; una señal de empaquetamiento ψ ; un gag, ORF para el antígeno específico de MLV; un pol, ORF para polimerasa poliproteica de MLV; un sitio de corte y empalme 3', un env 4070, ORF para la proteína de envoltura de la cepa 4070A del MLV; un IRES, sitio interno de entrada al ribosoma del virus de encefalomiocarditis; una citosina desaminasa modificada (termoestabilizada y

optimizado el codón); un PPT; tracto polipurina; y un U3-R-U5, repetición terminal larga de MLV. Esta estructura se representa adicionalmente en la Figura 3.

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

Los vectores retrovíticos se pueden utilizar para tratar un amplio intervalo de enfermedades y trastornos incluyendo varias enfermedades y trastornos proliferativos celulares (véase, por ejemplo, las Pat. de EE. UU. N.º 4.405.712 y 4.650.764; Friedmann, 1989, Science, 244:1275-1281; Mulligan, 1993, Science, 260:926-932, R. Crystal, 1995, Science 270:404-410; véase también, The Development of Human Gene Therapy, Theodore Friedmann, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999. ISBN 0-87969-528-5.

La divulgación también proporciona una terapia genética para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares. Dicha terapia conseguirá su efecto terapéutico mediante la introducción de un polinucleótido terapéutico apropiado (por ejemplo, ribozimas antisentido, ribozimas, genes suicidas, ARNip), en células del sujeto que tiene un trastorno proliferativo. El suministro de construcciones de polinucleótido se puede conseguir utilizando el vector retrovítico recombinante de la divulgación, particularmente si se basan en MLV, que será capaz de infectar células en división.

Además, los métodos terapéuticos de la invención (por ejemplo, la terapia genética o métodos de suministro genético) como se describe en el presente documento se puede llevar a cabo *in vivo* o *ex vivo*. Puede ser preferible retirar la mayoría de un tumor antes de la terapia genética, por ejemplo, quirúrgicamente o por radiación. En algunos aspectos, la terapia retrovítica puede estar precedida o seguida por cirugía, quimioterapia o radioterapia.

Por lo tanto, la divulgación proporciona un retrovirus recombinante capaz de infectar una célula que no está en división, una célula en división o una célula neoplásica, en el que el retrovirus recombinante comprende un GAG vírico; un POL vírico; un ENV vírico; un ácido nucleico heterólogo unido operativamente a un IRES; y secuencias de ácido nucleico cis-actuantes necesarias para el empaquetamiento, la transcripción inversa y la interacción. El retrovirus recombinante puede ser un lentivirus, tal como VIH, o puede ser un oncovirus. Como se ha descrito anteriormente para el método de producción de un retrovirus recombinante, el retrovirus recombinante de la divulgación puede adicionalmente incluir al menos una de entre las proteínas VPR, VIF, NEF, VPX, TAT, REV, y VPU. Aunque sin querer estar ligado por alguna teoría en particular, se creía que uno o más de estos genes /productos proteicos son importantes para aumentar el título vírico del retrovirus recombinante producido (por ejemplo, NEF) o puede ser necesario para la infección y empaquetamiento del virión.

La divulgación también proporciona un método de transferencia de ácido nucleico a una célula diana para proporcionar la expresión de un ácido nucleico en particular (por ejemplo, una secuencia heteróloga). Por lo tanto, en otro aspecto, la divulgación proporciona un método para la introducción y expresión de un ácido nucleico en una célula diana que comprende infectar la célula diana con el virus recombinante de la divulgación y expresar el ácido nucleico heterólogo en la célula diana. Como se ha mencionado anteriormente, la célula diana puede ser cualquier tipo de célula incluyendo en división, no en división, neoplásica, immortalizada, modificada y otros tipos celulares reconocidos por los expertos en la técnica, a condición de que sean capaces de la infección por un retrovirus.

Puede ser deseable modular la expresión de un gen en una célula mediante la introducción de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico heteróloga) mediante el método de la divulgación, donde la secuencia de ácido nucleico da lugar, por ejemplo, a una molécula antisentido o ribozima. El término "modular" se refiere la supresión de la expresión de un gen cuando está sobre-expresado, o el aumento de la expresión cuando está bajo-expresado. Cuando se asocia un trastorno proliferativo con la expresión de un gen, se pueden utilizar secuencias de ácido nucleico que interfieren con la expresión del gen a nivel de la traducción. Esta estrategia utiliza, por ejemplo, un ácido nucleico antisentido, ribozimas, o agentes triples para bloquear la transcripción o traducción de un ARNm específico, sea enmascarando el ARNm con un ácido nucleico antisentido o agente triple o escindiéndolo con una ribozima.

Puede ser deseable transferir un ácido nucleico que codifica un modificador de la respuesta biológica (por ejemplo, una citocina) en una célula de un sujeto. En esta categoría están incluidos los agentes inmunopotenciadores incluyendo los ácidos nucleicos que codifican varias de las citocinas clasificadas como "interleucinas". Estas incluyen, por ejemplo, las interleucinas de 1 a 15, así como otros modificadores de la respuesta y factores descritos en otra parte del presente documento. También se incluyen en esa categoría, aunque no trabajando necesariamente de acuerdo con los mismos mecanismo, los interferones, y en particular el interferón gamma, el factor de necrosis tumoral (TNF) y el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). Otros polipéptidos incluyen, por ejemplo, factores angiogénicos y factores anti-angiogénicos. Puede ser deseable suministrar dichos ácidos nucleicos a las células de la médula ósea o los macrófagos para tratar deficiencias enzimáticas o defectos inmunitarios. También se pueden introducir ácidos nucleicos que codifican factores de crecimiento, péptidos tóxicos, ligandos, receptores. U otras proteínas fisiológicamente importantes en las células diana específicas.

La divulgación se puede utilizar para suministrar polinucleótidos heterólogos que promueven y efectúan el direccionamiento de fármacos específico. Por ejemplo, el HER2 (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 23 y 24), un

miembro de la familia de receptores EGF, es la diana para la unión del fármaco trastuzumab (Herceptin™, Genentech). El trastuzumab es un mediador de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). La actividad se dirige preferentemente a las células que expresan HER2 con niveles de sobre-expresión de 2+ o 3+ mediante inmunohistoquímica más que células que expresan 1+ o no expresan (Herceptin prescribing information, Crommelin 2002). El aumento de la expresión de HER2 por la introducción de un vector que expresa HER2 que expresa solo los dominios extracelular y transmembrana) en tumores con HER2 bajo puede facilitar el desencadenamiento de ADCC óptimo y superar rápidamente el desarrollo de resistencia a HER2 que se observa en el uso clínico.

La sustitución de γ CD2 (que comprende la SEQ ID NO: 19 desde aproximadamente 8877 a 9353) para el dominio intracelular de HER2 permite la expresión en superficie de HER2 y la localización en el citosol de γ CD2. El dominio extracelular (ECD) y dominio transmembrana (TM) de HER2 (aproximadamente a 2026 desde aproximadamente la posición 175 a 2200 de la SEQ ID NO: 23) puede amplificarse por PCR (Yamamoto et al., Nature 319:230-234, 1986; Chen et al., Canc. Res., 58:1965-1971, 1998) o sintetizarse químicamente (BioBasic Inc., Markham, Ontario, Canadá) e insertarse entre el IRES y el gen γ CD2 en el vector pAC3- γ CD2 SEQ ID NO: 19 (por ejemplo, entre aproximadamente el nucleótido 8876 y 8877 de la SEQ ID NO: 18). De manera alternativa el gen de γ CD se puede escindir y sustituirse con un polinucleótido que codifica un polipéptido HER2 o un fragmento del mismo. Un HER2 truncado adicionalmente con solo el dominio IV de unión a la Herceptina de los dominios ECD y TM (aproximadamente a 290 pb de la posición 1910 a 2200) se puede amplificar o sintetizar químicamente y utilizarlo como anteriormente (Landgraf 2007; Garrett et al., J. of Immunol., 178:7120-7131, 2007). Una modificación adicional de esta forma truncada con el péptido de señal nativo (aproximadamente a 96 pb de la posición 175-237) fusionada con el dominio IV de la TM puede sintetizarse químicamente y utilizarse como anteriormente. Los virus resultantes se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FU.

De manera alternativa, el HER2 y las modificaciones descritas anteriormente se pueden expresar en un vector separado que contenga un gen ENV diferentes u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente en replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral de "primera generación" no replicante que codifique la envoltura y el gen de interés (Emi et al. J.Virol 65:1202 1991). En este último caso la infección vírica preexistente proporcionará gag y pol complementarios para permitir la diseminación infecciosa del vector "no replicante" desde cualquier célula infectada previamente. ENV y glicoproteínas alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo, las secuencias ENV de la cepa NZB de MLV y las glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum et al., Mol. Therapy, 13(6):1050-1063, 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia en la que los genes de GAG, POL y γ CD2 de la SEQ ID NO: 19 se hayan eliminado, el ENV se corresponde con un dominio ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como de RSV está unido operativamente directamente a HER2, HER2 ECDTM, HER2 ECDIVTM, o HER2 SECDIVTM.

La infección mixta de células por un virus VSVG pseudotipado y un retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de una progenie de viriones que albergan el genoma de un virus encapsidado por las proteínas de la envoltura del otro. Lo mismo pasa para otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección derivada anteriormente da como resultado la producción de una progenie de viriones capaz de codificar γ CD2 y HER2 (o una variante) en células infectadas. Los virus resultantes se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FU.

Recientemente, un retrovirus gamma XMRV, se ha asociado con el cáncer de próstata en seres humanos mostrando el virus una fuerte preferencia para la replicación en el tejido prostático (R.Schlaberg et al. PNAS106: 16351-16356 2009). El virus parece ser muy similar al MLV demasiado xenotrópico. En un aspecto de la presente divulgación, los vectores retrovirales no replicantes se proporcionan teniendo dos genes terapéuticos (citosina desaminasa, timidina cinasa, otros genes activantes de profármacos, interferones, IL-2, IL-12, otras citocinas, otros anti-oncogenes p53, miARN anticáncer o similares) y un gen de envoltura que es capaz de complementarse con las funciones del gag y gag pol de XMRV tal como una envoltura anfotrópica, una envoltura de GALV, una envoltura proteica de VSVg, u otras envolturas conocidas por los expertos en la técnica. El polinucleótido del vector no replicante se suministra en el cáncer de próstata de un paciente o animal como una molécula de ADN o ARN utilizando uno de: sistemas de suministro físico o no vírico; un sistema de suministro vírico heterólogo tal como un vector adenovírico, o como una partícula retroviral fabricada. Una vez que se suministra el vector no replicante se diseminará por complementación mediante XMRV y la infección a las células vecinas tendrá lugar hasta que se alcance el límite de la infección por XMRV, cuando la complementación con el XMRV no esté disponible. El gen terapéutico puede entonces tener este efecto (por ejemplo, después de administrarse un profármaco) solo en el área infectada por el XMRV. El mismo efecto de rescate se puede conseguir utilizando un vector retroviral replicante de la presente divulgación. Esta estrategia (vector no replicante complementario con un gen terapéutico) se puede utilizar con cualquier enfermedad retroviral (infección por VIH, infección por HTLV1, otros retrovirus asociados al cáncer), o con cualquier enfermedad vírica o asociada con virus (infección por HPV, y expresión de E6 y E7 de HPV en cánceres del cuello uterino, linfomas o carcinomas asociados con EBV, etc.).

Otro aspecto del desarrollo de resistencia al trastuzumab se refiere a la interferencia con la señalización intracelular necesaria para la actividad del trastuzumab. Las células resistentes muestran pérdida de PTEN y una expresión más baja de p27kip1 [Fujita, Brit J. Cancer, 94:247, 2006; Lu et al., Journal of the National Cancer Institute, 93(24): 1852-1857, 2001; Kute et al., Cytometry Part A 57A:86-93, 2004]. Por ejemplo, se puede generar de manera recombinante o sintetizar químicamente un polinucleótido que codifica PTEN (SEQ ID NO: 25) (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse operativamente directamente después del polinucleótido de γ CD2 en el vector pAC3- γ CD2 de SEQ ID NO: 19 o 22, o con una secuencia enlazadora como se ha descrito anteriormente o como una sustitución de γ CD2. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica PTEN se puede sintetizar como anteriormente e insertarse entre las secuencias del IRES y γ CD2 o con un enlazador como se ha descrito anteriormente.

De manera alternativa, se puede expresar el PTEN en un vector diferente que contienen un gen ENV diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente en replicación (Logg et al. J.Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral de "primera generación" no replicante que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al., J.Virol 65:1202 1991). En este último caso la infección vírica preexistente proporcionara el gag y pol complementarios para permitir la diseminación infecciosa del vector "no replicante" a partir de cualquier célula infectada previamente. Las glicoproteínas y ENV alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo, secuencias de ENV de la cepa NZB del MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu, Rev Med Virol. 2000, Baum, Mol. Ther. 13(6):1050-1063, 2006). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia en la que los genes GAG y Pol y el γ CD2 de la SEQ ID NO: 19 se han eliminado, el ENV correspondiente a un dominio ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como de RSV están unidos operativamente directamente al PTEN.

La infección mixta de células por el virus VSVG pseudotipado y un retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de una progenie de viriones que tiene el genoma de un virus encapsidado por proteínas de la envoltura del otro [Emi, 1991]. Lo mismo pasa con otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivada como anteriormente da como resultado la producción de una progenie de viriones capaz de codificar γ CD2 y PTEN (o una variante) o solo el PTEN en las células infectadas. Los virus resultantes se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

De manera similar, se puede sintetizar químicamente un polinucleótido que codifica p27Kipl (SEQ ID NO: 27 y 28) (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse operativamente directamente después del gen γ CD2 en el vector pAC3- γ CD2 SEQ ID NO: 19 o con una secuencia enlazadora. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica el p27Kipl se puede sintetizar como anteriormente e insertarse entre las secuencias del IRES y el γ CD2 o con un enlazador como se ha descrito anteriormente o en lugar del gen γ CD2.

De manera alternativa, se puede expresar el p27kipl en un vector diferente que contienen un gen ENV diferente u otra proteína de superficie apropiada. Este vector puede ser competente en replicación (CR. Logg et al. J. Mol Biol. 369:1214 2007) o un vector retroviral de "primera generación" no replicante que codifica la envoltura y el gen de interés (Emi et al., J. Virol 65:1202 1991). En este último caso la infección vírica preexistente proporcionara el gag y pol complementarios para permitir la diseminación infecciosa del vector "no replicante" a partir de cualquier célula infectada previamente. Las glicoproteínas y ENV alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo, secuencias de ENV de la cepa NZB del MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus (Palu 2000, Baum 2006, *supra*). Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia en la que los genes GAG y Pol y el γ CD2 de la SEQ ID NO: 19 se han eliminado, el ENV correspondiente a un dominio ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como de RSV están unidos operativamente directamente al p27kipl.

La infección mixta de células por el virus VSVG pseudotipado y un retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de una progenie de viriones que tiene el genoma de un virus encapsidado por proteínas de la envoltura del otro [Emi, 1991]. Lo mismo pasa con otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivada como anteriormente a partir de ambas SEQ ID NO: 19 y 22 da como resultado la producción de una progenie de viriones capaz de codificar γ CD2 y p27kipl (o una variante) en las células infectadas. Los virus resultantes se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC.

En otro ejemplo, el CD20 es la diana de unión del fármaco rituximab (Rituxan™, Genentech). El rituximab es un mediador de la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y ADCC. Las células con una intensidad media de fluorescencia mayor por citometría de flujo presentan un aumento de sensibilidad al rituximab (van Meerten et al., Clin Cancer Res 2006; 12(13):4027-4035, 2006). El aumento de la expresión de CD20 por la introducción de un vector que expresa CD20 en las células B con CD20 bajo puede facilitar que se desencadene la ADCC óptimamente.

Por ejemplo, se puede sintetizar químicamente un polinucleótido que codifica CD20 (SEQ ID NO: 29 y 30) (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse operativamente directamente después del polinucleótido de γ CD2 en el vector pAC3- γ CD2(-2) de SEQ ID NO: 19 o 22, con una secuencia enlazadora como se ha descrito anteriormente o como

una sustitución del gen γ CD2. En un ejemplo adicional, el polinucleótido que codifica CD20 se puede sintetizar como anteriormente e insertarse entre las secuencias del IRES y γ CD2 o con un enlazador como se ha descrito anteriormente. Como alternativa adicional la secuencia de CD20 se puede insertar en el vector pAC3- γ CD2 después de la escisión del gen CD por digestión con Ψ 1 y Not1.

En un ejemplo adicional más, se puede sintetizar químicamente un polinucleótido que codifica el CD20 (SEQ ID NO:29 y 30) (BioBasic Inc., Markham, Canadá) e insertarse en un vector que comprende un gen ENV no afotrópico u otra proteína de superficie apropiada (Tedder et al., PNAS, 85:208-212, 1988). Las glicoproteínas y ENV alternativas incluyen ENV y glicoproteínas xenotrópicas y politrópicas capaces de infectar células humanas, por ejemplo, secuencias de ENV de la cepa NZB del MLV y glicoproteínas de MCF, VSV, GALV y otros virus [Palu 2000, Baum 2006]. Por ejemplo, un polinucleótido puede comprender una secuencia en la que los genes GAG y POL y el γ CD2 de la SEQ ID NO: 19 se han eliminado, el ENV correspondiente a un dominio ENV xenotrópico de NZB MLV o VSV-g, y el IRES o un promotor tal como de RSV están unidos operativamente directamente al CD20.

La infección mixta de células por el virus VSVG pseudotipado y un retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de una progenie de viriones que tiene el genoma de un virus encapsidado por proteínas de la envoltura del otro [Emi, 1991]. Lo mismo pasa con otras envolturas que pseudotipan partículas retrovíricas. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivada como anteriormente a partir de ambas SEQ ID NO: 19 y 22 da como resultado la producción de una progenie de viriones capaz de codificar γ CD2 y CD20 (o una variante) en las células infectadas. Los virus resultantes se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con trastuzumab o trastuzumab y 5-FC. De manera similar, la infección de un tumor con un vector que codifica solo el marcador CD20 puede hacer el tumor tratable con el uso de Rituxan.

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

Para aumentar adicionalmente la estabilidad genética (véase, por ejemplo, la Figura 5) de vectores que contienen γ CD2/PAE el gen que codifica la enzima puede sintetizarse químicamente con mutaciones aleatorias a lo largo de la secuencia. Estas mutaciones pueden ser esencialmente aleatorias o pueden consistir en mutaciones solo en la posición oscilante para cada aminoácido. La biblioteca de las secuencias mutadas se inserta corriente abajo o en lugar del gen γ CD2 como se había descrito anteriormente para la SEQ ID NO: 11 y 13 para crear una biblioteca de plásmidos, que entonces se puede utilizar para generar una biblioteca de partículas infecciosas por transfección transitoria en células 293T o equivalentes. Las células sensibles se pueden infectar con retrovirus que codifican el polipéptido de fusión y se somete a selección con químicos apropiados.

El barajado de ADN o "cría molecular" permite que la información genética se entremezcle, dando lugar a recombinantes con las propiedades deseadas. Se han mejorado diferentes enzimas y proteínas utilizando barajado de ADN (Stemmer 1994 Proc Natl Acad Sci USA 91(22): 10747-51; Stemmer 1994 Nature 370 (6488):389-91). La recombinación genética es una fuerza principal que dirige la evolución de muchos virus. La recombinación en retrovirus entre dos genomas retrovíricos co-empaquetados se puede producir a tasas de hasta el 40 % por ciclo de replicación. Las altas tasas de recombinación en cada ciclo de replicación hacen posible que la información genética se entremezcle rápidamente, dando lugar a recombinantes con nuevos patrones de mutaciones y fenotipos en un periodo de tiempo corto. Por ejemplo, la cría molecular de retrovirus que contienen una biblioteca de secuencias de envoltura ecotrópicas recombinantes de seis virus de leucemia murina daba como resultado un clon vírico con un nuevo tropismo. Utilizando el mismo método, se seleccionaron varios clones víricos con una estabilidad y rendimientos de procesamiento mejorados (Soong et al., 2000 Nat Genet 25(4):436-9; Powell et al., 2000 Nat Biotechnol 18(12):1279-82).

La secuencia de polinucleótido incorporado en la presente divulgación a veces es inestable dando lugar a la eliminación de la secuencia de polinucleótido del genoma vírico con el tiempo. La base de esto no se entiende bien, pero es claramente dependiente de la secuencia. La cría molecular utilizando la presente divulgación para seleccionar clones víricos recombinantes que han adquirido recombinaciones óptimas en la secuencia de polinucleótido heterólogo se emplea para seleccionar clones víricos que tienen una mayor estabilidad de vector.

Por ejemplo, la secuencia codificante de HSV-TK (SEQ ID NO: 37) no es tan estable como se desea en algunas situaciones. La cría molecular de vectores retrovíricos recombinantes engloba un agrupamiento de secuencias codificantes degeneradas de HSV-TK se lleva a cabo para seleccionar vectores recombinantes que tienen una mayor estabilidad de vector. Se sintetizó químicamente la timidina cinasa (TK) del herpes mutagenizada aleatoriamente (Bio Basic Inc, Markham, Canadá). La secuencia sintética se inserta aa 3' de la secuencia γ CD2 en la SEQ ID NO: 19, o por sí misma en el armazón del vector pAC3- γ CD2 después de la escisión del gen CD2. La mezcla de vector retrovírico se empaqueta como se ha descrito previamente. Las células LMTK de fibroblastos de

ratón o las 143Tk humanas se infectan con el vector y se seleccionan en cuanto a la actividad TK en medio HAT (Hiller et al., Mol. Cell Biol. 8(8):3298-3302, 1988). El pasaje en serie de los sobrenadantes de células resistentes al medio reciente HAT, de nuevo con células LMTK/143Tk seleccionadas, da como resultado la selección de vectores estables que expresan TK. Las células resistentes TK+ se pueden aislar y rescatarse las secuencias de TK mediante técnicas basadas en PCR convencional para el análisis de mutación (Cowell et al., CDNA Library Protocols, publicado por Humana Press, 1996). De esta manera, se seleccionan las secuencias tanto por expresión de la proteína funcional como de la estabilidad genómica de la construcción del vector retroviral. Se pueden emplear estrategias similares para UPRT (SEQ ID NO: 11, 13), OPRT (SEQ ID NO: 15, 17) (Olah et al., Cancer Res. 40:2869-2875, 1980; y Suttle, Somatic Cell & Mol. Genet., 15(5):435-443, 1989) y otros genes de interés. Además, la estrategia de pasajes en serie se puede utilizar para no indicadores genéticos y el ADN genómico después del pasaje en serie se explora en cuanto a inserciones de longitud completa por PCR a través del gen de la inserción IRES (véase la Fig. 5). Las inserciones de longitud completa pueden purificarse y clonarse de nuevo en el vector vírico y entonces se vuelven a ensayar. Se pueden llevar a cabo varios ciclos de este procedimiento para seleccionar el gen más estable. Esta estrategia también se puede utilizar para el pasaje en animales con o sin tumores, e incluso en tejidos del paciente.

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

La infección mixta de células por el virus VSV-g pseudotipado y un retrovirus anfotrópico da como resultado la producción de una progenie de viriones que tiene el genoma de un virus encapsidado por proteínas de la envoltura del otro (Emi et al., J. Virol. 65:1202, 1991). Lo mismo pasa con otras envolturas que pseudotipan partículas retrovirales. Por ejemplo, la infección por retrovirus derivada como anteriormente a partir de ambas SEQ ID NO: 19 y 22 da como resultado la producción de una progenie de viriones capaz de codificar γCD2 y OPRT en las células infectadas. Los virus resultantes se pueden utilizar para tratar un trastorno proliferativo celular en un sujeto en combinación con 5-FC.

El retrovirus recombinante de la divulgación se puede utilizar para el tratamiento de un trastorno neuronal, por ejemplo, puede contener opcionalmente un gen exógeno, por ejemplo, un gen que codifica un receptor o un gen que codifica un ligando. Dichos receptores incluyen receptores que responden a la dopamina, GABA, adrenalina, noradrenalina, serotonina, glutamato, acetilcolina y otros neuropéptidos, como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de ligandos que pueden proporcionar un efecto terapéutico en un trastorno neuronal incluyen dopamina, adrenalina, noradrenalina, ácido gamma-aminobutírico y serotonina. La difusión y captación de un ligando necesario después de la secuencia por una célula donante infectada sería beneficioso en un trastorno en el que la célula neural del sujeto es deficiente en la producción de dicho producto genético. Una célula genéticamente modificada para secretar un factor neurotrófico tal como el factor de crecimiento de nervios, (NGF), puede utilizarse para evitar la degeneración de neuronas colinérgicas que pueden de otra manera morir sin tratamiento.

De manera alternativa, las células se injertan en un sujeto con un trastorno de los ganglios basales, tal como la enfermedad de Parkinson, se pueden modificar para que contengan un gen exógeno que codifique L-DOPA, el precursor de dopamina. La enfermedad de Parkinson se caracteriza por una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro medio, que tiene los ganglios basales como su órgano diana principal.

Otros trastornos neuronales que ese pueden tratar de manera similar por el método de la divulgación incluyen la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, un daño neuronal debido a ictus y daño en la médula espinal. La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la degeneración de las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal. Los neurotransmisores para estas neuronas son acetilcolina, que es necesario para su supervivencia. El injerto de célula colinérgica infectada con un retrovirus recombinante de la divulgación que contienen un gen exógeno par un factor que promovería la supervivencia de esas neuronas puede conseguirse por el método de la divulgación, como se ha descrito. Después de un ictus, existe una pérdida selectiva de celular en el CA1 del hipocampo, así como la pérdida cortical celular que puede subyacer en la pérdida de función cognitiva y memoria en estos pacientes. Una vez que se identifican, las moléculas responsables de la muerte celular de CA1 se puede inhibir por los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, secuencias antisentido, o se puede transferir un gen que codifica un antagonista a una célula neuronal y se implanta en la región del hipocampo del cerebro.

Para las enfermedades debidas a deficiencia de un producto proteico, la transferencia genética podría introducir un gen normal en los tejidos afectados para una terapia de remplazo, así como para crear modelos animales para la

enfermedad utilizando mutaciones antisentido. Por ejemplo, puede ser deseable insertar un Factor IX que codifica un ácido nucleico en un retrovirus para la infección de una célula muscular o hepática.

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

Existen en el mercado actualmente varios agentes quimioterápicos que tienen grados variables de éxito desde la remisión completa a la remisión temporal y prolongación de la vida con recurrencias esperadas. Algunos agentes terapéuticos del mercado se dirigen a las propiedades angiogénicas vasculares del tumor. La composición se dirige a la angiogénesis de los tumores buscando reducir el suministro de sangre y nutrientes al tumor o cáncer y de esta manera reducir el tumor y prolongar la vida del sujeto. El VEGF es un factor angiogénico conocido por tener un papel en el crecimiento tumoral. Por lo tanto, se han desarrollado antagonistas del VEGF como agentes anticáncer.

El VEGF humano media en la neoangiogénesis en el sistema vascular normal y maligno; se sobre-expresa en la mayoría de las enfermedades malignas y sus altos niveles se correlacionan con un mayor riesgo de metástasis y peor pronóstico muchas veces. Cuando el VEGF interactúa con su receptor en modelos *in vitro* de angiogénesis, proliferación de células endoteliales y formación de nuevos vasos sanguíneos. En los modelos animales, el VEGF ha demostrado que induce la migración/proliferación celular-endotelial vascular, mantiene la supervivencia de vasos sanguíneos recién formados, y aumenta la permeabilidad vascular.

Un agente antagonista es el que se dirige o regula negativamente la señalización de la ruta de VEGF. Ejemplo incluyen los inhibidores del VEGF (por ejemplo agentes que inhiben directamente el VEGF (por ejemplo VEGF-A, B, C, o D), tal como por unión con el VEGF (por ejemplo, anticuerpos anti-VEGF tales como el bevacizumab (AVASTIN®) o ranibizumab (LUCENTIS®), u otros inhibidores tales como pegaptanib, NEOVASTAT®, AE-941, VEGF Trap, y PI-88)), moduladores de la expresión de VEGF (por ejemplo, INGN-241, oral tetratiomolibdato, 2-metoxiestradiol, dispersión de 2-metoxiestradiol nanocristalino, bevasiranib sódico, PTC-299, Veglin), inhibidores de un receptor de VEGF (por ejemplo, el receptor III de VEGF o KDR (Flt4), por ejemplo anticuerpo anti-KDR, anticuerpo VEGFR2 tal como CDP-791, IMC-1121B, bloqueadores del VEGFR2 tales como CT-322), moduladores de la expresión de VEGFR (por ejemplo, modulador de la expresión de VEGFR1 Sinfa-027) o inhibidores de la señalización del receptor de VEGF corriente abajo. En algunos aspectos, se describe en el presente documento, que el agente antagonista del VEGF es bevacizumab, pegaptanib, ranibizumab, sorafenib, sunitinib, AE-941, VEGF Trap, pazopanib, vandetanib, vatalanib, cediranib, fenretinida, escualamina, INGN-241, oral tetratiomolibdato, tetratiomolibdato, Panzem NCD, 2-metoxiestradiol, AEE-788, AG-013958, bevasiranib sódico, AMG-706, axitinib, BIBF-1120, CDP-791, CP-547632, PI-88, SU-14813, SU-6668, XL-647, XL-999, IMC-1121B, ABT-869, BAY-57-9352, BAY-73-4506, BMS-582664, CEP-7055, CHIR-265, CT-322, CX-3542, E-7080, ENMD-1198, OSI-930, PTC-299, Sirna-027, TKI-258, Veglin, XL-184, o ZK-304709.

El Bevacizumab (AVASTATIN®) (rhuMAB-VEGF) (anticuerpo monoclonal anti-VEGF) es un anticuerpo monoclonal recombinante quimérico humano/murino dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)). Se prepara modificando restos de unión al VEGF de un anticuerpo monoclonal anti-VEGF murino en las regiones marco conservadas de una inmunoglobulina G1 humana (IgG1) (Prod Info Avastin, 2004). Solamente el 7 % de la secuencia de aminoácidos se deriva del anticuerpo murino, con un 93 % de la IgG1. El bevacizumab se une y neutraliza toda forma de VEGF humano mediante el reconocimiento de los sitios de unión de los dos tipos de receptor de VEGF humano (flt-1 y flk-1). En modelos animales, el anticuerpo ha demostrado que estabiliza los tumores establecidos o suprime el crecimiento tumoral inhibiendo la angiogénesis inducida por el VEGF.

La farmacocinética del bevacizumab es lineal después de dosis de 0,3 mg/kg o mayores (Anon, 2002). Después de 990 minutos de las infusiones intravenosas de 0,3, 1, 3 y 10 mg/kg en pacientes con cáncer avanzado (n = 25) los picos de concentraciones en el suero de bevacizumab variaban de 5 a 9 mcg/ml, 21 a 39 mcg/ml, 52 a 92 mcg/ml y 186 a 294 mcg/ml, respectivamente, se observaba una ligera acumulación con dosis repetidas (semanalmente), pero no era significativa y la farmacocinética se mantenía lineal. Los niveles del estado establecido de bevacizumab se obtenían en 100 días después de 1 a 20 mg/kg semanalmente, cada 2 semanas o cada 3 semanas.

La dosis de bevacizumab recomendada es de 5 miligramos/kilogramo infundida por vía intravenosa durante 30 minutos cada dos semanas hasta que disminuya la progresión de la enfermedad. El bevacizumab debería seguir con quimioterapia. La eficacia del bevacizumab como agente único no se ha establecido. El bevacizumab (que se puede coadministrar con gemcitabina y docetaxel, o en una semana antes o después de la quimioterapia), se administra

por vía intravenosa, a aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, preferentemente aproximadamente a 5 mg/kg.

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

La divulgación proporciona métodos para el tratamiento de trastornos proliferativos celulares tales como el cáncer y neoplasias que comprende la administración de un vector de RCR de la divulgación, seguido por un tratamiento con un agente quimioterápico o anticáncer. En un aspecto, el vector RCR se administra a un sujeto durante un periodo de tiempo antes de la administración del agente quimioterápico o anticáncer que permita al RCR infectar y replicarse. El sujeto se trata entonces con un agente quimioterápico o agente anticáncer durante un periodo de tiempo y dosificación para la proliferación o destruir las células cancerosas. En un aspecto si el tratamiento con el agente quimioterápico o anticáncer reducir, pero no destruye el cáncer/tumor (por ejemplo, una remisión parcial o remisión temporal), el sujeto se tiene que tratar entonces con un agente terapéutico no tóxico (por ejemplo, 5-FC) que se convierte en un agente terapéutico tóxico en las células que expresan un gen citotóxico (por ejemplo, citosina desaminasa) del RCR. Utilizando dichos métodos los vectores RCXR de la divulgación se diseminan durante un proceso de replicación de las células tumorales, dichas células se pueden destruir entonces con un agente anticáncer o quimioterápico y adicionalmente se puede producir la destrucción utilizando el procedimiento de tratamiento con RCR descrito en el presente documento.

En otro aspecto de la divulgación más, el gen heterólogo puede comprender una secuencia codificante para un antígeno diana (por ejemplo, un antígeno del cáncer). En este aspecto, las células que comprenden un trastorno proliferativo se infectan con un RCR que comprende un polinucleótido heterólogo que codifica el antígeno diana para proporcionar la expresión del antígeno diana (por ejemplo, la sobre-expresión de un antígeno del cáncer). Entonces se administra un agente anticáncer que comprende un resto equivalente de direccionamiento que interactúa específicamente con el antígeno diana al sujeto. El resto equivalente de direccionamiento puede estar unido operativamente a un agente citotóxico o puede ser un agente anticáncer por sí mismo. Por lo tanto, una célula cancerosa infectada con el RCR que comprende en secuencias que codifican el antígeno direccionado aumenta la expresión de la diana en la célula cancerosa dando como resultado un aumento de la eficacia/eficiencia del direccionamiento citotóxico.

Se ha demostrado que el bloqueo de las interacciones entre las células del sistema inmunitario tiene efectos inmunológicos significativos, sean de activación o supresión (Waldmann Annu Rev Med. 57:65 2006). Por ejemplo, el bloqueo de la interacción de CTLA-4 (CD152) y B7.1 (CD80) que modulan la activación de las células T se ha demostrado que causa estimulación inmunitaria, presumiblemente bloqueando esta interacción supresora (Peggs et al. Curr. Opin. Immunol. 18:206, 2006). Este bloqueo se puede conseguir potencialmente con anticuerpos contra CTLA-4 o por B7.1 soluble. La administración sistémica de estos tipos de moléculas puede tener efectos globales no deseables que pueden como mínimo dar lugar a efectos secundarios perjudiciales e incluso la muerte en el caso de un agonista C28 (Suntharalingam et al. NEJM 355 1018 2006). Pfizer ha desarrollado uno de dichos anticuerpos de bloqueo anti-CTLA-4 (CP-675,206) como reactivo anticáncer, pero recientemente se ha detenido su desarrollo debido a los efectos secundarios significativos. El suministro local de moléculas de bloqueo que se liberan en el entorno local, desde el tumor después de la infección con un vector competente en replicación que codifica dichas moléculas que se liberan en el espacio extracelular, proporciona la modulación inmunitaria localmente y evita estos efectos secundarios graves. Las moléculas de bloqueo son anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, versiones solubles del ligando natural u otros péptidos que se unen a dichos receptores.

En otro aspecto más, un RCR de la divulgación puede comprender una secuencia codificante que comprende un dominio de unión (por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un dominio de anticuerpo o un ligando receptor) que interactúa específicamente con un antígeno o ligando equivalente. El RCR comprende la secuencia codificante para el dominio de unión que se puede entonces utilizar para infectar las células de un sujeto que comprende un trastorno proliferativo celular tal como una célula cancerosa o una célula neoplásica. La célula infectada entonces expresará el dominio de unión o anticuerpo. Se puede administrar entonces un antígeno o equivalente unido operativamente a un agente citotóxico o que es propiamente citotóxico al sujeto. El equivalente citotóxico entonces destruirá selectivamente las células infectadas que expresan el dominio de unión. De manera alternativa el propio dominio de unión puede ser un agente anticáncer.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en el presente documento como VH) y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en el presente documento como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El

término “anticuerpo” engloba fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, F(ab')₂, un fragmento Fd, fragmentos Fv, y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos.

- 5 Las regiones VH y VL puede subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (CDR), intercaladas en regiones que están más conservadas, denominadas “regiones marco conservadas” (FR). La extensión de la región marco conservada y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, y Chothia, C. et al. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917).
- 10 Las definiciones de Kabat se utilizan en el presente documento. Cada VH y VL está compuesta normalmente por tres CDR y cuatro FR, dispuestas de sede el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, F3, CDR3, FR4.

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

- 20 Como se utiliza en el presente documento, una “secuencia de dominio variable de inmunoglobulina” se refiere a una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir todo o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos del extremo N o C, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En un aspecto de la divulgación, un polipéptido que incluye una secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión (o “sitio de unión al antígeno”), por ejemplo, una estructura que interactúa con Tiel, por ejemplo, se una o inhibe Tiel.

- 30 La cadena VH o VL del anticuerpo pueden incluir adicionalmente todo o parte de la región constante de cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, respectivamente. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulinas, donde las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están interconectadas por, por ejemplo, enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada incluye tres dominios CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median normalmente en la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluyendo distintas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico. El
- 40 término “anticuerpo” incluyen inmunoglobulinas intactas de tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como subtipos de los mismos): Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas pueden ser de los tipos kappa o lambda. En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo está glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente de anticuerpo y/o citotoxicidad mediada por complemento.

- 45 La expresión “anticuerpo monoespecífico” se refiere a un anticuerpo que presenta una única especificidad y afinidad de unión por una diana en particular, por ejemplo, un epítipo. Esta expresión incluye un “anticuerpo monoclonal” que se refiere a un anticuerpo que se produce como una especie molecular única, por ejemplo, de una población homogénea de células aisladas. Una “composición de anticuerpos monoclonales” se refiere a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos en una composición que incluye una única especie molecular de anticuerpo. En un aspecto de la divulgación, un anticuerpo monoclonal se produce en una célula de mamífero. Se pueden combinar una o más especies de anticuerpo monoclonal.

- Una o más regiones de un anticuerpo puede ser humana o prácticamente humana. Por ejemplo, una o más regiones variables pueden ser humanas o prácticamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, por ejemplo, HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, y LC CDR3. Cada una de las CDR de cadena ligera pueden ser humana. HCCDR3 puede ser humana. Una o más de las regiones marco conservadas pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3, y FR4 de la HC o LC. En un aspecto de la divulgación, todas las regiones marco conservadas son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En un aspecto de la divulgación, las
- 60 secuencias humanas son secuencias de la línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de la línea germinal. Uno o más regiones constantes pueden ser humanas o prácticamente humanas. En un aspecto de la divulgación, al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, o 98 % de las regiones marco conservadas (por ejemplo, FR1, FR2, y FR3, colectivamente, o FR1, FR2, FR3, y FR4, colectivamente) o el anticuerpo interno puede ser humano o prácticamente humano. Por ejemplo, FR1, FR2, y FR3, colectivamente pueden ser al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98, o 99 % idénticas a una secuencia humana codificada por un segmento V de la línea germinal humana de un locus que codifica una secuencia de cadena ligera o pesada.

Todo o parte de un anticuerpo puede estar codificado por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Los genes de inmunoglobulina humana ejemplar incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de regiones variables de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) se codifican por un gen de región variable en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH-. Las cadenas pesadas de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 kd o 446 aminoácidos) se codifican de manera similar por un gen de la región variable (de aproximadamente 115 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados anteriormente, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). Una cadena ligera se refiere a cualquier polipéptido que incluye un dominio variable de cadena ligera. Una cadena pesada se refiere a cualquier polipéptido que incluye un dominio variable de cadena pesada.

La expresión "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo de longitud completa (o simplemente, "parte de anticuerpo", o "fragmento"), como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que mantiene la capacidad para unirse específicamente a una diana de interés. Ejemplos de fragmentos de unión englobados en el término "fragmentos de unión al antígeno" de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en la VL, VH, CL y dominios CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de la bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada que mantiene la funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes diferentes, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que hace posible que sean capaces de producirse como una única cadena proteica en la cual las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv). Véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883.

Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener utilizando cualquier técnica apropiada incluyendo las técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. La expresión "anticuerpo monoespecífico" se refiere a un anticuerpo que presentan una única especificidad y afinidad de unión por una diana en particular, por ejemplo, un epítipo. Esa expresión incluye un "anticuerpo monoclonal" o una "composición de anticuerpo monoclonal", que se utiliza en el presente documento para referirse a una preparación de anticuerpos o fragmentos de los mismos de una composición molecular única. Como se utiliza en el presente documento "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que están codificados por los genes de la región constante de cadena pesada.

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

Por lo tanto, la divulgación incluye distintas composiciones farmacéuticas útiles para tratar un trastorno proliferativo celular. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la divulgación se preparan uniendo un vector retroviral que contienen una secuencia de polinucleótido heterólogo útil en el tratamiento o modulación de un trastorno proliferativo celular de acuerdo con la divulgación en una forma adecuada para la administración a un sujeto utilizando vehículos, excipientes y aditivos o auxiliares. Los vehículos o auxiliares que se utilizan frecuentemente incluyen, carbonato magnésico, dióxido de titanio, lactosa, manitol y otros azúcares, talco, proteína de leche, gelatina, almidón, vitaminas, celulosa y sus derivados, aceites animales y vegetales, polietilenglicoles y disolventes tales como agua estéril, alcoholes, glicerol, y alcoholes polihídricos. Los vehículos intravenosos incluyen abastecedores de fluidos y de nutrientes. Los conservantes incluyen antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes. Otros vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones acuosas, excipientes no tóxicos incluyendo sales, conservantes, tampones y similares, como se describe, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a ed. Easton: Mack Publishing Co., 1405-1412, 1461-1487 (1975) y The National Formulary XIV., 14^a ed. Washington: American Pharmaceutical Association (1975).

El pH y concentración exacta de los distintos componentes de la composición farmacéutica se ajustan de acuerdo con la experiencia de rutina en la técnica. Véase Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis for Therapeutics (7^a ed.).

Por ejemplo, y no a modo de limitación, un vector retroviral útil en el tratamiento de un trastorno proliferativo celular incluirá una proteína ENV anfotrópica, proteínas GAG y POL, una secuencia promotora en la región U3 del genoma retroviral, y todas las secuencias *cis*-actuantes necesarias para la replicación, empaquetamiento e integración del genoma retroviral en la célula diana.

Los siguientes Ejemplos tienen la intención de ilustrar, pero no limitan la divulgación.

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Modificación del armazón del vector de pACE-GFPemd en pAC3-GFPemd e inserción de secuencias del gen de citosina desaminasa en lugar de GFP

El armazón previo del plásmido Pace-GFPemd (documento US6899871, Wang et al. Hum Gene Ther 14:117 2003) se modificó de tres maneras como se muestra en la Figura 3E. Las modificaciones se hicieron por mutagénesis dirigida de oligonucleótido mediado por PCR (Logg et al., J. Mol Biol 369: 1214, 2007; véase también "Molecular Biology and Biotechnology" Eds. J M. Walker, R.Rapley, Royal Society of Chemistry, London RU, 2000). Se hicieron las siguientes modificaciones. 1) La secuencia de ácido nucleico en la región p15 en el extremo 3' del gen env anfotrópico se derivaba originalmente de la envoltura ecotrópica – esta secuencia se sustituyó por la secuencia correspondiente de la envoltura 4070 A anfotrópica; los aminoácidos de la envoltura son idénticos en las dos construcciones. 2) la secuencia IRES del extremo 3' se modificó para permitir una inserción más fácil de transgenes de elección con la inserción de un sitio PstI1 y pequeñas repeticiones imperfectas en el extremo del sitio del transgén IRES se retiró. 3) la secuencia vírica residual corriente abajo de la LTR 3' se retiró. El plásmido resultante pACE-emdGFP (también conocido como pACE-GFP, pACE-eGFP y T5.0006) se utilizó como una base para los vectores que codifican la citosina desaminasa y variantes. Se utilizaron inicialmente dos métodos de inserción de los casetes de la secuencia codificante. El primer método resultaba en la secuencia 5'TTATAAT3', y el segundo en la secuencia 5'TTATAA3' inmediatamente corriente arriba del codón de inicio ATG. El segundo método era más simple, ya que implica cortes simples con las enzimas PstI1 y Not1 en el vector y los genes de la citosina desaminasa sintética, seguida por empalme. Los vectores con inserciones de citosina desaminasa se hicieron de ambas maneras con las secuencias codificantes CDopt (CD1) y el CDopt+ept (CD2) (véase la Figura 2) y se hicieron y se hicieron las preparaciones de virus infecciosos por transfección transitoria de células 293T como se describe en el Ejemplo 3. Las células U87 se infectaron entonces en el cultivo, con una MOI de 0',1 y las células se cultivaron hasta el 100 % de infectadas. Los extractos celulares de las células 100 % infectadas se ensayaron en cuanto a la actividad de citosina desaminasa como se describe en el Ejemplo 6 y se descubrió que la actividad específica de la enzima era equivalente para las construcciones con la secuencia corriente arriba, que de otra manera eran idénticas. Por lo tanto, en la tabla de la Figura 2, pACE-eGFP (T5.0006) y pACE-γCD (T5.0007) tienen la primera secuencia corriente arriba, mientras que todas las demás construcciones que se ensayaron adicionalmente tenían la segunda. Posteriormente los vectores con diferentes inserciones genéticas se habían construido rutinariamente con cortes directos PstI1 y Not1.

Véase la Figura 3A posteriormente para un diagrama de la construcción del vector para el retrovirus competente en replicación transfectado inicial. CMV es el promotor temprano inmediato de CMV humano, U3, R y U5 son las regiones correspondientes de la repetición terminal larga (LTR). Gag, pol y env son las regiones víricas que codifican las proteínas. La Figura 3B y 3D muestran la estructura del plásmido y una secuencia de la divulgación.

El vector de la divulgación proporciona varias diferencias en comparación con el vector de Tai et al., Mol. Ther. 12:842, 2005. El vector de Tai et al., se ha alterado para eliminar aproximadamente 70 pb de la secuencia corriente arriba de la secuencia MLV de la LTR 3'. La secuencia de ADN corriente arriba del sitio ClaI en la envoltura se cambió por una secuencia de envoltura anfotrópica. Este cambio no cambia la secuencia de aminoácidos de la envoltura. Además, las pequeñas repeticiones en cada lado del casete IRES-cd se han eliminado para evitar la inestabilidad debida a recombinación homóloga. Estos cambios también proporcionaban inesperadamente una estabilidad aumentada del vector durante la replicación y el pasaje en células huésped (Figura 5).

Se reconoce que después de la transcripción inversa y el primer evento de integración en las células tratadas, el provirus ADN y cualquier progenie de retrovirus posterior tiene una estructura de la LTR convencional de MLV en cada extremo. Se ha demostrado que esta configuración es estable después de múltiples ciclos de infección (Véase la Figura 5 posteriormente).

Ejemplo 2 Aumentos genéticos del gen de citosina desaminasa en una levadura de tipo silvestre

Se hicieron dos conjuntos de cambios: (1) tres mutaciones posicionales que cambian tres aminoácidos (A23L, I140L y V108I) para aumentar la estabilidad térmica de la citosina desaminasa proteica de levadura y (2) modificaciones adicionales en la secuencia genética para aumentar el uso de las secuencias humanas de uso del codón para mejorar la eficacia de traducción proteica en las células humanas sin cambios adicionales de la secuencia de aminoácidos.

La secuencia diseñada para CD incluía el CD optimizado, CD-UPRT (+/- enlazador). La secuencia codificante de citosina desaminasa final puede comprender en el extremo 5' un sitio PSI1 (de longitud completa) y un sitio Not1 en el extremo 3' más una cola poliA para la estrategia basada en el casete PSI1/Not1. Las secuencias de los casetes se ordenaron y se proporcionaron por un proveedor comercial (BioBasic Inc., Markham, Ontario, Canadá).

La siguiente secuencia que comprende la citosina desaminasa de levadura se utilizó para la clonación, optimización y mutación (los ácidos nucleicos encuadrados comprenden los sitios de restricción Psi1 y Not1 utilizados posteriormente en los métodos para la clonación:

AACACGATTATATAATGGTGACAGGGGGAATGGCAAGCAAGTGGGATCAGAAGGGTATGGACATTGCC
TATGAGGAGGCGGCCTTAGGTTACAAAGAGGGTGGTGTTCCTATTGGCGGATGTCTTATCAATAACA
AAGACGGAAGTGTTCGCGTGGTGCACACATGAGATTTCAAAGGGATCCGCCACACTACATGG
TGAGATCTCCACTTTGGAAAAGTGTGGGAGATTAGAGGGCAAAGTGTACAAAGATAACCACTTTGTAT
ACGACGCTGTCTCCATGCGACATGTGTACAGGTGCCATCATCATGTATGGTATTCCACGCTGTGTG
TCGGTGAGAACGTTAATTTCAAAGTAAGGGCGAGAAATATTTACAAACTAGAGGTACAGAGGTTGT
TGTGTTGACGATGAGAGGTGTAAAAGATCATGAAACAATTTATCGATGAAAGACCTCAGGATTGG
TTTGAAGATATTGGTGAGTAGGCGGCCGCGCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTAGTCTCCAGA
AAAAGGGGGG (SEQ ID NO:32)

5

La siguiente Tabla resume los genes y los vectores plásmidos que se produjeron y sus nombres.

Tabla: Construcciones de vector y sus nombres

Código tocagen	Nombre de referencia	Nombre original	5'LTR Prom	Envoltura	Vector	IRES	Transgén	LTR 3'
T5.0000	pACE-γCD	pACE-CD (Tai et al. 2005)	CMV	Anfo (4070A)	pACE	EMCV	CD de levadura ts	MLV U3
T5.0001	pAC3-γCD1	Secuencia CDopt	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	CD modificado	MLV U3
T5.0002	pAC3-γCD2	CDopt+3pt	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	CD modificado	MLV U3
T5.0003	pAC3-γCD2-U	CDopt+3pt-UPRT	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	CD2-UPRT	MLV U3
T5.0004	pAC3-γCD2-O	CDopt+3pt -OPRT	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	CD2-OPRT	MLV U3
T5.0005	pAC3-γCD2-LO	CDopt+3pt -LINK-OPRT	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	CD2-L-OPRT	MLV U3
T5.0006	pAC3-eGFP	pAC3-emd, pAC3GFP	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	Emera Id GFP	MLV U3
T5.0007	pAC3-γCD	pAC3-γCD	CMV	Anfo (4070A)	pAC3	EMCV	CD de levadura ts	MLV U3

10

El vector retrovítico competente en replicación descrito por Kasahara et al. pACE-CD (Patente de EE. UU. N.º 6.899.871) se utilizó como base para modificaciones adicionales. Se modificó un vector (pAC3-γCD) para que expresara un gen de citosina desaminasa de levadura como se ha descrito en el presente documento y se utilizó en las construcciones. Véase la Figura 3A posteriormente para un diagrama de la construcción del vector para el retrovirus competente en replicación transfectado inicial. CMV es el promotor temprano inmediato de CMV humano, U3, R y U5 son las regiones correspondientes de la repetición terminal larga vírica. Gag, pol y env son las regiones codificantes de las proteínas víricas. La Fig. 3B y 3D muestran la estructura del plásmido y una secuencia de la divulgación.

15

20

Después de que se sintetizaran los genes en el proveedor (Bio Basic Inc., Markham, Ontario, Canadá) se insertaron en el sitio Psi1-Not1 del armazón del vector pAC3 (Figura 3). El armazón del plásmido se generó normalmente cortando el plásmido pAC3-eGFP con Psi1 y Not1 y la purificación del fragmento grande (aproximadamente 11 kb) que codifica el armazón retrovítico y el plasma.

A. Gen CD con el codón humanizado optimizado (CDopt, también denominado CD1, T5.0001) Una comparación de la citosina desaminasa con codón humano optimizado de Conrad et al., y el documento PCT WO 99/60008 indica 91 codones optimizados totales en ambos, 36 codones idénticos, 47 codones tenía cambios en el tercer par de bases (todos codifican el mismo aminoácido) y 9 codones eran diferentes (sin embargo, codificaban el mismo aminoácido). De los 9 codones que eran diferentes:

AGC (Ser) a TCC (Ser)
CGT (Arg) a AGG (Arg)
CCA (Pro) a CCT (Pro)

Todos tenían un contenido en GC equivalente y codifican el mismo aminoácido. Se optimizó el codón de la secuencia genética nativa de levadura anterior por separado para dar el siguiente gen CD (CD1) y se llamó T5.0001 cuando se insertó en el vector plasmídico pAC3 que codifica el retrovirus competente en replicación (RCR) con IRES.

TTATAAATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAGGGCATGGATATCGCTT
ACGAGGAGGCCGCCCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCATCGGCGGCTGTCTGATCAA
CAACAAGGACGGCAGTGCTGGGCGAGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCC
ACCCTGCACGGCGAGATCTCCACCCTGGAGAAGTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACA
AGGACACCACCCTGTACACCACCCTGTCCCTTGTGACATGTGTACGGCGCTATCATCAT
GTACGGCATCCCTAGGTGTGTGGTGGGCGAGAACGTGAACTTCAAGTCCAAGGGCGAGAAG
TACCTGCAAACCAGGGGCCACGAGGTGGTGGTTGTTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGATCA
TGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCTCAGGACTGGTTCGAGGATATCGGCGAGTGATAAGC
GGCCGCAGATAAAATAAAAGATTTTATTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGG.

B. gen CD termoestablecido. Se hicieron modificaciones adicionales para aumentar la estabilidad de la citosina desaminasa. Se hicieron aumentos genéticos del gen de desamina citosina de levadura de tipo silvestre para incluir tres mutaciones posicionales que cambian tres aminoácidos (A23L, I140L y V108I) para aumentar la estabilidad térmica de la citosina desaminasa proteica de levadura.

Se utilizaron los siguientes pares de cebadores en la generación del gen para el polipéptido de citosina desaminasa de la divulgación.

Cebadores de mutagénesis dirigida al sitio: Cebadores en sentido 5'-tcgaggatcgccgagtgaaacccgttattctttggc-3' (SEQ ID NO:33) Cebadores antisentido: 5'-gccaaaaagaataacgggttcactcgccgatctctga-3' (SEQ ID NO: 34)
Cebador en sentido:

5' tccggcgagtgatccggcgccggcgccctccggcgccggcgccctccggcgccggcgccctccggcgccg
ggcgccaacccgttatt-3' (SEQ ID NO:35)

Cebador antisentido:

5'-aataacgggttgccgcccgcggagggcgccgcccggagggcgcccgcggag
gcgcccgcgggatcactcgccga-3' (SEQ ID NO:36)

Para aumentar la estabilidad de la CD proteica de levadura nativa, se realizaron tres sustituciones de aminoácidos en la proteína. Estas sustituciones eran solas o en combinación con optimización del codón humano.

Las tres sustituciones de aminoácidos son: A23L, V108I, I140L. Una secuencia codificante de estas sustituciones se muestra posteriormente.

ATGGTGACAGGGGGAATGGCAAGCAAGTGGGATCAGAAGGGTATGGACATTGCCTATGAGGAGGCGT
TATTAGGTTACAAAGAGGGTGGTGTTCCTATTGGCGGATGTCTTATCAATAACAAAGACGGAAGTGT
TCTCGGTCGTGGTCACAACATGAGATTTCAAAGGGATCCGCCACACTACATGGTGAGATCTCCACT
TTGGAAACTGTGGGAGATTAGAGGGCAAAGTGTACAAAGATAACACTTTGTATACGACGCTGTCTC
CATGCGACATGTGTACAGGTGCCATCATCATGTATGGTATTCCACGCTGTGTCATCGGTGAGAACGT
TAATTTCAAAGTAAGGGCGAGAAATATTTACAACTAGAGGTCACGAGGTGTTGTTGTTGACGAT

El polipéptido codificado comprende la siguiente secuencia (los aminoácidos sustituidos están subrayados):

1 MVTGGMASKWDQKGMDIAYEEALLGYKEGGVPIGGCLINNKDGSVLGRGHNMRFQKGSAT
61 LHGEISTLENCGRLEGKVYKDTTLYTTLSPCDMCTGAIIMYGIPRCVIGENVNFKSKGEK
121 YLQTRGHEVVVVDDERCKLMKQFIDERPDWDFEDIGE- (SEQ ID NO:4)

El diseño de la construcción final que integra las tres sustituciones de aminoácidos A23L/V108I/I140L que utiliza los codones preferidos y utiliza el uso de codón humano preferido para la secuencia completa (este gen se llamó CDopt+3pt [también llamado CD2] (SEQ ID NO: 37):

1 ATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAAGGGCATGGATATCGCTTACGAG
61 GAGGCCCTGCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCTATCGGCGGCTGTCTGATCAACAAC
121 AAGGACGGCAGTGTGCTGGGCAGGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCCACC
181 CTGCACGGCGAGATCTCCACCCTGGAGAACTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACAAG
241 GACACCACCCTGTACACCACCCTGTCCCCTTGTGACATGTGTACCGGCGCTATCATCATG
301 TACGGCATCCCTAGGTGTGTGATCGGCGAGAAGCTGAAGTCAAGTCCAAGGGCGAGAAG
361 TACCTGCAAACAGGGGCCACGAGGTGGTGGTGTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGCTG
421 ATGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCTCAGGACTGGTTCGAGGATATCGGCGAGTGATAA

y T5.0002 cuando se inserta en el vector plasmídico pAC3 que codifica el RCR con IRES. Los codones subrayados señalan los codones preferidos para las sustituciones de aminoácidos.

El alineamiento de secuencia de traducción proteica indica los cambios preferidos de codón y las sustituciones de aminoácido resultan en la estructura proteica deseada:

Diseño de secuencia CD optimizada (preferencia de codón humano + 3 sustituciones de aminoácidos)

AACACGATTATAAATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAAGGGCATGGATATCGCT
TACGAGGAGGCCCTGCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCTATCGGCGGCTGTCTGATCAACAACA
AGGACGGCAGTGTGCTGGGCAGGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCCACCCTGCACGG
CGAGATCTCCACCCTGGAGAACTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACAAGGACACCACCCTGTAC
ACCACCCTGTCCCCTTGTGACATGTGTACCGGCGCTATCATCATGTACGGCATCCCTAGGTGTGTGA
TCGGCGAGAACGTGAAGTCAAGTCCAAGGGCGAGAAGTACCTGCAAACAGGGGCCACGAGGTGGT
GGTGTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGCTGATGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCTCAGGACTGG
TTCGAGGATATCGGCGAGTAAGCGGCCGCGCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGA
AAAAGGGGGG (SEQ ID NO:38)

C. Construcción del gen de fusión CD-UPRT (CDopt+3pt-UPRT, [también llamado CDopt-UPRT y CD2-UPRT], T5.0003 en el plásmido pAC3 del vector RCR). También se desarrolló una construcción de fusión que comprende un polipéptido CD como se ha descrito anteriormente unido a un polipéptido UPRT para generar una secuencia CD optimizado + UPRT utilizando el Esquema I como se expone en la Figura 10A. Se utilizaron los siguientes cebadores para eliminar la parada-inicio entre el CD y UPRT.

Secuencias de cebador:

Nombre de cebador	Secuencia de cebador (5' a 3')
del118-123	5'-tcgaggatatcggcgagtgaaacccgtattctttttggc-3'
del118-123-antisentido	5'-gccaaaaagaataacgggtttcactcgccgatatcctcga-3'

Nombre de cebador	Longitud (nt.)	Tm	Energía del dúplex a 68 °C	Coste energético de falta de coincidencia
del118-123	40	79,06 °C	-44,37 kcal/mol	21,1 %
del118-123-antisentido	40	79,06 °C	-47,95 kcal/mol	20,3 %
Nombre de cebador	Cebador – armazón dúplex			
del118-123	5'-tcgaggatatacggcgagtga-----aaccggttattcttttttggc-3' ccaagctcctatagccgctcactatctacttgggcaataagaaaaaccgaag			
del118-123-antisentido	ggttcgaggatatacggcgagtgatagatgaaccggttattcttttttggcttc 3'-agctcctatagccgctcact-----ttgggcaataagaaaaaccg			

El polinucleótido de fusión resultante comprende 1296 pb y la secuencia expuesta inmediatamente a continuación:

AACACGA**TTATAA**ATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAAGGGCATGGATATCGCT
 TACGAGGAGGCCCTGCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCTATCGGCGGCTGTCTGATCAACAACA
 AGGACGGCAGTGTGCTGGGCAGGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCCACCCTGCACGG
 CGAGATCTCCACCCTGGAGAACTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACAAGGACACCACCCTGTAC
 ACCACCCTGTCCCTTGTGACATGTGTACCGGCGCTATCATCATGTACGGCATCCCTAGGTGTGTGA
 TCGGCGAGAACGTGAACTTCAAGTCCAAGGGCGAGAAGTACCTGCAAACCAGGGGCCACGAGGTGGT
 GGTGTGTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGCTGATGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCCTCAGGACTGG
 TTCGAGGATATCGGCGAGAACCCGTTATTCTTTTGGCTTCTCCATTCTTGTACCTTACATATCTTA
 TATATTATCCAAACAAAGGGTCTTTTCGTTAGCAAACCTAGAAATCTGCAAAAAATGTCTTCGGAACC
 ATTTAAGAACGTCTACTTGCTACCTCAAACAAACCAATTGCTGGGTTTGTACACCATCATCAGAAAT
 AAGAATACAACCTAGACCTGATTTTCATTTTCTACTCCGATAGAATCATCAGATTGTTGGTTGAAGAAG
 GTTTGAACCATCTACCTGTGCAAAAGCAAATGTGGAAGTACACCAACGAAAACCTTCGAAGGTGT
 CTCATTCATGGGTAAAATCTGTGGTGTTCATTTGTGAGAGCTGGTGAATCGATGGAGCAAGGATTA
 AGAGACTGTTGTAGGTCTGTGCGTATCGGTAAAATTTTAATTCAAAGGGACGAGGAGACTGCTTTAC
 CAAAGTTATTCTACGAAAAATTACCAGAGGATATATCTGAAAGGTATGTCTTCCTATTAGACCCAAT
 GCTGGCCACCGGTGGTAGTGCTATCATGGCTACAGAAGTCTTGATTAAGAGAGGTGTTAAGCCAGAG
 AGAATTTACTTCTTAAACCTAATCTGTAGTAAGGAAGGATTGAAAAATACCATGCCGCCTTCCCAG
 AGGTCAGAATTGTTACTGGTGCCCTCGACAGAGGTCTAGATGAAAACAAGTATCTAGTTCCAGGGTT
 GGGTGACTTTGGTGACAGATACTACTGTGTTAA**GCGGCCGC**GCCATAGATAAAATAAAGATTTTA
 TTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGG

5

D. Construcción de un gen de fusión CD-enlazador-UPRT (CDopt+3pt-enlazador-UPRT [también llamado CDopt-enlazador-UPRT]) Se desarrolló también una construcción de fusión clonando un dominio de enlazador (Ser-Gly-Gly-Gly)₄ entre y en fase con el polipéptido CD y el polipéptido UPRT para generar una secuencia CD optimizado-enlazador-UPRT utilizando el Esquema II como se representa en la Figura 10B. Se utilizaron los siguientes cebadores para insertar el enlazador.

10

Nombre de cebador	Secuencia de cebador (5' a 3')
ins_60nt_ tras_477	5'-tcggcgagtgatccggcgggcgccctccggcgggcgccctccggcg gcgcgccctccggcgggcgcccaaccggtatt-3'
ins_60nt_ tras_477- antisentido	5'-aataacgggttgccgcccgcggaggcgccgcccgcggaggcgcc gccgcccggaggcgccgcccggatcactcgcca-3'

Nombre de cebador	Longitud (nt.)	Tm	Energía del dúplex a 68 °C	Coste energético de faltas de coincidencia
ins_60nt_ tras_477	82	79,77 °C	-30,19 kcal/mole	83,3 %
ins_60nt_ tras_477- antisentido	82	79,77 °C	-32,31 kcal/mole	82,2 %

La construcción resultante tiene un tamaño de: 1356 pb y la secuencia inmediatamente a continuación:

AACACGA**TTATAA**ATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAAGGGCATGGATATCGCT
TACGAGGAGGCCCTGCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCTATCGGCGGCTGTCTGATCAACAACA
AGGACGGCAGTGTGCTGGGCAGGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCCACCCTGCACGG
CGAGATCTCCACCCTGGAGAACTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACAAGGACACCACCCTGTAC
ACCACCCTGTCCCCTTGTGACATGTGTACCGGCGCTATCATCATGTACGGCATCCCTAGGTGTGTGA
TCGGCGAGAACGTGAACCTCAAGTCCAAGGGCGAGAAGTACCTGCAAACCAGGGGCCACGAGGTGGT
GGTTGTTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGCTGATGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCTCAGGACTGG
TTCGAGGATATCGGCGAGTCCGGCGGCGGCGCCTCCGGCGGCGGCGCCTCCGGCGGCGGCGCCTCCG
GCGGCGGCGCCAACCCGTTATTCTTTTTGGCTTCTCCATTCTTGTACCTTACATATCTTATATATTA
TCCAAACAAAGGGTCTTTCGTTAGCAAACCTAGAAATCTGCAAAAAATGTCTTCGGAACCATTTAAG
AACGTCTACTTGCTACCTCAAACAAACCAATTGCTGGGTTTGTACACCATCATCAGAAATAAGAATA
CAACTAGACCTGATTTCTATTTCTACTCCGATAGAATCATCAGATTGTTGGTTGAAGAAGGTTTGAA
CCATCTACCTGTGCAAAAGCAAATTGTGGAACTGACACCAACGAAAACCTCGAAGGTGTCTCATTC
ATGGGTAAAATCTGTGGTGTTCATTGTCTAGAGCTGGTGAATCGATGGAGCAAGGATTAAGAGACT
GTTGTAGGTCTGTGCGTATCGGTAAAATTTTAATTCAAAGGGACGAGGAGACTGCTTTACCAAAGTT
ATTCTACGAAAAATTACCAGAGGATATATCTGAAAGGTATGTCTTCCTATTAGACCCAATGCTGGCC
ACCGGTGGTAGTGCTATCATGGCTACAGAAGTCTTGATTAAGAGAGGTGTTAAGCCAGAGAGAATTT
ACTTCTTAAACCTAATCTGTAGTAAGGAAGGGATTGAAAAATACCATGCCGCCTTCCCAGAGGTCAG
AATTGTTACTGGTGCCCTCGACAGAGGTCTAGATGAAAACAAGTATCTAGTTCCAGGGTTGGGTGAC
TTTGGTGACAGATACTACTGTGTTTAA
GGGGGGGGGCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGG

5

E. Construcción del gen de fusión CD-OPRT (CDopt+3pt-OPRT [también llamado CDopt-OPRT y CD2-OPRT], T5.0004 cuando se inserta en el plásmido pAC3 del vector RCR). También se desarrolló una construcción de fusión que comprende un polipéptido CD como se ha descrito anteriormente a un polipéptido OPRT para generar una CD optimizado-OPRTasa (dominio humano de CD humanizado+ mutación 3pt + OPRTasa funcional) utilizando el Esquema III como se muestra en la Figura 10C. La construcción resultante comprende un tamaño de 1269 pb y la secuencia inmediatamente abajo:

10

AACACGA **TTATAA** ATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAAGGGCATGGATATCGCT
TACGAGGAGGCCCTGCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCTATCGGCGGCTGTCTGATCAACAACA
AGGACGGCAGTGTGCTGGGCAGGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCCACCCTGCACGG
CGAGATCTCCACCCTGGAGAACTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACAAGGACACCACCCTGTAC
ACCACCCTGTCCCCTTGTGACATGTGTACCGGCGCTATCATCATGTACGGCATCCCTAGGTGTGTGA
TCGGCGAGAACGTGAACTTCAAGTCCAAGGGCGAGAAGTACCTGCAAACCAGGGGCCACGAGGTGGT
GGTTGTTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGCTGATGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCTCAGGACTGG
TTCGAGGATATCGGCGAG **GCGGTCGCTCGTG** cagcctttggggccattgggtgacgggtctgtacgacg
tgcagcctttcaagtttggggacttcgtgctgaagagcgggctttcctcccccatctacatcgatct
gcggggcatcggtgtctcgaccgcgtcttctgagtcaggttgcagatatatttattccaaactgccc
aatgcaggcatcagttttgacaccgtgtgtggagtgccttatacagcctttgccattgggtacagtta
tctgttcaaccaatcaaattccaatgcttattagaaggaaagaaacaaaggattatggaactaagcg
tcttgtagaaggaaactattaatccaggagaaacctgtttaatcattgaagatgttgtcaccagtggg
tctagtgttttggaaactgttgaggttcttcagaaggagggttgaaggtcactgatgccatagtgc
tgttggacagagagcagggaggcaaggacaagttgcaggcgcacgggatccgcctccactcagtggtg
tacattgtccaaaatgctggagattctcgagcagcagaaaaaagttgatgctgagacagttgggaga
gtgaagaggtttatttcaggagaatgtctttgtggcagcgaatcataatgggttctccccctttctataa
aggaagcaccacaaagaactcaGCTTCGGTGCACGTGCAGAGCTGCCAGGATCCACCCAGTTGCATC
GAAGTAA **GCGGCCGC** GCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGG

F. Construcción del gen de fusión CD-enlazador-OPRT (CDopt+3pt-enlazador-OPRT, [también llamado CDopt-enlazador-OPRT], T5.0005 en el plásmido pAC3 del vector RCR). También se desarrolló una construcción clonando un dominio de enlazador ((Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)₄) entre y en fase con el polipéptido CD y el polipéptido OPRT para generar una secuencia CD optimizado-enlazador-OPRT utilizando el Esquema IV como se muestra en la Figura 10D.

La construcción resultante comprende un tamaño de 1329 pb y la secuencia inmediatamente a continuación:

AACACGA **TTATAA** ATGGTGACCGGCGGCATGGCCTCCAAGTGGGATCAAAAGGGCATGGATATCGCT
TACGAGGAGGCCCTGCTGGGCTACAAGGAGGGCGGCGTGCCTATCGGCGGCTGTCTGATCAACAACA
AGGACGGCAGTGTGCTGGGCAGGGGCCACAACATGAGGTTCCAGAAGGGCTCCGCCACCCTGCACGG
CGAGATCTCCACCCTGGAGAACTGTGGCAGGCTGGAGGGCAAGGTGTACAAGGACACCACCCTGTAC
ACCACCCTGTCCCCTTGTGACATGTGTACCGGCGCTATCATCATGTACGGCATCCCTAGGTGTGTGA
TCGGCGAGAACGTGAACTTCAAGTCCAAGGGCGAGAAGTACCTGCAAACCAGGGGCCACGAGGTGGT
GGTTGTTGACGATGAGAGGTGTAAGAAGCTGATGAAGCAGTTCATCGACGAGAGGCCTCAGGACTGG
TTCGAGGATATCGGCGAGT **CCGGCGGCGGCGCCT** CCGGCGGCGGCGCCTCCGGCGGCGGCGCCTCCG
GCGGCGGCGGCGGCGGTCGCTCGTGcagcctttggggccattgggtgacgggtctgtacgacgtgcaggc
tttcaagtttggggacttcgtgctgaagagcgggctttcctcccccatctacatcgatctgcggggc
atcgtgtctcgaccgcgtcttctgagtcaggttgcagatatatttattccaaactgccccaaatgcag
gcacagttttgacaccgtgtgtggagtgccttatacagcctttgccattgggtacagttatctgttc
aaccaatcaaattccaatgcttattagaaggaaagaaacaaaggattatggaactaagcgtcttgtga
gaaggaactattaatccaggagaaacctgtttaatcattgaagatgttgtcaccagtggatctagtgt
ttttggaaactgttgaggttcttcagaaggagggttgaaggtcactgatgccatagtgtgttggga
cagagagcagggaggcaaggacaagttgcaggcgcacgggatccgcctccactcagtggtgtacattg
tccaaaatgctggagattctcgagcagcagaaaaaagttgatgctgagacagttgggagagtgaaga
ggttttatttcaggagaatgtctttgtggcagcgaatcataatgggttctccccctttctataaaggaagc
acccaaagaactcaGCTTCGGTGCACGTGCAGAGCTGCCAGGATCCACCCAGTTGCATCGAAGTAA
GCGGCCGC GCCATAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGG

La Figura 4 demuestra que se observaban niveles más altos del codón optimizado humano con las tres mutaciones para una mayor estabilidad en comparación con una proteína γ CD de tipo silvestre en células T-87 infectadas.

Ejemplo 3. Producción de vector por transfección transitoria

El vector se puede producir de varias maneras, pero la primera etapa es introducir el vector ADN en células para permitir la producción de partículas infecciosas, que se pueden recolectar del sobrenadante celular. Una vez que se han generado las partículas infecciosas se pueden implementar otros métodos de producción por los expertos en la

técnica. Las partículas de vector se generaron por transfección transitoria de células 293T (Pear et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 90:8392-8396 1993).

Las células 293T se descongelaron y se pusieron en un medio de cultivo, entonces se pasaron dos veces en matraces T-75 que contenían 15 ml de medio DMEM que se preparó mezclando medio DMEM alto en glucosa (Hyclone nº 30081, 500 ml) con FBS (Hyclone nº SH30070, 50 ml), L-glutamina (Cellgro nº 25-005-CI, 5 ml), NEAA (Hyclone nº SH30238, 5 ml), y penicilina-estrep. (Cellgro nº 30-002-CI, 5 ml). Los matraces se incubaron a 37 °C y un 5 % de CO₂. Después del 3º pasaje se sembraron las células en 6 T-25, que contenía cada uno 5 ml de medio, a una densidad celular de $1,8 \times 10^6$ células/T-25 (o $7,2 \times 10^4$ células/cm²). Un día después de la siembra en los T-25, las células se transfectaron con el plásmido T5.0002 que expresaba el vector vírico utilizando el kit de transfección con fosfato cálcico de Promega (Cat nº E1200). Dieciocho horas después de la transfección, los medios de un conjunto de matraces (de 3 matraces cada uno) se remplazaron como medio nuevo que contenía 10 mM de NaB. Los medios en el 2º conjunto de matraces no se remplazaban, sirviendo como control (cero NaB). Ocho horas después del tratamiento con NaB, los medios de todos los matraces se remplazaron con el medio nuevo que no contenía NaB. Se permitió que continuara la expresión para ambos conjuntos de matraces desde el día siguiente (de 22 horas de duración). Los sobrenadantes de ambos conjuntos de matraces se recolectaron y ensayaron en cuanto a sus títulos por qPCR expresado en Unidades de Transducción (UT)/m (véase el Ejemplo 4).

Los resultados de títulos se muestran en la siguiente tabla.

Condición	Primer título	Segundo título (tras almacenamiento a -80°C durante 68 días)
Sin NaB	$1,5 (60,05) \times 10^6$ TU/ml	$1,2 (60,2) \times 10^6$ TU/ml
10 mM de NaB	$1,4 (60,3) \times 10^6$ TU/ml	$7,0 (60,14) \times 10^5$ TU/ml
UT= unidad de transducción		

Las preparaciones de vector posteriores se produjeron de esta manera, sin butirato sódico. Se han utilizado otros vectores plásmidos (Tabla 2) de la misma manera para generar las preparaciones de vector con títulos entre 1E5 UT/ml y 1E7 UT/ml. Dicho material se puede purificar y concentrar adicionalmente, si se desea, como se describe posteriormente, véase también el documento US 5792643; T. Rodríguez et al. J Gene Med 9:233 2007; Solicitud de EE. UU. 61218063.

En ciertos aspectos de la divulgación, la dosificación se calculó por gramos de peso cerebral. En dichos aspectos, la dosificación de un vector retrovítico competente en replicación de la divulgación útil en los métodos para el tratamiento puede variar de 10^4 a 10^6 UT por gramo de peso cerebral.

Ejemplo 4. Ensayo de titulación por PCR cuantitativa

La concentración de vector funcional, o título, se determina por un método basado en una PCR cuantitativa (qPCR). En este método, el vector se titula infectando una línea célula huésped que se pueda transducir (por ejemplo, células PC-3 de carcinoma prostático humano, ATCC Cat nº CRL-1435) con un volumen convencional de vector y midiendo al cantidad resultante de provirus presente en las células huésped después de la transducción. Las células y el vector se incuban en condiciones de cultivo convencionales (37 °C, un 5 % de CO₂) durante 24 h para permitir la infección completa antes de la adición del anti-retrovírico AZT para parar la replicación del vector. A continuación, las células se recolectan de la placa de cultivo y se purifica el ADN genómico (ADNg) utilizando un kit de purificación de ADNg Purelink de Invitrogen y se eluye de la columna de purificación con agua estéril libre de RNasa/DNasa. Se mide la relación de absorbancia A_{260}/A_{280} en un espectrofotómetro para determinar la concentración y pureza relativa de la muestra. Las concentraciones de ADNg se normalizan con agua libre de RNasa/DNasa a la concentración más baja determinada de cualquiera de los conjuntos de preparaciones de ADNg tal como el ADN de entrada para la qPCR que es constante para todas las muestras analizadas. La pureza del ADN genómico se evalúa adicionalmente por electroforesis de una alícuota de cada muestra en un gel de agarosa al 0,8 % teñido con bromuro de etidio. Si la muestra pasa un intervalo de absorbancia A_{260}/A_{280} de 1,8-2,0 y muestra una única banda de ADNg, entonces la muestra está preparada para el análisis por qPCR del número de copias del vector. Utilizando los cebadores que interrogan la región LTR del provirus (ADN del vector transcrito inverso y ADN del vector que se integra en el ADNg del huésped), se lleva a cabo la qPCR para estimar el número total de eventos de transducción que se producen cuando se utilizó un volumen conocido de vector para transducir un número conocido de células. El número de eventos de transducción por reacción se calcula a partir de una curva de referencia que utiliza un plásmido que alberga una diana con un número de copias conocido se diluye en serie desde 10^7 a 10 copias y se midió en idénticas condiciones de qPCR que las muestras. Sabiendo cómo se utilizaron muchos equivalentes genómicos para cada reacción qPCR (a partir de la concentración determinada previamente) y cómo se producían muchos eventos por reacción, los inventores determinaron el número total de eventos de transducción que se producían basándose en el número total de células que estaban presentes en el momento de la transducción. Este valor es el título del vector después de la dilución en el medio que contenía las células durante la transducción inicial. Para calcular el valor de título corregido, la dilución se corrige multiplicándolo por el volumen de cultivo y el volumen del título

dividido por el volumen de título. Estos experimentos se llevaron a cabo en cultivos replicados y se analizaron por qPCR utilizando mediciones por triplicado para cada condición para determinar un título medio y con su desviación típica asociada y el coeficiente de varianza.

5 Ejemplo 5. Ensayo del vector

Con el fin de que sean eficaces, las construcciones de vector y sus partículas infecciosas derivadas tienen que: 1) tener un buen título de virus por transfección transitoria (véase los ejemplos 3 y 4); 2) ser estable en múltiples pasajes; 3) destruir eficazmente células en presencia de 5-FC; y 4) expresar actividad enzimática al infectar células diana. El Ejemplo 3 muestra que se pueden obtener títulos útiles de los vectores.

Estabilidad genética de los vectores. Para demostrar la estabilidad, se llevó a cabo el siguiente experimento. Se infectaron inicialmente aproximadamente 10^6 células U-87 intactas con el vector vírico a una MOI de 0,01 y se cultivaron hasta que se infectó completamente para completar un único ciclo de infección. El sobrenadante se volvió a pasar entonces en células no infectadas y se repitió el ciclo. En este experimento, se completaron doce ciclos en ensayos por duplicado (la Figura 5 muestra uno de cada uno de los ensayos por duplicado los otros duplicados dieron resultados similares). La estabilidad genómica de la secuencia de γ CD2 y otros transgenes se evaluaron por amplificación por PCR del provirus integrado a partir de las células infectadas utilizando cebadores específicos de MLV flaqueando el sitio de inserción del transgén. La aparición de cualquier banda menor que el amplicón de longitud completa sería un indicador de inestabilidad del vector. La Figura 5 demuestra que un vector de la divulgación (T5.0007 – que comprende el vector modificado y un polinucleótido heterólogo CD) mantiene la estabilidad durante más pasajes que pACE-CD. Además, el T5.0003 es de alguna manera menos estable, mientras que T5.0004 y T5 parecen aproximadamente tan estables como pACE-CD. El pACE-CD se ha utilizado en estudios de tumores en ratón y muestra buenos efectos antitumorales en modelos de ratón. Sin embargo, un genoma vírico más estable será mucho más potente y duradero en el tratamiento de animales y seres humanos, especialmente si son necesarios múltiples ciclos de 5-FC. Tanto T5.0001 y T5.0002 son marcadamente más estables que el T5.0007, demostrando que los cambios silentes en una secuencia codificante de una proteína o pequeños cambios que dan como resultado mutaciones puntuales pueden dar lugar a propiedades inesperadamente superiores con genomas de vector más estables.

Experimentos de destrucción celular. El ensayo de proliferación en solución acuosa uno CellTiter 96 (MTS) es un método colorimétrico para la determinación del número de células viables en ensayos de proliferación. Los inventores han utilizado este ensayo para determinar la cinética de crecimiento celular, así como para determinar la respuesta a la dosis de distintas líneas celulares a la 5-Fluorocitosina (5-FC) y 5-Fluorouracilo (5-FU).

Las células infectadas 100 % con el vector se sembraron a 1000 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Se controlaron durante un periodo de ocho días después del tratamiento con distintas concentraciones de 5-FC (5-FU para los controles). Se evaluó un análisis de su crecimiento celular cada dos días utilizando la solución acuosa uno CellTiter 96 de Promega (MTS). En resumen, 20 μ l de MTS se mezcló con 100 μ l de medio (como se recomienda por el fabricante) y se añade a las muestras en la placa de 96 pocillos. Las muestras se incubaron durante 60 minutos en una incubadora a 37 °C/un 5 % de CO₂. A continuación, se tomaron las lecturas de la absorbancia en una lector de placas a una longitud de onda de 490 nm. Las placas entonces se desecharon.

La Figura 6A muestra los resultados de un experimento que demuestra que la citosina desaminasa en las células que expresan la proteína γ CD2 es al menos tan activo como la de las células que expresan la proteína γ CD de tipo silvestre, llevando a cabo titulaciones de 5-FC en células U-87 infectadas con AC3- γ CD2 (vector) o AC3- γ CD (vector). En resumen, las células U-87 5 días después de la infección a una multiplicidad de infección de 0,1 (es decir, infectadas al 100 %) con el vector AC3- γ CD (CD de tipo silvestre) o el vector AC3- γ CD2 (termoestabilizado y con el codón optimizado) se sometieron a cantidades crecientes de 5-FC o 0,1 mM de 5-FU como control positivo durante 8 días. El día 8, los cultivos celulares se evaluaron en cuanto a la viabilidad utilizando un ensayo MTS (ensayo de proliferación en solución acuosa CellTiter 96 de Promega). Los datos muestran la destrucción comparada entre los vectores retrovíricos con dosis crecientes de tratamiento con 5-FC.

En experimentos de cultivo celular *in vitro* similares con células RG2 (ATCC Cat nº CRL-2433), la línea celular RG2 se transdujo con 5 vectores diferentes (pACE-CD, T5.0001, T5.0002, T5.0004, y T5.0007). Posteriormente se sometió a concentraciones crecientes de 5-FC (5-FU para los controles) durante 8 días y se controla como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 2. Las concentraciones de 0,01 mM fueron suficientes para inducir la destrucción completa con todos los vectores ensayados con la excepción de la citosina desaminasa de levadura de tipo silvestre (pACE- γ CD). Era menos sensible y necesitaba 1.0 mM de 5-FC para la destrucción completa.

Ensayo de expresión CD. Se transdujeron células U87 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,1, se cultivaron durante 5 días para permitir la diseminación vírica y las células desde el día 5 después de la transducción se recolectaron. Las células se recolectaron entonces por centrifugación a 800 x g durante 5 min. El sobrenadante se aspiró del aglomerado celular y se lavó con 5 ml de solución salina tampón fosfato (PBS) y se centrifugó de nuevo a 800 x g durante 5 min. El aglomerado celular resultante se llevó hasta 1,5 ml con PBS, se resuspendió con un

pasaje a través de una punta de pipeta y se colocó en un frigorífico a -20 °C. Las células se lisaron por el método de congelación/descongelación. Las células suspendidas previamente se dejaron descongelar a temperatura ambiente, se pasaron a través de una punta de pipeta, se mezclaron con un cóctel inhibidor de proteasa y de nuevo se congelaron a -20 °C. Antes del ensayo enzimático, la muestra se descongeló de nuevo a temperatura ambiente y se pasó a través de una punta de pipeta. La suspensión se centrifugó entonces a 14.000 rpm en una centrífuga de mesa durante 5 min. El sobrenadante se decantó del aglomerado y se colocó en un tubo de Eppendorf nuevo y se colocó en hielo.

Se evaluó la actividad de la enzima γ CD utilizando un ensayo HPLC. El ensayo HPLC se llevó a cabo en una unidad Shimadzu LC20AT conectada en serie con un detector Photoarray y un autoinyector. La fase sólida era una columna de HPLC Hypersil BDS C18 con un tamaño de esfera de 5 μ m y dimensiones de columna de 4,0 x 250 mm. La fase móvil era 50 mM de fosfato amónico, pH 2,1, que contenía un 0,01 % de perclorato de tert-butilamonio y un 5 % de metanol; el sistema se equilibró a 22 °C. Todos los reactivos tenían una calidad ACS y los disolventes eran de calidad HPLC. Se hizo una mezcla de reacción consistente en 800 μ l con una concentración final de 0,125 mg/ml de 5FC (1 mM) en PBS y se colocaron en un vial automuestreo de 1,5 ml. La reacción se inició entonces añadiendo 200 μ l de cada lisado celular. Los viales de reacción/automuestreo se colocaron en el automuestreador y se inyectaron 5 μ l de la mezcla de reacción. Se tomaron puntos temporales periódicamente recuperando una alícuota de 5 μ l de cada vial de reacción y se analizaron en la columna de HPLC. Se calcularon las tasas de conversión de 5 FC en 5FU comparando las áreas del pico con una curva de referencia con cantidades conocidas de 5FU generada anteriormente. La tasa de conversión de FC en FU se derivó representando la cantidad de 5 FU (en nmol) generada frente a su intervalo de tiempo correspondiente. La concentración proteica para la muestra celular se derivó y se calculó la actividad específica de las muestras de lisado celular dividiendo la tasa de conversión (nmol/min⁹ por la cantidad de proteína utilizada en el ensayo en mg. La Figura 6B muestra la actividad específica de distintos vectores después de 5 días de la transducción con una MOI de 0,1. Los datos demuestran que pACE- γ CD (T5.0000) < pAC3- γ CD1(T5.0001) < pAC3-CD2 (T5.0002) en términos de actividad específica de citosina desaminasa en las células del cultivo celular.

Ejemplo 6 Purificación y concentración del vector

Un vector de la divulgación se fabricó por transfección transitoria en células 293T (Ejemplo 3), seguido por recolección del sobrenadante celular, se filtró, se trató con benzonasa, se diafiltró/concentró y se dializó. Se puede incluir una etapa adicional en una columna de cromatografía, conocida por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento US5792643; T. Rodríguez et al. J Gene Med 9:233 2007; Solicitud de EE. UU. 61218063). El material clínico se libera basándose en ensayos convencionales tales como de esterilidad, micoplasmas y endotoxinas, más potencia específica del producto, fuerza y ensayo de identidad. El título se determina en Unidades de transducción (UT) por PCR de cuantificación de ADN del vector vírico integrado en las células diana (Ejemplo 4). El producto final se dirige para tener un título de hasta 10⁹ UT/ml formulado en solución de sacarosa con tampón Tris isotónico, como un inyectable estéril.

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

Transducción: Las transducciones se llevaron a cabo en un formato de placas de 12 pocillos utilizando una línea celular PC-3 estable derivada de adenocarcinoma de próstata humano. Para cada muestra de ensayo se utilizaron tres diluciones de preparación de vector sin titular para transducir las células PC-3 en pocillos por triplicado. La replicación vírica se detuvo a las 24 horas después de la transducción con azidotimidina (AZT). Las células se mantuvieron unas 24-64 horas adicionales antes de la recolección y purificación del ADN genómico.

Preparación de ADN genómico. Se utilizó el minikit de ADN DNeasy de Qiagen para preparar el ADN genómico a partir de celular transducidas recolectadas según el protocolo del fabricante. Las concentraciones de ADN y la calidad se evaluaron por medición de absorbancia directa utilizando espectrometría UV/vis para determinar la A260 y la relación A260/A280.

PCR cuantitativa en tiempo real. Se utilizó un instrumento PCR en tiempo real BioRad CFX96 o equivalente para llevar a cabo la PCR cuantitativa. Se mide el número de copias del pro-vector en cada muestra de ensayo utilizando oligonucleótidos cebadores de ADN específicos en conjunción con una sonda Taqman diseñada para amplificar el paquete U3/Psi integrado o pro-retrovírico frente al promotor plasmídico CMV/Psi. El título del vector se expresó en relación a una curva de número de copias de referencia. Para generar la curva de referencia de número de copias, se vertió el ADN genómico de las células PC-3 con un único plásmido que contenían la secuencia U3/Psi pro-retrovírica. Los títulos del vector de ensayo se obtuvieron calculando el número de genomas transducidos en múltiples diluciones utilizando múltiples reacciones por dilución.

Para cada evaluación de título, se llevó a cabo por triplicado un control sin armazón (pocillos que contenían todos los componentes excepto el ADN plasmídico o genómico) y un control negativo (todos los componentes incluyendo el ADN genómico equivalente de células PC-3 no transducidas). Los valores del título se expresaron en unidades de transducción por mililitro (UT/ml).

La potencia del vector de la divulgación depende de la replicación del vector y la actividad de la citosina desaminasa (CD) resultante en las células diana. Por lo tanto, el ensayo de potencia mide el aumento de actividad CD a lo largo del tiempo según se disemina la infección del vector en una línea celular previamente no infectada en un cultivo tisular. El ensayo mide la actividad enzimática de la proteína γ CD2 transferida en células transducidas durante los estadios temprano, medio y tardío de la infección controlando la conversión de 5-fluorocitosina (5-FC) en 5-fluorouracilo (5-FU), utilizando una separación por HPLC de fase inversa con detección por UV. El aumento de actividad de CD a lo largo del curso de la infección es una función del porcentaje de células infectadas a lo largo del tiempo es indicativo de la capacidad del vector TOCA 511 para replicarse. La actividad de CD basada en la tasa de conversión de 5-FC a 5-FU se mide para cada momento en unidades de CD por mg de proteína (la actividad específica, AE). El aumento de AE entonces se representa a lo largo del tiempo, y se refleja tanto el aumento de porcentaje de células transducidas como un resultado de la replicación vírica en el cultivo, y la transferencia resultante de la actividad de CD. Los datos acumulados de los múltiples ensayos y los lotes de vector se han utilizado para determinar una especificación apropiada para este aumento en la EA de CD, para la liberación de producto. El ensayo tenía puntos temporales de 1, 3 y 5 días después de la infección inicial a una MOI de aproximadamente 0,1 y un control no infectado.

La actividad de CD de las células infectadas en estadio tardío (punto temporal de 5 días) se comparó entre los lotes para evaluar el uso de esta actividad según un ensayo de identidad. En ensayo incluye las siguientes etapas:

Transducciones. Las transducciones se llevaron a cabo en un formato multipocillo en células U87. Para cada transducción, se utilizaron tres diluciones adecuadas y cada una se llevó a cabo por triplicado. Las células se recolectaron a los 0, 1, 3 y 5 días después de la transducción.

Realización de la reacción de CD. Las células se lisaron y se determinó la concentración total de proteína utilizando el ensayo de proteína BCA utilizando el BSA como referencia. Para el ensayo de la enzima γ CD2, se añadió una cantidad apropiada del lisado celular a un tampón que contenía 5-FC de manera que la tasa de formación de 5-FU se mantiene lineal durante 1-2 horas a 37 °C. El volumen final de la mezcla de reacción es de 100 μ l. Después de 2 h, la reacción enzimática se termina por adición de ácido cloroacético, en resumen, se remueve y prepara para los análisis de HPLCA posteriores. Los lisados celulares de células no transducidas se utilizan como control negativo mientras que se utiliza un ensayo similar utilizando muestras de células infectadas al 100 % como control positivo.

Análisis de HPLC. La mezcla de reacción terminada se centrifuga a 12.000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente en una microcentrífuga. El sobrenadante se decanta del aglomerado y se pasa a través de un filtro de 0,2 μ m para retirar adicionalmente las partículas antes de la inyección en una columna de HPLC de fase inversa previamente equilibrada con una fase móvil de base acuosa que contiene tampón fosfato a un pH alrededor de 4,0. Los cromatogramas se siguen a 260 nm y 280 nm para controlar tanto el consumo del sustrato como la formación de producto. Las concentraciones de sustrato o producto se determinan utilizando la graficación y capacidades del análisis en GraphPad comparándolas con las curvas de referencia generadas previamente calculadas a partir de concentraciones de sustrato o producto conocidas. Las cantidades de 5-FU generadas en 1-2 h se utilizan para determinar las unidades CD de actividad (1 unidad de actividad CD se define como la formación de un nmol de 5-FU por min) y se calcula la actividad específica dividiendo este número por la cantidad de proteína (del lisado celular) utilizado en el ensayo.

Ejemplo de referencia 7 Construcción y uso de un vector que codifica un anticuerpo de cadena sencilla contra CTLA-4 (CD 152)

Los anticuerpos de cadena sencilla se derivan de secuencias de anticuerpo completos conocidas que tiene un efecto deseado. Dichas secuencias están disponibles (por ejemplo, documentos WO2006048749, US2006165706, US7034121, números de registro en el GenBank DJ437648, CS441506, CS441500, CS441494, CS441488). Dichas secuencias de genes de anticuerpo convencionales se convierten en secuencias de anticuerpo de cadena sencilla (scFv) por método que se utilizan comúnmente conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Gilliland et al. "Rapid and reliable cloning of antibody variable regions and generation of recombinant single chain antibody fragments." Tissue Antigens 47, 1-20, 1996). Los anticuerpos de cadena contra CTLA-4 en fago también están disponibles explorando bibliotecas de fagos-scFv directamente y se pueden utilizar directamente para la inserción en los vectores retrovíricos replicantes de la presente divulgación (Pistillo et al. Tissue Antigens 55:229 2000). Independientemente de cómo se derive la secuencia los scFv tienen normalmente aproximadamente de 700-900 pb de longitud y se sintetizan por un proveedor comercial (BioBasic) con un sitio Psi1 en el extremo 5' y compatible con el sitio Not1 en el extremo 3', como se ha descrito previamente. Esta secuencia se inserta entonces en el armazón del retrovírico replicante de pAC3- γ CD2 y los sitios Psi1-Not1 después de retirar la secuencia γ CD2. El vector se produce y se titula como se ha descrito, y se purifica adicionalmente si es necesario como se ha descrito anteriormente. El CTLA-4 humano y de ratón son muy homólogos en secuencia y el retrovirus replicante de la divulgación se ensayó primero en modelos de ratón inmunocompetentes singénicos adecuados tales como el modelo CT26/Balb/c y los modelos s91 de melanoma de ratón, bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Hodge et al J. Immunol. 174:5994 2005). Se mide el resultado en cuanto a uno o más de: modulación del crecimiento tumoral; falta de toxicidad; generación de respuestas antitumorales; contracción de lesiones remotas indicando inmunidad sistémica. Las dosis están en el intervalo de 10^3 a 10^7 UT en ratones. En pacientes el vector

ese administra por inyección intralesional en el tumor, o por administración en la circulación que lleva el virus al tumor. Las dosis están en el intervalo de 10^5 a 10^{11} UT.

Ejemplo de referencia 8. Estudios de eficacia anti-melanoma con un vector que expresa un anticuerpo de cadena sencilla anti-CD152 en un modelo de melanoma en ratón

Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un nuevo vector retrovítico competente en replicación basado en MLV que tiene un anticuerpo de cadena sencilla dirigido contra el antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) al que también se hace referencia como agrupamiento de diferenciación 152 (CD152) secuencia (pAC3- α CD152) sobre el crecimiento, cuando se suministra por inyección vía intratumoral (IT) en ratones DBA/2 que albergan un melanoma subcutáneo (Cloudman S91).

Ratones

Se adquirieron ratones DBA/2 hembras (edad ~ 8 semanas) en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de llegar antes de iniciar los estudios.

Células

Las células Cloudman S91 (ATCC, Manassas VA) son de un melanoma que aparece espontáneamente derivado de ratones DBA/2. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10 % de suero fetal bovino, piruvato sódico, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Las células S91 (1×10^6 en 100 μ l) se inyectaron en el flanco derecho de ratones DBA/2.

Vector

Las preparaciones de vector se hicieron por transfección transitoria (o a partir de una línea celular productora en células HT1080, véase la solicitud de EE. UU.) con títulos de aproximadamente 7×10^6 UT/ml. Para los estudios iniciales el vector no estaba purificado o concentrado adicionalmente. Para continuar con los experimentos para determinar las curvas de respuesta de dosis completa, se preparó un material purificado con alto título con un título esperado de alrededor de 10^8 UT/ml. El vector se administra IT en un volumen de 50-100 μ l e IV en 100 μ l de dosis total/ratón de aproximadamente 7×10^5 UT/ratón. El vector que expresaba α CD152 se identifica con Toca α CD152.

Implantación del tumor e inyección del vector

Se implantó a cinco grupos de hembras DBA/2 (55 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía subcutánea con células de melanoma S91 (Día 0) y entonces se dosificaron (día 4-7 dependiendo de la tasa de crecimiento del tumor S91 aproximadamente 50-100 mm³) con un vehículo (Grupos 1), con vector de control [AC3-GFP(V), (Grupo 2), inyección intratumoral (IT) con el vector Toca α CD152 (Grupos 3), o inyección por vía intravenosa del vector Toca α CD152 (Grupo 4). Los ratones del grupo 5 no tenían tumor implantado y se inyectaron por vía intravenosa con Toca α CD152 solo.

Análisis de datos

Los análisis de crecimiento tumoral se llevaron a cabo hasta 2000 mm³ o a los 60 días basándose en el que llegara primero. 10 ratones de cada grupo se representaron en cuanto al tamaño del tumor respecto al tiempo. Se determinará la significación estadística utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Los valores de P de < 0,05 se consideran estadísticamente significativos en todos los análisis que se llevaron a cabo con el software estadístico Prism 5 (software GraphPad) o equivalente. Se tomaron también observaciones en vivo para evaluar cualquier evento adverso la expresión de α CD152 durante el tratamiento.

Resultados

El suministro de α CD152 mediante el MLV replicante IT presenta un retraso estadísticamente significativo del crecimiento en comparación con los controles. El suministro de α CD152 mediante MLV por vía intravenosa presenta un retraso estadísticamente significativo en comparación con los controles anula la carga de melanoma del modelo de ratón DBA/2-Cloudman S91.

Se llevaron a cabo estudios adicionales en animales de la siguiente manera:

Ejemplo 9. El vector vírico ACE-γCD2 es terapéutico en un xenoinjerto humano (U87) intracraneal en ratones desnudos

Se estableció un modelo de xenoinjerto intracraneal utilizando la línea celular U87 de glioma humano para ensayar la diseminación del vector RCR y su biodistribución, así como la eficacia terapéutica de la terapia genética suicida con citosina desaminasa mediada por el vector RCR en un ratón huésped desnudo.

A continuación de la aclimatación, se asignaron aleatoriamente los ratones a uno de los 8 grupos de tratamiento (véase la descripción de los grupos posteriormente). Siete grupos se sometieron a la administración intracraneal en el cuerpo estriado derecho de 1×10^5 células U87 administradas/ratón el Día 0. A los ratones del grupo 8 no se les implantó tumor. El día 5, se inyectó a los ratones solo con la formulación tampón, o con un vector RCR a $9 \times 10^5/5$ ul, $9 \times 10^4/5$ ul, o $9 \times 10^3/5$ ul. Los ratones que no recibieron vector, o el vector a $9 \times 10^5/5$ ul o $9 \times 10^3/5$ ul se distribuyeron aleatoriamente para que recibieran 5-FC 8500 mg/kg/día, administrado como una única inyección IP, empezando el Día 19, o sin 5-FC. Los ratones que recibieron el vector con la dosis media recibieron todos 5-FC (es decir, no había un grupo de control separado para esta dosis). La administración de 5-FC se continuó diariamente durante 7 días consecutivos seguido por 15 días sin tratamiento. Los ciclos de fármaco más el descanso se repitieron hasta 5 ciclos. 10 ratones de cada grupo excepto del grupo 8 se asignaron aleatoriamente a la categoría de ensayo de supervivencia. El resto de los ratones se sacrificaron de acuerdo con una programación predeterminada.

Asignación de grupos y niveles de dosis

Grupo	Artículo de ensayo	Volumen	TX del fármaco	N	N por categoría de análisis	
					(A) Análisis de supervivencia	(B) Sacrificio programado
1	Form. tampón	5 ul	ninguno	4		4 antes del primer ciclo de fármaco
2	Form. tampón	5 ul	5FC	10		
3	T5.0002	9e5/5 ul	PBS	10	10	
4	T5.0002	9e5/5 ul	5FC	25	10	3 antes de comenzar cada ciclo, 15 total
5	T5.0002	9e4/5 ul	5FC	10	10	
6	T5.0002	9e3/5 ul	5FC	25	10	3 antes de comenzar cada ciclo, 15 total
7	T5.0002	9e3/5 ul	PBS	10	10	
8 SIN TUMOR	Ninguno		5FC	15		3 antes de comenzar cada ciclo, 15 total
Número total de animales				109	60	49

La dosificación intravenosa se hizo mediante inyección en la vena caudal. La dosificación intraperitoneal se hizo mediante inyección en el abdomen teniendo cuidado de evitar la vejiga. Para la inyección intracraneal, los ratones se anestesiaron con isofluorano y se posicionaron en un dispositivo estereotáxico con barras de orejas romas. La piel se afeita y se utiliza betadine para tratar el cuero cabelludo para preparar el sitio quirúrgico. El animal se coloca en una manta eléctrica y se utiliza un bisturí en condiciones estériles para hacer una incisión en la línea media a lo largo de la piel. La retracción de la piel y la reflexión de la fascia en el sitio de incisión permite la visualización del cráneo. Se inserta una cánula guía con una proyección de 3 mm, provista de una tapa con una proyección de 3,5 mm, a través de un agujero pequeño perforado en el cráneo y se fija con cemento dental y tres pequeños tornillos al cráneo. Después de endurecerse el cemento, la piel se cierra con suturas. Las coordenadas estereotáxicas proyectadas son AP= 0,5-1,0 mm, ML = 1,8- 2,0 mm, DV = 3,0 mm. Las coordenadas estereotáxicas exactas para la cohorte de animales recibidos se determinaron en un experimento piloto (2-3 animales) inyectando un colorante y determinando su localización. Los animales se controlan durante la recuperación de la anestesia. Se administran por vía subcutánea analgésicos, buprenorfina, antes del final del procedimiento y luego la buprenorfina se administrará aproximadamente cada 12 h hasta 3 días. Los animales se controlaron a diario. Las células o el vector se infundieron por vía intracraneal a través de la cánula de inyección con una proyección de 3,5 mm insertada a través de la cánula guía. La velocidad se controló con una bomba de jeringa ajustada a una jeringa de Hamilton y un tubo

flexible. Para la inyección celular se suministró un microlitro de células a un caudal de 0,2 microlitros por minuto (5 minutos en total). Para la inyección del vector, se suministraron 5 microlitros de vector a un caudal de 0,33 microlitros por minuto (15 minutos en total).

- 5 El vector se suministró y se calculó como unidades transformantes (UT) por gramo de peso de cerebro a los ratones. Utilizando dicho cálculo se puede calcular la extrapolación de dosis para otros mamíferos incluyendo los seres humanos. La Figura 8 muestra el efecto de la dosis de vector en este modelo de ratón.

10 Ejemplo 10. El AC3-γCD2 (V) es terapéutico en un modelo de ratón singénico de cáncer cerebral

Se llevaron a cabo experimentos adicionales para demostrar los métodos y composiciones de la divulgación en un modelo animal singénico.

- 15 Se estableció un modelo de implante intracraneal utilizando la línea celular CT26 de cáncer colorrectal en ratones BALB/c singénicos para ensayar la diseminación y biodistribución del vector RCR así como la eficacia terapéutica de la terapia genética suicida con citosina desaminasa mediada por el vector RCR y su impacto inmunológico.

20 Este estudio incluía 129 animales, 0 machos, 119 hembras y 10 animales de contingencia (10 hembras). Después de la aclimatación, los ratones se asignaron aleatoriamente a uno de los 8 grupos de tratamiento (véase la descripción de grupos posteriormente). Siete grupos se sometieron a la administración intracraneal en el cuerpo estriado derecho de 1×10^4 células CT26 administradas/ratón el Día 0. A un grupo de ratones no se les implantó el tumor. El Día 4 se inyectó a los ratones formulación tampón solo, o el vector a 9×10^5 /ul, 9×10^4 /ul, o 9×10^3 /ul. Los ratones que no recibieron vector, o el vector a 9×10^5 /ul o 9×10^3 /ul se distribuyeron aleatoriamente para recibir 5-FC (500 mg/kg/BID), administrada por inyección IP, comenzando el Día 13, o no 5-FC. Los ratones que recibieron en vector a dosis media recibían 5-FC (es decir, no hay un grupo de control separado para esta dosis). La administración de 5-FC continuó a diario durante 7 días consecutivos seguido por 10 días sin tratamiento. Los ciclos de fármaco más el descanso se repitieron hasta 4 ciclos. Se asignaron aleatoriamente 10 ratones de cada grupo excepto del grupo 8 a la categoría de análisis de supervivencia. El resto de los ratones se sacrificaron de acuerdo a una programación predeterminada.

30 Se co-alojaron ratones intactos centinelas con los animales programados para el sacrificio y se hizo lo mismo en los mismos puntos temporales para evaluar la transmisión del vector mediante diseminación.

Asignación de grupos y niveles de dosis

Grupo	Artículo de ensayo	Volumen	TX del fármaco	N	N por categoría de análisis		
					(A) Análisis de supervivencia	(B) Sacrificio programado	(C) Centinelas
1	Form. tampón	5 ul	ninguno	4		4 antes del primer ciclo de fármaco	
2	Form. tampón	5 ul	5FC	10			
3	T5.0002	9e5/5 ul	PBS	10	10		
4	T5.0002	9e5/5 ul	5FC	25	10	3 antes de comenzar cada ciclo, 15 total	1 antes de comenzar cada ciclo, 5 total
5	T5.0002	9e4/5 ul	5FC	10	10		
6	T5.0002	9e3/5 ul	5FC	25	10	3 antes de comenzar cada ciclo, 15 total	1 antes de comenzar cada ciclo, 5 total
7	T5.0002	9e3/5 ul	PBS	10	10		
8 SIN TUMOR	Ninguno		5FC	15		3 antes de comenzar cada ciclo, 15 total	
Número total de animales				119	60	49	10

35 La dosificación intravenosa se hizo mediante inyección en la vena caudal. La dosificación intraperitoneal se hizo mediante inyección en el abdomen teniendo cuidado de evitar la vejiga. Para la administración intracraneal, se utilizaron ratones con una cánula guía con una proyección de 3,2 mm implantada en el cuerpo estriado derecho y provista con una tapa con una proyección de 3,7 mm. Las coordenadas estereotáxicas proyectadas eran AP= 0,5-

1,0 mm, ML = 1,8-2,0 mm, DV = 3,2 mm (según Bregma). Las células o el vector se infundieron por vía intracraneal mediante la cánula de inyección con una protección de 3,7 mm insertada a través de la cánula guía. Se controló la velocidad con una bomba de jeringa ajustada con una jeringa de Hamilton y tubos flexibles.

- 5 Para la inyección celular, se suministró 1 microlitro de células a un caudal de 0,2 microlitros por minuto (5 minutos en total). Para la inyección del vector, se suministraron 5 microlitros de vector a un caudal de 0,33 microlitros por minuto (15 minutos en total).

El vector se suministró y se calculó en unidades de transformación (UT) por gramo de peso cerebral a los ratones.

- 10 Utilizando dicho cálculo, se puede calcular la extrapolación de dosis a otros mamíferos incluyendo seres humanos. La Figura 9 muestra el efecto de la dosis de vector en este modelo de ratón cuando se suministra el vector por vía intracraneal.

15 **Ejemplo 11. Construcción y ensayo de vectores RCR que expresan miR-128-1 y miR-128-2**

A. Construcción de un vector retrovítico recombinante competente en replicación que contienen una secuencia de polinucleótido heteróloga del pri-miARN-128-1 humano

- 20 El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-miR-128-1 que expresa miR-128-1 se derivó del almacén de pAC3-γCD2 descrito en uno de los aspectos. El almacén pAC3 en el vector pAC3-miR-128-1 se aisló por digestión mediante endonucleasas del ADN plasmídico pAC3-γCD2 con MluI y NotI para retirar la secuencia de polinucleótido IRES-γCD2. La secuencia de polinucleótido ADN de pri-miR-128-1 se obtuvo a partir del producto del vector de expresión pEP-mir-128-1 (Cell BioLabs, Inc.) (SEQ ID NO: 31). La secuencia de ADN de pri-miR-128-1 se sintetizó con un sitio de enzima de restricción MluI en el extremo 5' y el sitio de la enzima de restricción NcoI en el extremo 3' de un fragmento de ADN de cadena doble para la inserción posterior del sitio correspondiente en el ADN plasmídico pAC3-γCD2 digerido con MluI y NotI descrito anteriormente. La construcción resultante pAC3-miR-128-1, codifica 3 genes: el gag, el pol y el env, y la secuencia codificante pri-miR-128-1 (Figura 11).

- 30 Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

40 *B. Construcción de un vector retrovítico recombinante competente en replicación que contenía una secuencia de polinucleótido heteróloga del pri-miARN-128-2 humano*

- 45 El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-miR-128-2 que expresa miR-128-2 se derivó del almacén de pAC3-γCD2 descrito en uno de los aspectos de la divulgación. El almacén pAC3 en el vector pAC3-miR-128-1 se aisló por digestión mediante endonucleasas del ADN plasmídico pAC3-γCD2 con MluI y NotI para retirar la secuencia de polinucleótido IRES-γCD2. La secuencia de polinucleótido ADN de pri-miR-128-2 se obtuvo a partir del análisis de secuencia del vector de expresión Lenti-miR-128-2 que expresan el pri-miR-128-2 (System Biosciences) (SEQ ID NO: 32). La secuencia de ADN de pri-miR-128-2 se sintetizó con un sitio de enzima de restricción MluI en el extremo 5' y el sitio de la enzima de restricción NcoI en el extremo 3' de un fragmento de ADN de cadena doble para la inserción posterior del sitio correspondiente en el ADN plasmídico pAC3-γCD2 digerido con MluI y NotI descrito anteriormente. La construcción resultante pAC3-miR-128-1, codifica 3 genes: el gag, el pol y el env, y la secuencia codificante pri-miR-128-2 (Figura 1).

- 55 Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

C. Construcción de un vector retrovítico recombinante competente en replicación que contienen secuencias de polinucleótido heterólogas de promotor H1 humano y pre-miARN-128 humano

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-miR-128-2 que expresa miR-128-2 se derivó del armazón de pAC3-γCD2 descrito en uno de los aspectos. El armazón pAC3 en el vector pAC3-miR-128-1 se aisló por digestión mediante endonucleasas del ADN plasmídico pAC3-γCD2 con MluI y NotI para retirar la secuencia de polinucleótido IRES-γCD2. La secuencia del polinucleótido ADN del promotor H1 humano se obtuvo a partir de la información de producto del vector de expresión pSilencer 3.1 H1 hygro (Ambion), y la secuencia de polinucleótido ADN del pre-miR-128-1 estructurado con una horquilla corta se obtuvo del <http://www.mirbase.org/>. La secuencia de ADN de pre-miR-128-1 unida al promotor H1 humano (SEQ ID NO: 33) se sintetizó con un sitio de enzima de restricción MluI en el extremo 5' y el sitio de la enzima de restricción NotI en el extremo 3' de un fragmento de ADN de cadena doble para la inserción posterior del sitio correspondiente en el ADN plasmídico pAC3-γCD2 digerido con MluI y NotI descrito anteriormente. La construcción resultante pAC3-H1-shRNAmiR128, codifica 3 genes: el gag, el pol y el env, y la secuencia pre-miR-128-1 estructurada con una horquilla corta no codificante (Figura 11).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

D. Análisis de cinética de replicación del vector retrovítico recombinante competente en replicación mediante ensayo de qPCR

Actualmente, existen al menos dos formas comunes para obtener la cinética de replicación de un vector retrovítico recombinante competente en replicación: (1) análisis de la expresión de GFP con vectores que expresan la proteína GFP mediante análisis citométricos, y (2) ensayo de transcriptasa inversa midiendo la actividad de transcriptasa inversa del vector de reserva recolectado del medio de cultivo de células transducidas. Los títulos evaluados por el análisis de ADN de células transducidas proporcionan la estimación más fiable de los títulos funcionales en comparación con los títulos obtenidos por ARN y expresión del transgén en el que los títulos se sobre-estimaban y se subestimaban, respectivamente, (Sastry et al., 2002 Gene Therapy 9, 1155-1162). La cinética de replicación de la diseminación vírica se correlaciona con el porcentaje de una población que se ha transducido en la que un ADN provírico del genoma vírico se puede detectar por qPCR con cebadores específicos de la secuencia vírica que se está ensayando en cultivo. El presente ensayo necesita una entrada iguala de ADN genómico de todos los puntos temporales con el mismo vector ensayado y entre distintos vectores si se está ensayando una comparación de cinéticas de replicación. El gráfico de cinética de replicación se generó representando los valores de C(t) invertidos frente a los puntos temporales. La Figura 12A y la Figura 12B muestran comparaciones de cinéticas de replicación de distintos vectores retrovíticos recombinantes competentes en replicación. El ensayo es sensible para revelar la pequeña diferencia de cinéticas de replicación entre distintos vectores.

E. Ensayo de cinéticas de replicación de vectores retrovíticos recombinantes competentes en replicación que contenían miR-128 en cultivo

Con el fin de confirmar que la incorporación de pri-miR-128-1, pri-miR-128-2 y la secuencia de H1-pre-miR-128-1, respectivamente, en la presente divulgación se replica normalmente, se utilizó un volumen calculado de cada reserva de vector recolectada por la transfección transitoria mencionada anteriormente para infectar células de fibrosarcoma humano, HT1080, recién preparadas y células de glioma humano, U87-MG, respectivamente, a una MOI de 0,1. Se hicieron pasajes de las células transducidas los días 3, 6 y 9 después de la infección. En cada punto temporal, se recolectó una parte de células por extracción de ADN por qPCR. Se hicieron diluciones del ADN genómico para generar alícuotas del ADN genómico con la misma concentración para la entrada de iguales cantidades genómicas en la qPCR. Se generaron las cinéticas de replicación para cada vector representando los valores de C(t) invertidos frente a los puntos temporales. La Figura 12A y 12B muestran todos los vectores ensayados replicados con cinéticas similares en comparación con el virus MLV de control.

E. Ensayo de la expresión del miR-128 maduro de células transducidas con el vector retrovítico recombinante competente en replicación que contiene miR-128

Con el fin de confirmar la expresión de miR-128 de las células transducidas con vectores retrovíticos recombinantes competentes en replicación, se expandieron las células del día 9 después de la infección que habían alcanzado la máxima infectividad (Figura 12A y Figura 12B) y se recolectaron para extraer el ARN total para la detección de la expresión del miARN maduro. Los resultados del ensayo de microARN Taqman demostraba una sobre-expresión de miR-128 maduro a partir de ambas células HT1080 y U87 transducidas con los vectores pAC3-miR-128-1, pAC3-

miR-128-2, y pAC3-H1-shRNAmiR128, respectivamente, en comparación con las células no transducidas (Figura 13). En ambas líneas celulares, las células transducidas con el vector pAC3-miR-128-1 y pAC3-H1-shRNAmiR128 expresaban un nivel más alto de miR-128 maduro que las células transducidas con el vector pAC3-miR-128-2.

5 *F. Ensayo de la expresión de Bmi-1 a partir de células transducidas con vectores retrovíricos recombinantes competentes en replicación que contienen miR-128 para demostrar la implicación con la diana de miR-12*

Se ha observado que la expresión de Bmi-1 está regulada positivamente en una variedad de cánceres humanos incluyendo el glioblastoma, y se ha demostrado que es la diana del miR-128. Para confirmar la implicación de la
10 diana con el miR-128, se detectó la expresión de Bmi-1 de las células transducidas con los vectores pAC3-miR-128-1, pAC3-miR-128-2, y pAC3-H1-shRNAmiR128, respectivamente mediante qRT-PCR. La Figura 14 muestra que las células U87-MG transducidas con los vectores pAC3-miR-128-1, pAC3-miR-128-2, y pAC3-H1-shRNAmiR128, respectivamente, expresaban un nivel menor de Bmi-1 que las células no transducidas, mientras que en las células HT1080 no se observaba una diferencia significativa entre las células transducidas y no transducidas. Los datos
15 soportan el concepto de que el miR-128 tiene un papel funcional importante en el sistema nervioso central.

Ejemplo de referencia 12. Construcción y ensayo del vector retrovívico recombinante competente en replicación que contiene secuencias de polinucleótido heterólogas de IRES, γCD2, promotor H1 humano y pre-miR-128-1 humano

20 *A. Construcción*

El vector retrovívico competente en replicación, pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 se deriva del almacén de pAC3-γCD2 descrito en uno de los aspectos de las divulgaciones. El almacén pAC3-γCD2 en el vector pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 se aisló por digestión mediante endonucleasas del ADN plasmídico pAC3-γCD2 con NotI. La
25 secuencia del polinucleótido ADN del promotor H1 humano se obtuvo a partir de la información de producto del vector de expresión pSilencer 3.1 H1 hygro (Ambion), y la secuencia de polinucleótido ADN del pre-miR-128-1 estructurada con una horquilla corta se obtuvo del <http://www.mirbase.org/>. La secuencia de ADN de pre-miR-128-1 unida al promotor H1 humano (SEQ ID NO: 34) se sintetizó con un sitio de enzima de restricción NotI en ambos
30 extremos del fragmento de ADN de cadena doble para la inserción posterior del sitio correspondiente en el ADN plasmídico pAC3-γCD2 digerido con NotI descrito anteriormente. La construcción resultante, pAC3-H1-shRNAmiR128, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env, y el γCD2, y la secuencia pre-miR-128-1 estructurada con una horquilla corta no codificante (Figura 11).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de
40 cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

45 *B. Ensayo de cinéticas de replicación vectores retrovíricos recombinantes competentes en replicación pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 en cultivo*

Con el fin de confirmar que la incorporación de H1-pre-miR-128-1 en la presente divulgación se replica normalmente, se utiliza un volumen calculado de cada reserva de vector recolectada a partir de la transfección transitoria mencionada anteriormente para infectar células de fibrosarcoma humano recientes, HT1080 y células de glioma humano, U87-MG, respectivamente, a una MOI de 0,1. Se hacen pasajes en las células transducidas el día 3, 5 y 9 después de la infección. En cada punto temporal, se recolectó una porción de células para la extracción de ADN genómico para la qPCR. Las diluciones de ADN se hacen para generar alícuotas de ADN genómico con la misma concentración para una cantidad de entrada genómica igual en la qPCR. Las cinéticas de cada vector se generaron
50 representando los valores de C(t) invertidos frente a los puntos temporales. El resultado muestra que el vector se replica con cinéticas comparables al virus MLV de control.

C. Ensayo de la expresión del miR-128 maduro a partir de células transducidas con el vector retrovívico recombinante competente en replicación pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128

60 Para confirmar la expresión de miR-128 a partir de las células transducidas con el vector retrovívico recombinante competente en replicación pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128, las células del día 9 después de la infección, en las que se había alcanzado la máxima infectividad, se expandieron y recolectaron para extraer el ARN total para la detección de la expresión del miARN maduro. El resultado de los ensayos de microARN Taqman muestra una sobre-expresión
65 de miR-128 maduro de ambas células HT1080 y U87-MG transducidas con el pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 en comparación con las células transducidas.

D. Ensayo de la expresión de Bmi-1 a partir de células transducidas con el vector retrovítico recombinante competente en replicación pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 para demostrar la implicación con la diana de miR-128

Se ha observado que la expresión de Bmi-1 está regulada positivamente en una variedad de cánceres humanos incluyendo el glioblastoma, y se ha demostrado que es la diana del miR-128. Para confirmar la implicación de la diana con el miR-128, se detectó la expresión de Bmi-1 de las células transducidas con el vector pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 mediante qRT-PCR. El resultado muestra que las células U87-MG transducidas con el vector pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 expresaban un nivel menor de Bmi-1 que las células no transducidas, mientras que en las células HT1080 no se observaba una diferencia significativa entre las células transducidas y no transducidas. Los datos soportan el concepto de que el miR-128 tiene un papel funcional importante en el sistema nervioso central.

E. Ensayo de la expresión de γCD2 a partir de células transducidas con pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 mediante transferencia inmunitaria

Para confirmar la expresión de γCD2 a partir de células transducidas con el vector retrovítico recombinante competente en replicación pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128, las células del día 9 después de la infección, en el que se alcanzaba la máxima infectividad se expandieron y cultivaron para extraer la proteína total para la detección de la expresión de γCD2. El resultado de la transferencia inmunitaria muestra una expresión normal de γCD2 de ambas células HT1080 y U87-MG transducidas con el pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128 en comparación con las células transducidas con el pAC3-γCD2.

Ejemplo de referencia 13: Ensayo de la estabilidad de vector de vectores retrovíticos recombinantes que contienen miR-128 en cultivo

Se ensayaron múltiples ciclos de infección en serie de vectores retrovíticos recombinantes que contenían miR-128 (pAC3-miR-128-1, pAC3-miR-128-2, y pAC3-H1-shRNAmiR128 y pAC3-γCD2-H1-shRNAmiR128) para evaluar la estabilidad de los vectores. Se infectaron inicialmente las células HT1080 y U87-MG con los vectores a una MOI baja y se permitió que se diseminaran en el cultivo. Se recolectaron reservas de vector en cada ciclo de infección, si filtraron diluidos hasta células infectadas recientes. Al final de cada ciclo de infección, se recolectaron las células y se extrajo el ADN genómico para evaluar la estabilidad del transgén mediante PCR convencional utilizando cebadores que se unen a 3' del gen env y 3' de la región no traducida del vector corriente arriba de la LTR 3'. El resultado demuestra que todos los vectores ensayados se mantienen estables durante al menos más de 8-20 ciclos.

Ejemplo de referencia 14: Estudios de eficacia antitumoral con un vector que expresa un miARN en un modelo de xenoinjerto de ratón/humano

Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un nuevo vector retrovítico competente en replicación basado en MLV que tiene la secuencia de miR-128 (AC3-miR128-1(V); AC3-miR128-2(V); AC3-miR128-3(V)) sobre la supervivencia, cuando se suministra por inyección vía intracraneal (IC) en ratones desnudos que albergan un xenoinjerto de glioma humano con tres niveles de dosis de Toca 511.

Ratones

Se adquirieron ratones atímicos nude-Foxn1^{un} (desnudos) hembras (edad ~ 8 semanas) en Harlan (Indianápolis, IN). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de llegar. Los ratones se sometieron a la colocación quirúrgica de una cánula guía permanente con una proyección de 3,0 mm implantada en el cuerpo estriado derecho, y provisto con un tapón que contenía una proyección de 3,5 mm. Las coordenadas estereotáxicas eran AP = +0,5 mm, ML = -1,8 mm (de Bregma).

Células

Las células U87-MG (ATCC, Manassas VA) se derivan de un glioma maligno de una mujer de raza blanca de 44 años de edad. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10 % de suero fetal bovino, piruvato sódico, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Las células U87-MG (1E5 en 1 pl) se infundieron a 0,2 µl por minuto (5 minutos, seguido por un descanso de 5 minutos) IC mediante una cánula de inyección con una protección de 3,5 mm insertada a través de la cánula guía.

Las preparaciones de vector se hicieron por transfección transitoria (o a partir de una línea celular productora a la que se hace referencia como provisional) y todas con títulos de aproximadamente 5E6 UT/ml. Para los estudios iniciales el vector no estaba purificado o concentrado adicionalmente. Para continuar con los experimentos para determinar las curvas de respuesta de dosis completa, se preparó un material purificado con alto título con un título de alrededor de 10E8/ml. El vector se administra IC en un volumen de 5 µl o menos para una dosis total mínima/ratón de aproximadamente 2,5E4 UT/ratón.

Implantación del tumor e inyección del vector

Se implantó a seis grupos de ratones hembras Foxn1^{un} desnudos (65 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía IC con células tumorales U87 (Día 0) y entonces se dosificaron (día 4-7 dependiendo de la tasa de crecimiento de las células U87) con un vehículo (Grupos 1), con vector de control (AC3-GFP(V), (Grupo2), o IC con (AC3-miR128-1(V); AC3-miR128-2(V); AC3-miR128-3(V) (Grupos 3-5). Los ratones del grupo 6 no tenían tumor implantado ni vector.

Análisis de datos

Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo en 10 ratones de cada grupo 1-6 y se representaron en un gráfico de Kaplan Meyer. Las curvas de supervivencia se comparan por el ensayo de intervalo logarítmico. Los valores de P de < 0,05 se consideran estadísticamente significativos en todos los análisis que se llevaron a cabo con el software estadístico Prism 5 (software GraphPad) o equivalente.

Los resultados del tratamiento con los vectores presentan una ventaja de supervivencia estadísticamente significativa en este modelo de xenoinjerto de glioma humano en comparación con el tratamiento con el vector de control o el vehículo solo.

Ejemplo de referencia 15: Estudios de eficacia antitumoral con el vector que expresa γ CD2 y miARN en un modelo de xenoinjerto de ratón/humano

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un nuevo vector retrovírico competente en replicación basado en MLV que expresa γ CD2 y miR-128 denominado AC3- γ CD2-H1-shRNAmiR128 (V) sobre la supervivencia, cuando se suministra por inyección vía intracraneal (IC) en ratones desnudos que albergan un xenoinjerto de glioma humano enriquecido tipo "célula madre", con tres niveles de dosis.

Se adquirieron ratones atímicos nude-Foxn1^{un} (desnudos) hembras (edad ~ 8 semanas) en Harlan (Indianápolis, IN). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de llegar. Los ratones se sometieron a la colocación quirúrgica de una cánula guía permanente con una proyección de 3,0 mm implantada en el cuerpo estriado derecho, y provisto con un tapón que contenía una proyección de 3,5 mm. Las coordenadas estereotáxicas eran AP = +0,5 mm, ML = -1,8 mm (de Bregma).

Pasajes tempranos de glioma humano primario (Dr. Carol Kruse, Burnham Biomedical Res Inst, San Diego, CA) se cultivaron en medio libre de suero con un suplemento de EGF, bFGF y B27. Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Se infundieron aproximadamente 1000 células en 1 μ l a 0,2 μ l por minuto (5 minutos, seguido por un descanso de 5 minutos) IC mediante una cánula de inyección con una protección de 3,5 mm insertada a través de la cánula guía.

Las preparaciones de vector se hicieron por transfección transitoria (o a partir de una línea celular productora a la que se hace referencia como provisional) y todas con títulos de aproximadamente 5E6 UT/ml. Para los estudios iniciales el vector no estaba purificado o concentrado adicionalmente. Para continuar con los experimentos para determinar las curvas de respuesta de dosis completa, se preparó un material purificado con alto título con un título de alrededor de 10E8/ml. El vector se administra IC en un volumen de 5 μ l o menos para una dosis total mínima/ratón de aproximadamente 2,5E4 UT/ratón.

Implantación del tumor e inyección del vector

Se implantó a seis grupos de ratones hembras Foxn1^{un} desnudos (66 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía IC con células "tipo madre" (Día 0) y entonces se dosificaron IC los días 7-14 después de la implantación tumoral dependiendo de la tasa de crecimiento de las células con los Grupos 1: vehículo; Grupo 2: vector control AC3-GFP(V); Grupo 3: TOCA511; Grupo 4: AC3-H1-shRNAmiR128 (V); Grupo 5: AC3- γ CD2-H1-shRNAmiR128 (V); y Grupo 6: los ratones del grupo 6 no tenían tumor implantado ni vector.

Análisis de datos

Los análisis de supervivencia hasta el día 60 se llevaron a cabo en 10 ratones de cada grupo 1-5 y se representaron en un gráfico de Kaplan Meyer. Las curvas de supervivencia se comparan por el ensayo de intervalo logarítmico. Los valores de P de < 0,05 se consideraban estadísticamente significativos en todos los análisis, que se llevaron a cabo con el software estadístico Prism 5 (software GraphPad) o equivalente.

Resultados

Los resultados del tratamiento con los vectores presentan una ventaja de supervivencia estadísticamente significativa en este modelo de xenoinjerto de glioma humano en comparación con el tratamiento con el vector de control o el vehículo solo.

A. Construcción de un vector retrovítico competente en replicación que expresa GFP y que contiene una única copia de la secuencia diana 142-3p

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-emd-142-3pT, que codifica GFP se derivaba del armazón del pAC3-emd descrito anteriormente (patente existente actual). El armazón pAC3-emd del vector pAC3-emd-142-3pT se aisló por digestión con endonucleasas del ADN plasmídico pAC3-emd con NotI. La secuencia diana perfectamente complementaria de miR142-3pT se obtuvo de la bibliografía publicada (Brown et al., 2006 Nature Medicine 12:5 585-591). La secuencia diana del miR142-3pT (SEQ ID NO: 35) se sintetizó con un sitio de enzima de restricción NotI presente en cada extremo del fragmento de ADN de doble cadena para la inserción posterior en el sitio correspondiente del ADN plasmídico pAC3-emd. La orientación de la inserción 142-3p se confirmó por análisis de secuenciación. La construcción resultante, pAC3-emd-142-3pT, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env y el emd, y la secuencia no codificante 142-3pT (Figura 15).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

B. Construcción del vector retrovítico competente en replicación que expresa γCD2 y que contiene una única copia de la secuencia diana 142-3p

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-γCD2-142-3pT, que codifica el gen γCD2 se derivaba del armazón de pAC3- γCD2 descrito anteriormente (patente existente actual). El armazón pAC3- γCD2 del vector pAC3-γCD2-142-3pT, se aisló por digestión por endonucleasas del ADN plasmídico pAC3- γCD2 con NotI. La secuencia diana perfectamente complementaria de miR142-3pT se obtuvo de la bibliografía publicada (Brown et al., 2006 Nature Medicine 12:5 585-591). La secuencia diana del miR142-3p (SEQ ID NO: 35) se sintetizó con el sitio de la enzima de restricción NotI presente en cada extremo del fragmento de ADN de doble cadena para la inserción posterior en el sitio correspondiente del ADN plasmídico pAC3- γCD2. La construcción resultante pAC3-γCD2-142-3pT, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env, y el γCD2, y la secuencia no codificante 142-3pT (Figura 16).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

C. Construcción de un vector retrovítico competente en replicación que expresa GFP y contiene 4 copias de la secuencia diana 142-3p

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-emd-142-3pT4X, que codifica GFP se derivaba del armazón del pAC3-emd descrito anteriormente (patente existente actual). El armazón pAC3-emd del vector pAC3-emd-142-3pT4X se aisló por digestión con endonucleasas del ADN plasmídico pAC3-emd con NotI. La secuencia diana perfectamente complementaria con cuatro repeticiones en tándem de miR142-3pT4X se obtuvo de la bibliografía publicada (Brown et al., 2006 Nature Medicine 12:5 585-591). La secuencia diana del miR142-3pT4X (SEQ ID NO: 36) se sintetizó con un sitio de enzima de restricción NotI presente en cada extremo del fragmento de ADN de doble cadena para la inserción posterior en el sitio correspondiente del ADN plasmídico pAC3-emd. La orientación de la inserción 142-3p se confirmó por análisis de secuenciación. La construcción resultante, pAC3-emd-142-3pT4X, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env y el emd, y la secuencia no codificante 142-3pT4X (Figura 15).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células

PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

D. Construcción del vector retrovítico competente en replicación que expresa γ CD2 y contiene 4 copias de la secuencia diana 142-3p

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3- γ CD2-142-3pT4X, que codifica GFP se derivaba del armazón del pAC3-emd descrito anteriormente (patente existente actual). El armazón pAC3-emd del vector pAC3- γ CD2-142-3pT4X se aisló por digestión con endonucleasas del ADN plasmídico pAC3- γ CD2 con NotI. La secuencia diana perfectamente complementaria con cuatro repeticiones en tándem de miR142-3pT4X se obtuvo de la bibliografía publicada (Brown et al., 2006 Nature Medicine 12:5 585-591). La secuencia diana del miR142-3pT4X (SEQ ID NO: 36) se sintetizó con un sitio de enzima de restricción NotI presente en cada extremo del fragmento de ADN de doble cadena para la inserción posterior en el sitio correspondiente del ADN plasmídico pAC3- γ CD2. La orientación de la inserción 142-3pT4X se confirmó por análisis de secuenciación. La construcción resultante, pAC3-emd-142-3pT4X, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env y el emd, y la secuencia no codificante 142-3pT4X (Figura 16).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

Ejemplo 17. Graficación de las cinéticas de replicación de vector retrovítico recombinante por ensayo qPCR

Actualmente, existen al menos dos formas comunes para obtener la cinética de replicación de un vector retrovítico recombinante competente en replicación: (1) análisis de la expresión de GFP con vectores que expresan la proteína GFP mediante análisis citométricos, y (2) ensayo de transcriptasa inversa midiendo la actividad de transcriptasa inversa del vector de reserva recolectado del medio de cultivo de células transducidas. Los títulos evaluados por el análisis de ADN de células transducidas proporcionan la estimación más fiable de los títulos funcionales en comparación con los títulos obtenidos por ARN y expresión del transgén en el que los títulos se sobre-estimaban y se subestimaban, respectivamente, (Sastry et al., 2002 Gene Therapy 9, 1155-1162). La cinética de replicación de la diseminación vírica se correlaciona con el porcentaje de una población que se ha transducido en la que un ADN provírico del genoma vírico se puede detectar por qPCR con cebadores específicos de la secuencia vírica que se está ensayando en cultivo. El presente ensayo necesita una entrada iguala de ADN genómico de todos los puntos temporales con el mismo vector ensayado y entre distintos vectores si se está ensayando una comparación de cinéticas de replicación. El gráfico de cinética de replicación se generó representando los valores de C(t) invertidos frente a los puntos temporales. La Figura 17A y la Figura 17B muestran comparaciones de cinéticas de replicación de distintos vectores retrovíticos recombinantes competentes en replicación. El ensayo es sensible para revelar la pequeña diferencia de cinéticas de replicación entre distintos vectores.

Ejemplo de referencia 18. Ensayo de cinéticas de replicación

Vectores retrovíticos recombinantes que contienen 142-3pT en líneas celulares humanas no hematopoyéticas

Con el fin de confirmar que la incorporación de la secuencia 142-3pT en la presente divulgación se replica de manera similar a sus vectores parentales, se utiliza un volumen calculado de cada reserva de vector recolectada a partir de la transfección transitoria mencionada anteriormente para infectar células de fibrosarcoma humano recientes, HT1080 y células de glioma humano, U87-MG, respectivamente, a una MOI de 0,1. Se hacen pasajes en las células transducidas el día 3, 5 y 9 después de la infección. En cada punto temporal, se recolectó una porción de células para la extracción de ADN genómico para la qPCR. Las diluciones de ADN se hacen para generar alícuotas de ADN genómico con la misma concentración para una cantidad de entrada genómica igual en la qPCR.

Las cinéticas de cada vector se generaron representando los valores de C(t) invertidos frente a los puntos temporales. La Figura 17A y 18A muestran que todos los vectores ensayados se replican con cinéticas similares en comparación con sus vectores parentales (pAC3-emd y pAC3- γ CD2). Las cinéticas de replicación de los vectores que expresan la proteína GFP (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) también se evaluaron por análisis de citometría de flujo. La Figura 3B y 4B muestran que los vectores pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X se replicaban con una cinética similar que su vector parental, pAC3-emd.

A. Ensayo de cinéticas de replicación de vectores retrovíricos recombinantes que contienen 142-3pT en células hematopoyéticas humanas y de ratón

La expresión del miR-142-3p maduro se confirmó primero en una línea celular EL4 de linfocitos T, una línea celular SUP-T1 de linfocitos T humanos y una línea celular U937 monocítica humana mediante un ensayo de microARN Taqman utilizando el conjunto de cebadores específicos para el miR-142-3p humano y de ratón ya que las secuencias del miR-152-3p maduras de las dos especies son idénticas. Las cinéticas de replicación del vector retrovílico recombinante que expresa la GFP (pAC3-emd) se ensayó en las tres líneas celulares con una infección inicial a una MOI de 2. La Figura 19 muestra que el vector pAC3-emd se replicaba eficazmente en linfocitos T y monocitos humanos (SUP-T1 y U937) según la diseminación vírica alcanzaba un 65 % y 95 % de la población celular, respectivamente, el día 28 después de la infección. La diseminación del vector en células EL4 permanecía en menos del 5 % durante el marco de tiempo ensayado.

Ejemplo de referencia 18A: Ensayo de la diseminación del vector de vectores retrovíricos recombinantes que contienen 142-3pT en células hematopoyéticas humanas y de ratón

Se ensayó el efecto funcional de miR-142-3p en la supresión de la expresión de GFP en el vector retrovílico recombinante que expresa GFP por análisis de citometría de flujo. Se utilizó el volumen calculado de reserva de vector de pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X recolectados a partir de la transfección transitoria mencionada anteriormente para infectar las células EL4, SUP-T1 y U937 a una MOI de 2. Una porción de las células se recolectó el día 6, 12 y 18 después de la infección para el análisis de expresión de GFP por análisis de citometría de flujo. La Figura 20A muestra que la expresión de GFP estaba suprimida a nivel de fondo en células EL4 transducidas con el vector pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X en comparación con su vector parental pAC3-emd. La supresión de GFP se mantenía persistente en el intervalo de tiempo ensayado. La Figura 20B y Figura 20C muestra la sorprendente supresión de la expresión de GFP en células SUP-T1 y U937 transducidas con el vector pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X, respectivamente, en comparación con su vector parental pAC3-emd. Los resultados confirman que la expresión de miR-142-3p en células hematopoyéticas humanas y de ratón suprime eficazmente la expresión de GFP en células transducidas con vectores retrovíricos recombinantes que contienen la secuencia 142-3pT. En las células U937, el resultado sugiere que el vector que contiene 4 copias de 142-3pT (pAC3-emd-142-3pT4X) puede ser más eficaz en la supresión de la expresión de GFP que el vector que contiene una única copia de 142-3pT (pAC3-emd-142-3pT).

Ejemplo de referencia 19: Ensayo del ARN genómico vírico

No está claro si el efecto funcional del pAC3-emd-142-3pT en la supresión de la expresión de GFP mencionada anteriormente es debido a supresión directa de la expresión de GFP a nivel traduccional o debido a degradación del genoma vírico a nivel postranscripcional. Una porción de células al final del punto temporal experimental se recolectó para la extracción de ARN total utilizando un método de biología molecular convencional. Se llevó a cabo una qRT-PCR utilizando cebadores (por ejemplo, el conjunto de cebadores pol y el conjunto de cebador env2) específico del ADNc derivado del ARNd vírico transcrito inversamente para evaluar la carga vírica de las células transducidas. Los resultados muestran que la carga vírica de las células transducidas con pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X, respectivamente es significativamente menor que las células transducidas con el vector pAC3-emd. El resultado apoya el concepto de que el miR-142-3p en las células hematopoyéticas humanas y de ratón degrada eficazmente el genoma de ARN vírico a nivel post transcripcional, y por lo tanto, restringe la diseminación del vector en células hematopoyéticas humanas y de ratón.

Ejemplo de referencia 20: Ensayo del ADN provírico integrado mediante qPCR

No está claro si el efecto funcional del pAC3-142-3pT en la supresión de la expresión de GFP mencionada anteriormente es debido a supresión directa de la expresión de GFP a nivel traduccional o debido a degradación del genoma vírico y por lo tanto la integración del ADN provírico. Una porción de células al final del punto temporal experimental se recolectó para la extracción de ARN total utilizando un método de biología molecular convencional. Se llevó a cabo una qPCR utilizando cebadores específicos del ADN provírico integrado para evaluar el número de copias de ADN provírico integrado por célula. El resultado muestra que el número de copias por célula de las células transducidas con pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X, respectivamente es significativamente menor que las células transducidas con el vector pAC3-emd. El resultado apoya el concepto de que el miR-142-3p en las células hematopoyéticas humanas y de ratón degrada eficazmente el genoma de ARN vírico a nivel post transcripcional, y por lo tanto, restringe la diseminación del vector en células hematopoyéticas humanas y de ratón.

Ejemplo de referencia 21: Ensayo de la estabilidad del vector de vectores retrovíricos recombinantes que contienen 142-3pT en cultivo

Se ensayaron ciclos de infección múltiple en serie de vectores víricos recombinantes que contenían 142-3pT para evaluar la estabilidad de los vectores. Las células HT1080 y U87-MG se infectaron inicialmente con vectores a una MOI baja y se permitió que se diseminaran en cultivo. Se recolectaron vectores de reserva en cada ciclo de infección, se filtraron y diluyeron para infectar células recientes. Al final de cada ciclo de infección, las células se

recolectaron y se extrajo el ADN genómico para la evaluación de la estabilidad del transgén por PCR convencional utilizando cebadores que se unen al 20 del gen env y 3' de la región no traducida en el vector corriente abajo de la secuencia de polinucleótido heteróloga unida al IRES. El resultado muestra que los vectores que contienen la copia única de 142-3pT (pAC3-emd-142-3pT y pAC3- γCD2-142-3pT) se mantienen estables al menos durante 10-20 ciclos, mientras que los vectores que contienen 4 repeticiones en tándem de 142-3pT (pAC3-emd-142-3pT4X y pAC3- γCD2-142-3pT4X) muestra una eliminación de la secuencia 142-3pT en los ciclos tempranos de infección.

Ejemplo de referencia 22: Ensayo de la diseminación del vector controlada de vectores retrovíricos recombinantes que contienen 142-3pT *in vivo*

Este experimento se llevó a cabo con el mismo diseño del Ejemplo 27 posterior. El efecto funcional de miR-142-3p en la restricción de la diseminación del vector mediante células hematopoyéticas se ensayó *in vivo* mediante la inyección intravenosa de vectores retrovíricos recombinantes (pAC3-emd, pAC3-emd-142-3pT y pAC3-emd-142-3pT4X) en ratones Balb/C de 8 sem de edad con xenoinjertos de U87 implantados. Para cada vector, hay tres grupos de ratones que cada uno representa un punto temporal (por ejemplo, 30 días, 60 días y 90 días después de la administración del vector vírico). Una dosis de 1E4 a 1E7 UT de cada vector de reserva se administra por inyección intravenosa a todos los animales. Los animales de cada punto temporal se sacrificaron y se recolectaron el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea y el tumor. La expresión de GFP de la subpoblación de células (por ejemplo, CD4+, CD8+, y etc.) se recolectó y analizó por análisis de citometría de flujo. En un experimento duplicado, los animales de cada punto temporal se sacrificaron y los tejidos (por ejemplo, hígado, riñón, bazo, tumor, etc.) se recolectaron para la extracción de ADN genómico. Se llevó a cabo la qPCR para evaluar la presencia de ADN provírico integrado en los tejidos recolectados. El resultado muestra que la diseminación del vector de los vectores que contenían la 142-3pT estaba significativamente reducida en tejidos hematopoyéticos demostrando la reducción de la replicación del vector en estos tejidos. Al mismo tiempo la señal de GF y PCR se sigue observando en el tumor, demostrando que las secuencias miR diana tienen una diseminación deprimida en los tejidos linfoides, pero aún mantiene la diseminación en el tejido tumoral.

Ejemplo 23. Extensión de la supervivencia en un paciente canino con glioma maligno recurrente espontáneo y tratado con el vector T5.0002 más 5-FC

Un Bóxer macho de 35 kg, que presentaba un oligodendroglioma anaplásico recurrente 3 meses después de la resección quirúrgica completa, se trató con virus T5.0002, purificado y formulado (véase, el documento US 5792643; T. Rodríguez et al. J Gene Med 9:233 2007; Solicitud de EE. UU. 61218063) en Tris/NaCl isotónico pH 7,2 se hacían isotónicos con manitol y sacarosa, 1 mg/ml de HSA, 0,1 mg/ml de ascorbato) en combinación con 5-FC. El tumor medía aproximadamente 13 cm³, y producía compresión del ventrículo mayor lateral y cambiaba significativamente la línea media (véase la Figura 21). Debido al gran tamaño del tumor, se infundió Toca 411 a través de 2 catéteres separados (400 μl y 480 μl), utilizando un Suministro de Convección Aumentada (CED). La dosis total de Toca 511 administrada era aproximadamente de 4,1 x 10⁶ UT/g de cerebro. Se añadió ProHance® (gadoteridol) al Toca 511 antes de la inyección para permitir la visualización del suministro por MRI. El volumen de distribución del vector se estimaba que era aproximadamente del 10-12 % del volumen tumoral.

Las Figuras 21A y 21B son fotografías de las imágenes del MRI obtenidas del perro paciente durante la infusión intratumoral CED de Toca 511 y gadolinio. Nótese que el gran tumor del lado izquierdo de la imagen comprende ambos lados del cerebro y cambia las estructuras de la línea media a la derecha. Las áreas blancas son la infusión de gadolinio-Toca 511. La Figura 21B muestra la colocación de los dos catéteres en el tumor.

Se permitió que Toca 511 se diseminara durante 8 días. El perro se trató con 5-FC a una dosis dividida de 130 mg/kg/día, por boca, tres veces al día concomitante durante 5 días. La dosis se aumentó a 160 mg/kg/día durante 2 días más (7 días de 5-FC en total). Un seguimiento con MRI no demostraba cambios en el tamaño del tumor y algunos cambios posibles en el área interna del tumor. Después de 21 días de diseminación vírica, se inició un segundo ciclo de 5-FC a la dosis más alta de 160 mg/kg/día (dividido en tres veces al día, con comida). El fármaco se paró después del quinto día de dosificación debido al desarrollo de sarpullido.

La MRI llevada a cabo a las 2 semanas después del primer curso de 5-FC y dos semanas después del segundo curso de 5-FC (7 semanas después de que el tratamiento comience) como se muestra que el tumor se aplanaba, mientras que la tasa de crecimiento tumoral declinaba. El paciente se volvió más alerta y activo, y se mantuvo clínicamente estable, 13 semanas después de la inyección del vector. En el momento de la escritura el perro seguía vivo. El periodo de vida estimado del perro era no más de 3-4 semanas en el momento de la inyección inicial del vector. La eficacia de la combinación de Toca 511/5-FC en este perro paciente se muestra por la supervivencia de 3 o 4 veces más que lo estimado originalmente por su veterinario encargado.

Ejemplo de referencia 24: Construcción de vectores con interferón gamma**A. Construcción y ensayo de un vector retrovítico competente en replicación que codifica el gen del IFN-gamma humano**

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-hIFNg, que codifica el gen del IFN-gamma humano, se derivó del armazón pAC3- γ CD2 descrito anteriormente. El armazón de pAC3 en el vector pAC3-hIFNg se aisló por digestión con endonucleasa del ADN plasmídico pAC3- γ CD2 con PstI y NotI. La secuencia de ADNc del gen del IFN-gamma humano se identificó y se confirmó entre tres secuencias obtenidas de los diferentes números de registro (AM903379, BC070256, y NM000619). El alineamiento de secuencia presentaba una secuencia idéntica entre las tres. La fase de lectura abierta del IFN-gamma humano (SEQ ID NO: 38) se sintetizó con el sitio de enzimas de restricción PstI y NotI presentes en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente del armazón pAC3. La construcción resultante, pAC3-hIFNg, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env, y el IFN-gamma humano (Figura 22).

El vector de reserva se produjo por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células HT1080 utilizando el reactivo de transfección FUGENE HD. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recolectó el sobrenadante que contenía el vector y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. El volumen específico del vector de reserva sin diluir se utilizó para infectar un HT1080 con un 75 % de confluencia. El día 4 y el día 5 después de la infección, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros del vector de reserva recolectado para infectar células de cáncer prostático humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir una replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de titulación. El título de los vectores de reserva se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

La expresión del IFN-gamma humano se ensayó primero a nivel de ARN. Se extrajo el ARN total a partir de las células HT1080 transducidas a los 5 días después de la infección en la segunda infección utilizando el método convencional de extracción de ARN. Se llevó a cabo la RT-PCR para detectar la expresión de IFN-g humano. SE utilizaron cincuenta nanogramos de ARN total en la reacción RT para generar el ADNc. Un décimo del volumen de la reacción RT se utilizó posteriormente para la PCR utilizando un conjunto de cebadores de PCR específico para el IFN humano. El resultado del RT-PCR demostraba que el IFN-gamma humano se expresa en las células HT1080 infectadas con el vector pAC3-hIFNg.

La expresión del IFN proteico humano secretado se ensayó mediante ELISA convencional. El vector de reserva recolectado el día 4 y día 5 después de la infección se diluyó en serie en el ensayo ELISA con el fin de obtener un intervalo lineal entre la concentración proteica y el factor de dilución. El resultado demostraba que el IFN proteico humano se secreta en una concentración más alta por las células HT1080 al día 5 después de la infección que por las células el día 4 después de la infección (Fig. 24). Las células el d 5 después de la infección secretaban aproximadamente 325-355 pg/ml de IFN-gamma proteico humano.

B. Construcción y ensayo de un vector retrovítico competente en replicación que codifica el gen IFN-gamma de ratón

El vector retrovítico competente en replicación, pAC3-mIFNg, que codifica el gen del IFN-gamma de ratón, se derivó del armazón pAC3- γ CD2 descrito anteriormente. El armazón de pAC3 en el vector pAC3-mIFNg se aisló por digestión con endonucleasa del ADN plasmídico pAC3- γ CD2 con PstI y NotI. La secuencia de ADNc del gen del IFN-gamma de ratón se identificó y se confirmó entre tres secuencias obtenidas de los diferentes números de registro (BC119063, BC119065 y NM008337). El alineamiento de secuencia presentaba una secuencia idéntica entre las tres. La fase de lectura abierta del IFN-gamma de ratón (SEQ ID NO: 38) se sintetizó con el sitio de enzimas de restricción PstI y NotI presentes en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente del armazón pAC3. La construcción resultante, pAC3-mIFNg, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env, y el IFN-gamma de ratón (Figura 22).

El vector de reserva se produjo por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células HT1080 utilizando el reactivo de transfección FUGENE HD. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recolectó el sobrenadante que contenía el vector y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. El volumen específico del vector de reserva sin diluir se utilizó para infectar un HT1080 con un 75 % de confluencia. El día 4 y el día 5 después de la infección, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros del vector de reserva recolectado para infectar células de cáncer prostático humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir una replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, el ADN genómico de las células PC3 infectadas se extrajo para el ensayo de titulación. El título de los vectores de reserva se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

La expresión del IFN-gamma de ratón se ensayó primero a nivel de ARN. Se extrajo el ARN total a partir de las células HT1080 transducidas a los 5 días después de la infección en la segunda infección utilizando el método convencional de extracción de ARN. Se llevó a cabo la RT-PCR para detectar la expresión de IFN-g de ratón. SE utilizaron cincuenta nanogramos de ARN total en la reacción RT para generar el ADNc. Un décimo del volumen de la reacción RT se utilizó posteriormente para la PCR utilizando un conjunto de cebadores de PCR específico para el IFN de ratón (Fig. 23). El resultado del RT-PCR demostraba que el IFN-gamma de ratón se expresa en las células HT1080 infectadas con el vector pAC3-mIFNg.

La expresión del IFN-gamma proteico humano secretado se ensayó mediante ELISA convencional. El vector de reserva recolectado el día 4 y día 5 después de la infección se diluyó en serie en el ensayo ELISA con el fin de obtener un intervalo lineal entre la concentración proteica y el factor de dilución. El resultado demostraba que el IFN proteico se secreta en una concentración más alta por las células HT1080 al día 5 después de la infección que por las células el día 4 después de la infección (Fig. 25). Las células el d 5 después de la infección secretaban aproximadamente 33-42 ng/ml de IFN-gamma proteico de ratón.

Ejemplo de referencia 25: Estudios de eficacia antitumoral con un vector de expresión de interferón gamma en un modelo de tumor subcutáneo de ratón

Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un nuevo vector retroviral competente en replicación basado en MLV que alberga la secuencia de interferón gamma murino (pAC3-mIFNg) sobre el crecimiento tumoral, cuando se suministra mediante inyección intratumoral (IT) en ratones BALB/c que albergan un carcinoma de colon subcutáneo (CT26.WT).

Ratones

Los ratones BALB/c hembras (de ~ 8 semanas de edad) se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de la llegada antes de iniciar los estudios.

Células

Las células CT26.WT (ATCC, Manassas VA) son una línea celular de carcinoma de colon indiferenciado inducidas por N-nitroso-N-metiluretano (NNMU). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10 % de suero bovino fetal, piruvato sódico, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Las células CT26.WT (2E5 en 100 µl) se inyectaron en el flanco derecho de los ratones BALB/C.

Vector

Las preparaciones del vector se hicieron por transfección transitoria (o de una línea celular productora después de la infección de una segunda línea celular con el virus infeccioso de la transfección inicial; Solic. de EE.UU. 61218063) con títulos de aproximadamente 3E6 UT/ml. Para los estudios iniciales el vector no se purifica o concentra adicionalmente. Para los siguientes experimentos para determinar las curvas de respuesta de dosis completa, se prepara un material purificado con alto título con un título esperado alrededor de 10E8 /ml. Para conseguir un material con alto título, se escogió la línea celular CF2 canina para la producción ya que el interferón gamma es poco reactivo entre especies y el uso de líneas celulares xenogénicas evitará la acción inhibitoria del interferón gamma en las células productoras. El vector se purifica y se concentra como se describe en la memoria descriptiva. El vector se administra IT en un volumen de 100 µl y la dosis total/ratón de aproximadamente 3E3, 3E4 y 3E5 UT/ratón. Se identificó el vector que expresaba el interferón gamma como Toca 621.

Implantación del tumor e inyección del vector

Se les implantó a nueve grupos de hembras BALB/c (99 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía subcutánea con células tumorales CT26.WT (Día 0) y entonces se dosificaron (día 4-7 dependiendo de la tasa de crecimiento del tumor CT26; aproximadamente 50-100 mm³) con vehículo (Grupo 1), con vector de control (AC3-GFP (V), (Grupo 2), inyección IT del vector Toca 621 (Grupos 3-5), o inyección intravenosa del vector Toca 621 (Grupos 6-8). Los ratones del grupo 9 no tenían implantado tumor y se les inyectó solo el vector por vía intravenosa.

Análisis de datos

Los análisis de crecimiento tumoral se llevaron a cabo hasta 2000 mm³ o a los 60 días basándose en el que llegara primero. 10 ratones de cada grupo se representaron en cuanto al tamaño del tumor respecto al tiempo. Se determinará la significación estadística utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Los valores de P de < 0,05 se consideran estadísticamente significativos en todos los análisis que se llevaron a cabo con el software estadístico

Prism 5 (software GraphPad) o equivalente. Se tomaron también observaciones en vivo para evaluar cualquier evento adverso con la administración de Toca 621.

Resultados

5 Los resultados de medición del tamaño tumoral a lo largo del tiempo muestran una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de tumores tratados con el vector que expresa el IFN gamma sobre los tumores en animales que recibían el vector de control o vehículo.

10 **Ejemplo de referencia 26: Estudios de eficacia antitumoral con un vector que expresa el interferón gamma en un modelo de tumor subcutáneo en el ratón.**

Objetivo

15 El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un nuevo vector retroviral competente en replicación basado en MLV que alberga la secuencia de interferón gamma murino (pAC3-mIFNg) sobre el crecimiento tumoral, cuando se suministra mediante inyección intratumoral (IT) en ratones BALB/c que albergan un carcinoma de colon subcutáneo (CT26.WT).

20 *Ratones*

Los ratones BALB/c hembras (de ~ 8 semanas de edad) se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de la llegada antes de iniciar los estudios.

25 *Células*

Las células CT26.WT (ATCC, Manassas VA) son una línea celular de carcinoma de colon indiferenciado inducidas por N-nitroso-N-metiluretano (NNMU). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10 % de suero bovino fetal, piruvato sódico, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Las células CT26.WT (2E5 en 100 µl) se inyectaron en el flanco derecho de los ratones BALB/C.

Vector

35 Las preparaciones del vector se hicieron por transfección transitoria (o de una línea celular productora después de la infección de una segunda línea celular con el virus infeccioso de la transfección inicial; Solic. De EE.UU. 61218063) con títulos de aproximadamente 3E6 UT/ml. Para los estudios iniciales el vector no se purifica o concentra adicionalmente. Para los siguientes experimentos para determinar las curvas de respuesta de dosis completa, se prepara un material purificado con alto título con un título esperado alrededor de 10E8 /ml. Para conseguir un material con alto título, se escogió la línea celular CF2 canina para la producción ya que el interferón gamma es poco reactivo entre especies y el uso de líneas celulares xenogénicas evitará la acción inhibitoria del interferón gamma en las células productoras. El vector se purifica y se concentra como se describe en la memoria descriptiva. El vector se administra IT en un volumen de 100 µl y la dosis total/ratón de aproximadamente 3E3, 3E4 y 3E5 UT/ratón. Se identificó el vector que expresaba el interferón gamma como Toca 621.

45 *Implantación del tumor e inyección del vector*

Se les implantó a nueve grupos de hembras BALB/c (99 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía subcutánea con células tumorales CT26.WT (Día 0) y entonces se dosificaron (día 4-7 dependiendo de la tasa de crecimiento del tumor CT26; aproximadamente 50-100 mm³) con vehículo (Grupo 1), con vector de control (AC3-GFP (V), (Grupo 2), inyección IT del vector Toca 621 (Grupos 3-5), o inyección intravenosa del vector Toca 621 (Grupos 6-8). Los ratones del grupo 9 no tenían implantado tumor y se les inyectó solo el vector por vía intravenosa.

Análisis de datos

55 Los análisis de crecimiento tumoral se llevaron a cabo hasta 2000 mm³ o a los 60 días basándose en el que llegara primero. 10 ratones de cada grupo se representaron en cuanto al tamaño del tumor respecto al tiempo. Se determinará la significación estadística utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Los valores de P de < 0,05 se consideran estadísticamente significativos en todos los análisis que se llevaron a cabo con el software estadístico Prism 5 (software GraphPad) o equivalente. Se tomaron también observaciones en vivo para evaluar cualquier evento adverso con la administración de Toca 621.

Resultados

Los resultados de medición del tamaño tumoral a lo largo del tiempo muestran una diferencia estadísticamente significativa en el crecimiento de tumores tratados con el vector que expresa el IFN gamma sobre los tumores en animales que recibían el vector de control o vehículo.

Ejemplo de referencia 27. Suministro genético intravenoso utilizando un vector vírico replicante*Objetivo*

El objetivo de este estudio era evaluar la eficacia del suministro intravenoso de un nuevo vector retroviral competente en replicación basado en MLV que tiene el marcador de proteína fluorescente verde (AC3-GFP(V)) a gliomas U87 implantados en los cerebros de ratones desnudos.

Ratones

Se adquirieron ratones atímicos nude-Foxn1^{un} (desnudos) hembras (edad ~ 8 semanas) en Harlan (Indianápolis, IN). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de llegar. Los ratones se sometieron a la colocación quirúrgica de una cánula guía permanente con una proyección de 3,0 mm implantada en el cuerpo estriado derecho, y provisto con un tapón que contenía una proyección de 3,5 mm. Las coordenadas estereotaxicas eran AP = +0,5 mm, ML = -1,8 mm (de Bregma).

Células

Las células U87-MG (ATCC, Manassas VA) se derivan de un glioma maligno de una mujer de raza blanca de 44 años de edad. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10 % de suero fetal bovino, piruvato sódico, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Las células U87-MG (1E5 en 1 µl) se infundieron a 0,2 µl por minuto (5 minutos, seguido por un descanso de 5 minutos) IC mediante una cánula de inyección con una protección de 3,5 mm insertada a través de la cánula guía.

Las preparaciones de vector se hicieron por transfección transitoria y todas tenían títulos de aproximadamente 2,8E7 UT/ml. El vector se administró por vía intratumoral (IT) en un volumen de 5 µl o menos para una dosis total mínima/ratón de aproximadamente 1,4E45 UT/ratón. Se hicieron inyecciones intravenosas mediante la vena caudal con 2,8E6/100 µl.

Implantación del tumor e inyección del vector

Se implantó a cinco grupos de ratones hembras Foxn1^{un} desnudos (16 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía IC con células tumorales U87 (Día 0) y entonces se dosificaron IT o IV (día 4-7 dependiendo de la tasa de crecimiento de las células U87) con un vehículo IV (Grupo 1), con vector IV (Grupo2), IT con el alterador de la barrera hematoencefálica Vardenafil y vector (Grupo 3), IT con Vardenafil y vector (Grupo 4), o IT con vector (Grupo 5). 14 días después de la inyección con el vector los ratones se sacrificaron y los tumores se aislaron y analizaron en cuanto a la expresión de GFP.

Análisis de datos

Se analizaron las células U87 aisladas de los tumores alterados de los ratones por citometría de flujo en cuanto al porcentaje de GFP positiva de los grupos 2-5 (Figura 26). El análisis de histograma también se hizo para los grupos 1,3, y 5 para medir la distribución de la señal de GFP en las células U87 aisladas (Figura 27).

Resultados

El suministro intravenoso de GFP era igualmente eficaz como inyección intratumoral de las células de glioma U87 implantadas intracranalmente en ratones desnudos.

Ejemplo de referencia 28. Construcción de un vector retroviral competente en replicación que codifica el gen de IL-2 humano

El vector retroviral competente en replicación, pAC3-hIL2, que codifica el gen de la IL-2 humano, se deriva del armazón del vector pAC3- γCD2. El armazón pAC3 del ADC plasmídico que codifica el vector pAC3-hIL2 se aisló por digestión mediante endonucleasas del ADN plasmídico pAC3- γCD2 con PstI y NotI. La secuencia de ADNc del gen del IFN-γ humano se identificó y se confirmó utilizando secuencias obtenidas de los diferentes números de registro (BC066255 y BC066257). El alineamiento de secuencias de los dos revelaba una secuencia idéntica. La fase de lectura abierta del IFN-γ humano (SEQ ID NO: 40) se sintetizó con los sitios de enzimas de restricción PstI y

Notl en cada extremo del fragmento de ADN para la inserción posterior en el sitio correspondiente del armazón de pAC3. La construcción resultante, pAC-hIL2, codifica 4 genes: el gag, el pol, el env, y la IL-2 humana (Figura 28).

Se produjo una reserva de vector por transfección transitoria del ADN plasmídico que codifica el vector en células 293T utilizando el método de fosfato de calcio. Dieciocho horas después de la transfección, se reemplazó el cultivo con medio nuevo. Veinticuatro horas después del reemplazo de medio, el sobrenadante que contenía el vector se recolectó y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm y se utilizó inmediatamente o se almacenó en alícuotas a -80 °C para su uso posterior. Se utilizaron veinte microlitros de las reservas de vector recolectadas para infectar células de cáncer de próstata humano, PC3. Veinticuatro horas después de la infección, se añadió AZT a las células para inhibir la replicación vírica adicional. Cuarenta y ocho horas después de la infección, se extrajo el ADN de las células PC3 infectadas para el ensayo de titulación. El título de las reservas de vector se determinó por qPCR con una inclusión de referencias de número de copias conocido.

La expresión de IL-2 humana se ensayó primer a nivel de ARN. SE extrajo el ARN total de células CF2TH y HT1080 a los 5 días después de la infección utilizando un método convencional de extracción de ARN. SE llevó a cabo la RT-PCR para detectar la expresión de IL-2 humana. Se utilizaron cincuenta nanogramos de ARN total en la reacción RT para generar el ADNc. Un décimo del volumen de la reacción de RT se utilizó posteriormente para la PCR utilizando un conjunto de cebadores de PCR específicos para la IL-2 humana. Los resultados de la RT-PCR muestran que la IL-2 humana se expresa en las células HT1080 transducidas con el vector pAC3-hIL2.

La expresión de la IL-2 proteica human secretada se ensayó por ELISA convencional. La reserva de vector recolectada desde el día 5 después de la infección se diluyó en serie en el ensayo ELISA con el fin de obtener un intervalo lineal entre la concentración proteica y el factor de dilución. El resultado demostraba que la IL-2 proteica humana se secreta a mayor concentración en las células CF2TH que en las HT1080 a los 5 días después de la infección.

Ejemplo de referencia 29. Estudios de eficacia antitumoral con un vector que expresa interleucina 2 en un modelo de tumor subcutáneo en ratones

Objetivo

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de un nuevo vector retrovítico competente en replicación basado en MLV que alberga la secuencia de la hormona leucocitotrópica interleucina 2 (pAC3-mIL2) sobre el crecimiento tumoral, cuando se suministra mediante inyección intratumoral (IT) en ratones BALB/c que albergan un carcinoma de colon subcutáneo (CT26.WT).

Ratones

Los ratones BALB/c hembras (de ~ 8 semanas de edad) se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Los ratones se aclimataron durante 7 días después de la llegada antes de iniciar los estudios.

Células

Las células CT26.WT (ATCC, Manassas VA) son una línea celular de carcinoma de colon indiferenciado inducidas por N-nitroso-N-metiluretano (NNMU). Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10 % de suero bovino fetal, piruvato sódico, y Glutamax (Hyclone, Logan UT, e Invitrogen, San Diego CA). Las células se resuspendieron en PBS (Hyclone, Logan UT) para la implantación. Las células CT26.WT (2E5 en 100 µl) se inyectaron en el flanco derecho de los ratones BALB/C.

Vector

Las preparaciones del vector se hicieron por transfección transitoria (o de una línea celular productora; a la que se hace referencia como provisional) con títulos de aproximadamente 3E6 UT/ml. Para los estudios iniciales el vector no se purifica o concentra adicionalmente. Para los siguientes experimentos para determinar las curvas de respuesta de dosis completa, se prepara un material purificado con alto título con un título esperado alrededor de 10E8 /ml. El vector se administra IT en un volumen de 100 µl y la dosis total/ratón de aproximadamente 6E5 UT/ratón. Se identificó el vector que expresaba el interferón gamma como Toca IL2.

Implantación del tumor e inyección del vector

Se les implantó a cinco grupos de hembras BALB/c (55 ratones, 9-10 semanas de edad) por vía subcutánea con células tumorales CT26.WT (Día 0) y entonces se dosificaron (día 4-7 dependiendo de la tasa de crecimiento del tumor CT26; aproximadamente 50-100 mm³) con vehículo (Grupo 1), con vector de control (AC3-GFP (V), (Grupo 2), inyección IT del vector Toca IL2 (Grupo 3), o inyección intravenosa del vector Toca IL2 (Grupo 4). Los ratones del grupo 5 no tenían implantado tumor y se les inyectó solo el vector por vía intravenosa.

Análisis de datos

Los análisis de crecimiento tumoral se llevaron a cabo hasta 2000 mm³ o a los 60 días basándose en el que llegara primero. 10 ratones de cada grupo se representaron en cuanto al tamaño del tumor respecto al tiempo. Se determinará la significación estadística utilizando el análisis de varianza (ANOVA). Los valores de P de < 0,05 se consideran estadísticamente significativos en todos los análisis que se llevaron a cabo con el software estadístico Prism 5 (software GraphPad) o equivalente. Se tomaron también observaciones en vivo para evaluar cualquier evento adverso a la expresión de IL-2 durante el tratamiento.

Resultados

El suministro de IL-2 mediante el MLV replicante reduce y en algunos casos aclara la carga tumoral del modelo de ratón BALB/c CT26.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Tocagen Inc.
Gruber, Harry E.
Jolly, Douglas
Perez, Omar

<120> VECTORES RECOMBINANTES

<130> 00014-007WO2

<140> No conocido aun
<141> 26-09-2009

<150> US 61/100.666
<151> 26-09-2008

<150> US 61/120.618
<151> 08-12-2008

<150> 61/186.823
<151> 13-06-2009

<160> 30

<170> PatentIn versión 3.5

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

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

<400> 1

ES 2 709 481 T3

atg gtg aca ggg gga atg gca agc aag tgg gat cag aag ggt atg gac	48
Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp	
1 5 10 15	
att gcc tat gag gag gcg gcc tta ggt tac aaa gag ggt ggt gtt cct	96
Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Ala Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro	
20 25 30	
att ggc gga tgt ctt atc aat aac aaa gac gga agt gtt ctc ggt cgt	144
Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg	
35 40 45	
ggt cac aac atg aga ttt caa aag gga tcc gcc aca cta cat ggt gag	192
Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu	
50 55 60	
atc tcc act ttg gaa aac tgt ggg aga tta gag ggc aaa gtg tac aaa	240
Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys	
65 70 75 80	
gat acc act ttg tat acg acg ctg tct cca tgc gac atg tgt aca ggt	288
Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly	
85 90 95	
gcc atc atc atg tat ggt att cca cgc tgt gtt gtc ggt gag aac gtt	336
Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Val Gly Glu Asn Val	
100 105 110	
aat ttc aaa agt aag ggc gag aaa tat tta caa act aga ggt cac gag	384
Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu	
115 120 125	
gtt gtt gtt gtt gac gat gag agg tgt aaa aag atc atg aaa caa ttt	432
Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Ile Met Lys Gln Phe	
130 135 140	
atc gat gaa aga cct cag gat tgg ttt gaa gat att ggt gag tag	477
Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu	
145 150 155	

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

<400> 2

5

10

ES 2 709 481 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 709 481 T3

atg gtg aca ggg gga atg gca agc aag tgg gat cag aag ggt atg gac	48
Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp	
1 5 10 15	
att gcc tat gag gag gcg tta tta ggt tac aaa gag ggt ggt gtt cct	96
Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro	
20 25 30	
att ggc gga tgt ctt atc aat aac aaa gac gga agt gtt ctc ggt cgt	144
Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg	
35 40 45	
ggt cac aac atg aga ttt caa aag gga tcc gcc aca cta cat ggt gag	192
Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu	
50 55 60	
atc tcc act ttg gaa aac tgt ggg aga tta gag ggc aaa gtg tac aaa	240
Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys	
65 70 75 80	
gat acc act ttg tat acg acg ctg tct cca tgc gac atg tgt aca ggt	288
Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly	
85 90 95	
gcc atc atc atg tat ggt att cca cgc tgt gtc atc ggt gag aac gtt	336
Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val	
100 105 110	
aat ttc aaa agt aag ggc gag aaa tat tta caa act aga ggt cac gag	384
Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu	
115 120 125	
gtt gtt gtt gtt gac gat gag agg tgt aaa aag tta atg aaa caa ttt	432
Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe	
130 135 140	
atc gat gaa aga cct cag gat tgg ttt gaa gat att ggt gag tag	477
Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu	
145 150 155	

<210> 4

<211> 158

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 4

ES 2 709 481 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
<211> 480
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> citosina desaminasa humana con el codón optimizado

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(480)

<400> 5

ES 2 709 481 T3

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

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

<220>
 <223> Construcción sintética

<400> 6

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

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

Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg

ES 2 709 481 T3

35

40

45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 7

ES 2 709 481 T3

```

atg aac ccg tta ttc ttt ttg gct tct cca ttc ttg tac ctt aca tat      48
Met Asn Pro Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr Tyr
1          5          10          15

ctt ata tat tat cca aac aaa ggg tct ttc gtt agc aaa cct aga aat      96
Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg Asn
          20          25          30

ctg caa aaa atg tct tcg gaa cca ttt aag aac gtc tac ttg cta cct      144
Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro
          35          40          45

caa aca aac caa ttg ctg ggt ttg tac acc atc atc aga aat aag aat      192
Gln Thr Asn Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys Asn
          50          55          60

aca act aga cct gat ttc att ttc tac tcc gat aga atc atc aga ttg      240
Thr Thr Arg Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg Leu
65          70          75          80
ttg gtt gaa gaa ggt ttg aac cat cta cct gtg caa aag caa att gtg      288
Leu Val Glu Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile Val
          85          90          95

gaa act gac acc aac gaa aac ttc gaa ggt gtc tca ttc atg ggt aaa      336
Glu Thr Asp Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly Lys
          100          105          110

atc tgt ggt gtt tcc att gtc aga gct ggt gaa tcg atg gag caa gga      384
Ile Cys Gly Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln Gly
          115          120          125

tta aga gac tgt tgt agg tct gtg cgt atc ggt aaa att tta att caa      432
Leu Arg Asp Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile Gln
          130          135          140

agg gac gag gag act gct tta cca aag tta ttc tac gaa aaa tta cca      480
Arg Asp Glu Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu Pro
          145          150          155          160

gag gat ata tct gaa agg tat gtc ttc cta tta gac cca atg ctg gcc      528
Glu Asp Ile Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu Ala
          165          170          175

acc ggt ggt agt gct atc atg gct aca gaa gtc ttg att aag aga ggt      576
Thr Gly Gly Ser Ala Ile Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg Gly
          180          185          190

gtt aag cca gag aga att tac ttc tta aac cta atc tgt agt aag gaa      624
Val Lys Pro Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys Glu
          195          200          205

ggg att gaa aaa tac cat gcc gcc ttc cca gag gtc aga att gtt act      672
Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr
          210          215          220

ggt gcc ctc gac aga ggt cta gat gaa aac aag tat cta gtt cca ggg      720
Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly
          225          230          235          240

ttg ggt gac ttt ggt gac aga tac tac tgt gtt taa      756
Leu Gly Asp Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val
          245          250

```

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

ES 2 709 481 T3

<400> 8

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

Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg Asn
20 25 30
Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 709 481 T3

<210> 9
 <211> 1443
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

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

10

<400> 9

atg gct gtt gct cgt gct gct ctt ggt cct ctt gtt act ggt ctt tat	48
Met Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu Tyr	
1 5 10 15	
gat gtt caa gct ttt aaa ttt ggt gat ttt gtt ctt aaa tct ggt ctt	96
Asp Val Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu	
20 25 30	
tct tct cct att tat att gat ctt cgt ggt att gtt tct cgt cct cgt	144
Ser Ser Pro Ile Tyr Ile Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro Arg	
35 40 45	
ctt ctt tct caa gtt gct gat att ctt ttt caa act gct caa aat gct	192
Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn Ala	
50 55 60	
ggt att tct ttt gat act gtt tgt ggt gtt cct tat act gct ctt cct	240
Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu Pro	
65 70 75 80	
ctt gct act gtt att tgt tct act aat caa att cct atg ctt att cgt	288
Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg	
85 90 95	
cgt aaa gaa act aaa gat tat ggt act aaa cgt ctt gtt gaa ggt act	336
Arg Lys Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly Thr	
100 105 110	
att aat cct ggt gaa act tgt ctt att att gaa gat gtt gtt act tct	384
Ile Asn Pro Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser	
115 120 125	
ggt tct tct gtt ctt gaa act gtt gaa gtt ctt caa aaa gaa ggt ctt	432
Gly Ser Ser Val Leu Glu Thr Val Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly Leu	
130 135 140	
aaa gtt act gat gct att gtt ctt ctt gat cgt gaa caa ggt ggt aaa	480
Lys Val Thr Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly Gly Lys	
145 150 155 160	
gat aaa ctt caa gct cat ggt att cgt ctt cat tct gtt tgt act ctt	528
Asp Lys Leu Gln Ala His Gly Ile Arg Leu His Ser Val Cys Thr Leu	
165 170 175	
tct aaa atg ctt gaa att ctt gaa caa caa aaa aaa gtt gat gct gaa	576
Ser Lys Met Leu Glu Ile Leu Glu Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala Glu	
180 185 190	
act gtt ggt cgt gtt aaa cgt ttt att caa gaa aat gtt ttt gtt gct	624
Thr Val Gly Arg Val Lys Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val Ala	
195 200 205	
gct aat cat aat ggt tct cct ctt tct att aaa gaa gct cct aaa gaa	672
Ala Asn His Asn Gly Ser Pro Leu Ser Ile Lys Glu Ala Pro Lys Glu	
210 215 220	

ES 2 709 481 T3

ctt tct ttt ggt gct cgt gct gaa ctt cct cgt att cat cct gtt gct Leu Ser Phe Gly Ala Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile His Pro Val Ala 225 230 235 240	720
tct aaa ctt ctt cgt ctt atg caa aaa gaa act aat ctt tgt ctt Ser Lys Leu Leu Arg Leu Met Gln Lys Lys Glu Thr Asn Leu Cys Leu 245 250 255	768
tct gct gat gtt tct ctt gct cgt gaa ctt ctt caa ctt gct gat gct Ser Ala Asp Val Ser Leu Ala Arg Glu Leu Leu Gln Leu Ala Asp Ala 260 265 270	816
ctt ggt cct tct att tgt atg ctt aaa act cat gtt gat att ctt aat Leu Gly Pro Ser Ile Cys Met Leu Lys Thr His Val Asp Ile Leu Asn 275 280 285	864
gat ttt act ctt gat gtt atg aaa gaa ctt att act ctt gct aaa tgt Asp Phe Thr Leu Asp Val Met Lys Glu Leu Ile Thr Leu Ala Lys Cys 290 295 300	912
cat gaa ttt ctt att ttt gaa gat cgt aaa ttt gct gat att ggt aat His Glu Phe Leu Ile Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn 305 310 315 320	960
act gtt aaa aaa caa tat gaa ggt ggt att ttt aaa att gct tct tgg Thr Val Lys Lys Gln Tyr Glu Gly Gly Ile Phe Lys Ile Ala Ser Trp 325 330 335	1008
gct gat ctt gtt aat gct cat gtt gtt cct ggt tct ggt gtt gtt aaa Ala Asp Leu Val Asn Ala His Val Val Pro Gly Ser Gly Val Val Lys 340 345 350	1056
ggt ctt caa gaa gtt ggt ctt cct ctt cat cgt ggt tgt ctt ctt att Gly Leu Gln Glu Val Gly Leu Pro Leu His Arg Gly Cys Leu Leu Ile 355 360 365	1104
gct gaa atg tct tct act ggt tct ctt gct act ggt gat tat act cgt Ala Glu Met Ser Ser Thr Gly Ser Leu Ala Thr Gly Asp Tyr Thr Arg 370 375 380	1152
gct gct gtt cgt atg gct gaa gaa cat tct gaa ttt gtt gtt ggt ttt Ala Ala Val Arg Met Ala Glu Glu His Ser Glu Phe Val Val Gly Phe 385 390 395 400	1200
att tct ggt tct cgt gtt tct atg aaa cct gaa ttt ctt cat ctt act Ile Ser Gly Ser Arg Val Ser Met Lys Pro Glu Phe Leu His Leu Thr 405 410 415	1248
cct ggt gtt caa ctt gaa gct ggt ggt gat aat ctt ggt caa caa tat Pro Gly Val Gln Leu Glu Ala Gly Gly Asp Asn Leu Gly Gln Gln Tyr 420 425 430	1296
aat tct cct caa gaa gtt att ggt aaa cgt ggt tct gat att att att Asn Ser Pro Gln Glu Val Ile Gly Lys Arg Gly Ser Asp Ile Ile Ile 435 440 445	1344
gtt ggt cgt ggt att att tct gct gct gat cgt ctt gaa gct gct gaa Val Gly Arg Gly Ile Ile Ser Ala Ala Asp Arg Leu Glu Ala Ala Glu 450 455 460	1392

ES 2 709 481 T3

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

taa	1443
-----	------

<210> 10

<211> 480

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

5

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

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

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

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

- 5 <210> 11
- <211> 1227
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Construcción de fusión CDopt-UPRT
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1227)
- 15 <400> 11

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag aac ccg Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Asn Pro 145 150 155 160	480
tta ttc ttt ttg gct tct cca ttc ttg tac ctt aca tat ctt ata tat Leu Phe Phe Leu Ala Ser Pro Phe Leu Tyr Leu Thr Tyr Leu Ile Tyr 165 170 175	528
tat cca aac aaa ggg tct ttc gtt agc aaa cct aga aat ctg caa aaa Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg Asn Leu Gln Lys 180 185 190	576
atg tct tcg gaa cca ttt aag aac gtc tac ttg cta cct caa aca aac Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu Pro Gln Thr Asn 195 200 205	624
caa ttg ctg ggt ttg tac acc atc atc aga aat aag aat aca act aga Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys Asn Thr Thr Arg 210 215 220	672
cct gat ttc att ttc tac tcc gat aga atc atc aga ttg ttg gtt gaa Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg Leu Leu Val Glu 225 230 235 240	720
gaa ggt ttg aac cat cta cct gtg caa aag caa att gtg gaa act gac Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile Val Glu Thr Asp 245 250 255	768
acc aac gaa aac ttc gaa ggt gtc tca ttc atg ggt aaa atc tgt ggt Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly Lys Ile Cys Gly 260 265 270	816
gtt tcc att gtc aga gct ggt gaa tcg atg gag caa gga tta aga gac Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln Gly Leu Arg Asp 275 280 285	864
tgt tgt agg tct gtg cgt atc ggt aaa att tta att caa agg gac gag Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile Gln Arg Asp Glu 290 295 300	912
gag act gct tta cca aag tta ttc tac gaa aaa tta cca gag gat ata Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu Pro Glu Asp Ile 305 310 315 320	960
tct gaa agg tat gtc ttc cta tta gac cca atg ctg gcc acc ggt ggt Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu Ala Thr Gly Gly 325 330 335	1008
agt gct atc atg gct aca gaa gtc ttg att aag aga ggt gtt aag cca Ser Ala Ile Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg Gly Val Lys Pro 340 345 350	1056
gag aga att tac ttc tta aac cta atc tgt agt aag gaa ggg att gaa Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys Glu Gly Ile Glu 355 360 365	1104
aaa tac cat gcc gcc ttc cca gag gtc aga att gtt act ggt gcc ctc Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val Thr Gly Ala Leu 370 375 380	1152
gac aga ggt cta gat gaa aac aag tat cta gtt cca ggg ttg ggt gac Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro Gly Leu Gly Asp 385 390 395 400	1200
ttt ggt gac aga tac tac tgt gtt taa Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val 405	1227

<210> 12
<211> 408
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

5

<400> 12

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

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

<210> 13

<211> 1287

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción de fusión - CDopt - enlazador - UPRT
<220>
<221> CDS

5

<222> (1)..(1287)
<400> 13

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

180	185	190	
tat ctt ata tat tat cca aac aaa ggg tct ttc gtt agc aaa cct aga Tyr Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg 195 200 205			624
aat ctg caa aaa atg tct tcg gaa cca ttt aag aac gtc tac ttg cta Asn Leu Gln Lys Met Ser Ser Glu Pro Phe Lys Asn Val Tyr Leu Leu 210 215 220			672
cct caa aca aac caa ttg ctg ggt ttg tac acc atc atc aga aat aag Pro Gln Thr Asn Gln Leu Leu Gly Leu Tyr Thr Ile Ile Arg Asn Lys 225 230 235 240			720
aat aca act aga cct gat ttc att ttc tac tcc gat aga atc atc aga Asn Thr Thr Arg Pro Asp Phe Ile Phe Tyr Ser Asp Arg Ile Ile Arg 245 250 255			768
ttg ttg gtt gaa gaa ggt ttg aac cat cta cct gtg caa aag caa att Leu Leu Val Glu Glu Gly Leu Asn His Leu Pro Val Gln Lys Gln Ile 260 265 270			816
gtg gaa act gac acc aac gaa aac ttc gaa ggt gtc tca ttc atg ggt Val Glu Thr Asp Thr Asn Glu Asn Phe Glu Gly Val Ser Phe Met Gly 275 280 285			864
aaa atc tgt ggt gtt tcc att gtc aga gct ggt gaa tcg atg gag caa Lys Ile Cys Gly Val Ser Ile Val Arg Ala Gly Glu Ser Met Glu Gln 290 295 300			912
gga tta aga gac tgt tgt agg tct gtg cgt atc ggt aaa att tta att Gly Leu Arg Asp Cys Cys Arg Ser Val Arg Ile Gly Lys Ile Leu Ile 305 310 315 320			960
caa agg gac gag gag act gct tta cca aag tta ttc tac gaa aaa tta Gln Arg Asp Glu Glu Thr Ala Leu Pro Lys Leu Phe Tyr Glu Lys Leu 325 330 335			1008
cca gag gat ata tct gaa agg tat gtc ttc cta tta gac cca atg ctg Pro Glu Asp Ile Ser Glu Arg Tyr Val Phe Leu Leu Asp Pro Met Leu 340 345 350			1056
gcc acc ggt ggt agt gct atc atg gct aca gaa gtc ttg att aag aga Ala Thr Gly Ser Ala Ile Met Ala Thr Glu Val Leu Ile Lys Arg 355 360 365			1104
ggt gtt aag cca gag aga att tac ttc tta aac cta atc tgt agt aag Gly Val Lys Pro Glu Arg Ile Tyr Phe Leu Asn Leu Ile Cys Ser Lys 370 375 380			1152
gaa ggg att gaa aaa tac cat gcc gcc ttc cca gag gtc aga att gtt Glu Gly Ile Glu Lys Tyr His Ala Ala Phe Pro Glu Val Arg Ile Val 385 390 395 400			1200
act ggt gcc ctc gac aga ggt cta gat gaa aac aag tat cta gtt cca Thr Gly Ala Leu Asp Arg Gly Leu Asp Glu Asn Lys Tyr Leu Val Pro 405 410 415			1248
ggg ttg ggt gac ttt ggt gac aga tac tac tgt gtt taa Gly Leu Gly Asp Phe Gly Asp Arg Tyr Tyr Cys Val 420 425			1287

<210> 14

<211> 428

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 709 481 T3

<220>

<223> Construcción sintética

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Ile Tyr Tyr Pro Asn Lys Gly Ser Phe Val Ser Lys Pro Arg

ES 2 709 481 T3

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

<210> 15
 <211> 1200
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 709 481 T3

<223> Construcción de fusión - CDopt3 - OPR3

<220>

<221> CDS

5 <222> (1)..(1200)

<400> 15

atg gtg acc ggc ggc atg gcc tcc aag tgg gat caa aag ggc atg gat	48
Met Val Thr Gly Gly Met Ala Ser Lys Trp Asp Gln Lys Gly Met Asp	
1 5 10 15	
atc gct tac gag gag gcc ctg ctg ggc tac aag gag ggc ggc gtg cct	96
Ile Ala Tyr Glu Glu Ala Leu Leu Gly Tyr Lys Glu Gly Gly Val Pro	
20 25 30	
atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg	144
Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg	
35 40 45	
ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag	192
Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu	
50 55 60	
atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag	240
Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys	
65 70 75 80	
gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc	288
Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly	
85 90 95	
gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg atc ggc gag aac gtg	336
Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val	
100 105 110	
aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag	384
Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu	
115 120 125	
gtg gtg gtt gtt gac gat gag agg tgt aag aag ctg atg aag cag ttc	432
Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe	
130 135 140	
atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag gcg gtc	480
Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ala Val	
145 150 155 160	
gct cgt gca gct ttg ggg cca ttg gtg acg ggt ctg tac gac gtg cag	528
Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu Tyr Asp Val Gln	
165 170 175	
gct ttc aag ttt ggg gac ttc gtg ctg aag agc ggg ctt tcc tcc ccc	576
Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly Leu Ser Ser Pro	
180 185 190	
atc tac atc gat ctg cgg ggc atc gtg tct cga ccg cgt ctt ctg agt	624

ES 2 709 481 T3

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

<210> 16

<211> 399

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 16

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile Arg Arg Lys Glu
245 250 255

Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly Thr Ile Asn Pro
260 265 270

Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr Ser Gly Ser Ser
275 280 285

Val Leu Glu Thr Val Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly Leu Lys Val Thr
290 295 300

Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly Gly Lys Asp Lys Leu
305 310 315 320

Gln Ala His Gly Ile Arg Leu His Ser Val Cys Thr Leu Ser Lys Met
325 330 335

Leu Glu Ile Leu Glu Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala Glu Thr Val Gly
340 345 350

Arg Val Lys Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val Ala Ala Asn His
355 360 365

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

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

<210> 17

<211> 1260

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

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

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1260)

<400> 17

ES 2 709 481 T3

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

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

ES 2 709 481 T3

atc ggc ggc tgt ctg atc aac aac aag gac ggc agt gtg ctg ggc agg Ile Gly Gly Cys Leu Ile Asn Asn Lys Asp Gly Ser Val Leu Gly Arg 35 40 45	144
ggc cac aac atg agg ttc cag aag ggc tcc gcc acc ctg cac ggc gag Gly His Asn Met Arg Phe Gln Lys Gly Ser Ala Thr Leu His Gly Glu 50 55 60	192
atc tcc acc ctg gag aac tgt ggc agg ctg gag ggc aag gtg tac aag Ile Ser Thr Leu Glu Asn Cys Gly Arg Leu Glu Gly Lys Val Tyr Lys 65 70 75 80	240
gac acc acc ctg tac acc acc ctg tcc cct tgt gac atg tgt acc ggc Asp Thr Thr Leu Tyr Thr Thr Leu Ser Pro Cys Asp Met Cys Thr Gly 85 90 95	288
gct atc atc atg tac ggc atc cct agg tgt gtg atc ggc gag aac gtg Ala Ile Ile Met Tyr Gly Ile Pro Arg Cys Val Ile Gly Glu Asn Val 100 105 110	336
aac ttc aag tcc aag ggc gag aag tac ctg caa acc agg ggc cac gag Asn Phe Lys Ser Lys Gly Glu Lys Tyr Leu Gln Thr Arg Gly His Glu 115 120 125	384
gtg gtg gtt gtt gac gat gag agg tgt aag aag ctg atg aag cag ttc Val Val Val Val Asp Asp Glu Arg Cys Lys Lys Leu Met Lys Gln Phe 130 135 140	432
atc gac gag agg cct cag gac tgg ttc gag gat atc ggc gag tcc ggc Ile Asp Glu Arg Pro Gln Asp Trp Phe Glu Asp Ile Gly Glu Ser Gly 145 150 155 160	480
ggc ggc gcc tcc ggc ggc ggc gcc tcc ggc ggc ggc gcc tcc ggc ggc Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly Gly Ala Ser Gly Gly 165 170 175	528
ggc gcc gcg gtc gct cgt gca gct ttg ggg cca ttg gtg acg ggt ctg Gly Ala Ala Val Ala Arg Ala Ala Leu Gly Pro Leu Val Thr Gly Leu 180 185 190	576
tac gac gtg cag gct ttc aag ttt ggg gac ttc gtg ctg aag agc ggg Tyr Asp Val Gln Ala Phe Lys Phe Gly Asp Phe Val Leu Lys Ser Gly 195 200 205	624
ctt tcc tcc ccc atc tac atc gat ctg cgg ggc atc gtg tct cga ccg Leu Ser Ser Pro Ile Tyr Ile Asp Leu Arg Gly Ile Val Ser Arg Pro 210 215 220	672
cgt ctt ctg agt cag gtt gca gat att tta ttc caa act gcc caa aat Arg Leu Leu Ser Gln Val Ala Asp Ile Leu Phe Gln Thr Ala Gln Asn 225 230 235 240	720
gca ggc atc agt ttt gac acc gtg tgt gga gtg cct tat aca gct ttg Ala Gly Ile Ser Phe Asp Thr Val Cys Gly Val Pro Tyr Thr Ala Leu 245 250 255	768
cca ttg gct aca gtt atc tgt tca acc aat caa att cca atg ctt att Pro Leu Ala Thr Val Ile Cys Ser Thr Asn Gln Ile Pro Met Leu Ile 260 265 270	816

ES 2 709 481 T3

aga agg aaa gaa aca aag gat tat gga act aag cgt ctt gta gaa gga	864
Arg Arg Lys Glu Thr Lys Asp Tyr Gly Thr Lys Arg Leu Val Glu Gly	
275 280 285	
act att aat cca gga gaa acc tgt tta atc att gaa gat gtt gtc acc	912
Thr Ile Asn Pro Gly Glu Thr Cys Leu Ile Ile Glu Asp Val Val Thr	
290 295 300	
agt gga tct agt gtt ttg gaa act gtt gag gtt ctt cag aag gag ggc	960
Ser Gly Ser Ser Val Leu Glu Thr Val Glu Val Leu Gln Lys Glu Gly	
305 310 315 320	
ttg aag gtc act gat gcc ata gtg ctg ttg gac aga gag cag gga ggc	1008
Leu Lys Val Thr Asp Ala Ile Val Leu Leu Asp Arg Glu Gln Gly Gly	
325 330 335	
aag gac aag ttg cag gcg cac ggg atc cgc ctc cac tca gtg tgt aca	1056
Lys Asp Lys Leu Gln Ala His Gly Ile Arg Leu His Ser Val Cys Thr	
340 345 350	
ttg tcc aaa atg ctg gag att ctc gag cag cag aaa aaa gtt gat gct	1104
Leu Ser Lys Met Leu Glu Ile Leu Glu Gln Gln Lys Lys Val Asp Ala	
355 360 365	
gag aca gtt ggg aga gtg aag agg ttt att cag gag aat gtc ttt gtg	1152
Glu Thr Val Gly Arg Val Lys Arg Phe Ile Gln Glu Asn Val Phe Val	
370 375 380	
gca gcg aat cat aat ggt tct ccc ctt tct ata aag gaa gca ccc aaa	1200
Ala Ala Asn His Asn Gly Ser Pro Leu Ser Ile Lys Glu Ala Pro Lys	
385 390 395 400	
gaa ctc agc ttc ggt gca cgt gca gag ctg ccc agg atc cac cca gtt	1248
Glu Leu Ser Phe Gly Ala Arg Ala Glu Leu Pro Arg Ile His Pro Val	
405 410 415	
gca tcg aag taa	1260
Ala Ser Lys	

<210> 18

<211> 419

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Construcción sintética

<400> 18

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

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

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

ES 2 709 481 T3

Gly	His	Asn	Met	Arg	Phe	Gln	Lys	Gly	Ser	Ala	Thr	Leu	His	Gly	Glu	
50						55					60					
Ile	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Cys	Gly	Arg	Leu	Glu	Gly	Lys	Val	Tyr	Lys	
65					70					75					80	
Asp	Thr	Thr	Leu	Tyr	Thr	Thr	Leu	Ser	Pro	Cys	Asp	Met	Cys	Thr	Gly	
				85					90					95		
Ala	Ile	Ile	Met	Tyr	Gly	Ile	Pro	Arg	Cys	Val	Ile	Gly	Glu	Asn	Val	
			100					105					110			
Asn	Phe	Lys	Ser	Lys	Gly	Glu	Lys	Tyr	Leu	Gln	Thr	Arg	Gly	His	Glu	
		115					120					125				
Val	Val	Val	Val	Asp	Asp	Glu	Arg	Cys	Lys	Lys	Leu	Met	Lys	Gln	Phe	
	130					135					140					
Ile	Asp	Glu	Arg	Pro	Gln	Asp	Trp	Phe	Glu	Asp	Ile	Gly	Glu	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Gly	Gly	
				165					170					175		
Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Ala	Ala	Leu	Gly	Pro	Leu	Val	Thr	Gly	Leu	
			180					185					190			
Tyr	Asp	Val	Gln	Ala	Phe	Lys	Phe	Gly	Asp	Phe	Val	Leu	Lys	Ser	Gly	
		195					200					205				
Leu	Ser	Ser	Pro	Ile	Tyr	Ile	Asp	Leu	Arg	Gly	Ile	Val	Ser	Arg	Pro	
	210					215					220					
Arg	Leu	Leu	Ser	Gln	Val	Ala	Asp	Ile	Leu	Phe	Gln	Thr	Ala	Gln	Asn	
225					230					235					240	
Ala	Gly	Ile	Ser	Phe	Asp	Thr	Val	Cys	Gly	Val	Pro	Tyr	Thr	Ala	Leu	
				245					250					255		
Pro	Leu	Ala	Thr	Val	Ile	Cys	Ser	Thr	Asn	Gln	Ile	Pro	Met	Leu	Ile	
			260					265					270			
Arg	Arg	Lys	Glu	Thr	Lys	Asp	Tyr	Gly	Thr	Lys	Arg	Leu	Val	Glu	Gly	
		275					280					285				

ES 2 709 481 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ser Lys

<210> 19

<211> 11892

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Vector RCR - pAC3-yCD2

<400> 19

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480

ES 2 709 481 T3

ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acgggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccctggga gggctctctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
tttcatttgg gggctcgcc gggatcggga gacccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggtg agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgcttcgctc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggacccg	900
tggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cgggggcccgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaacaggt	1080
tcccgctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgctcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaga	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatacccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc cctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag	1680
aagaccccc gccttatagg gaccaagac caccaccttc cgacagggaac ggaaatggtg	1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg	1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa	1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaactgac agctctgac gagtctgttc	1980
tcatacccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc	2100
gccccactca actgcccatt gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg	2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctcttagcgg	2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag	2280

ES 2 709 481 T3

ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcaggtaga 2340
 ctcttatga ccctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatttggc 2400
 agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
 ttggagattt ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
 gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
 agcagaaaaga gaaagaaaga gatcgtagga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
 ctgtcgtagg tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
 atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtcccaaga 2760
 aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg 2820
 gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
 ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgaccaa aatcctggac 2940
 ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga 3000
 ccacggatcg caaagtacat ctagtaccg gtaaggteac ccactcttct ctccatgtac 3060
 cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgtctgac taaactaaaa gcccaaatcc 3120
 actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga 3180
 ccctaaatat agaagatgag catcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
 tagggctcac atggctgtct gatcttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac 3300
 tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
 taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac 3420
 tgttggaacca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctaccgg 3480
 ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
 ggggtggaaga catccacccc accgtgccc acccttaciaa cctcttgagc gggctcccac 3600
 cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc 3660
 accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
 gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
 aggcactgca cagagacctc gcagacttcc ggatccagca ccagacttg atcctgctac 3840
 agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggtactc 3900
 gggccctgtt acaaacccta gggaacctcg ggtatcgggc ctcgccaag aaagcccaaa 3960
 tttgccagaa acaggtcaag tatctggggg atcttctaaa agagggtcag agatggctga 4020
 ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa 4080
 gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg 4140

ES 2 709 481 T3

cagccccctt	gtaccctctc	acaaaaacgg	ggactctggt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
atttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggctacgcc	aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgtcggc	cgggtggccta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcac	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccgaccgct	ggctttccaa	cgcccggtatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttgacacag	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaacccgg	4620
ctacgtgct	cccactgcct	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aacccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcgggg	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccataatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcgggccga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagtg	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggt	ccgcgggcat	cggcccggca	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccgatt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggctgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgata	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gctcctactc	cccttagccc	5940

ES 2 709 481 T3

tgtaccgagc cgcgaacacg ccggggccccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg	6000
gggcaccccc gcccttgta aacttccttg accctgacat gacaagagtt actaacagcc	6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc	6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccggtggt acctcaccct taccgagtcg	6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac	6240
cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttgga	6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggttg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcgttca acgctctcaa aacccccctca agataagatt aaccctgga agcccttaat	6420
agtcattgga gtccgttag gagtaggat ggcagagagc cccatcagg tctttaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgccttc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcggggtg	6720
tgggggacca ggagagggt actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca cccctggga	6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caacctcta gtcctagaat tctactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccaa atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
cccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagccccct caataccagt taccctctt ccactaccag	7200
tacaccctca acctccccta caagtccaag tgtccacag ccacccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagcta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa	7320
gaccaagaa tgttggtgt gcttagtgtc gggacctcct tattacgaag gagtagcgt	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact acctgcagc	7560
acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800

ES 2 709 481 T3

agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttta tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa	8340
gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt	8400
cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg	8460
gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc	8520
ctctggaagc ttcttgaaga caaacacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc	8580
ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa	8640
aggcggcaca accccagtg c acgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc	8700
tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgcca gaaggtaacc cattgtatgg	8760
gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac	8820
gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga ttataaatgg	8880
tgaccggcgg catggcctcc aagtgggatc aaaagggcat ggatatcgct tacgaggagg	8940
ccctgctggg ctacaaggag ggcggcgtgc ctatcggcgg ctgtctgac aacaacaagg	9000
acggcagtgt gctgggcagg ggccacaaca tgaggttcca gaagggtcc gccaccctgc	9060
acggcgagat ctccacctg gagaactgtg gcaggctgga gggcaagggtg tacaaggaca	9120
ccacctgta caccacctg tccccttggtg acatgtgtac cggcgctatc atcatgtacg	9180
gcatccctag gtgtgtgatc ggcgagaacg tgaacttcaa gtccaagggc gagaagtacc	9240
tgcaaaccag gggccacgag gtggtggttg ttgacgatga gaggtgtaag aagctgatga	9300
agcagttcat cgacgagagg cctcaggact ggttcgagga tatcggcgag taagcggccg	9360
cagataaaat aaaagatttt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc	9420
tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccatthttgca aggcattggaa aaatacataa	9480
ctgagaatag agaagttcag atcaaggtca ggaacagatg gaacagctga atatgggcca	9540
aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaca	9600

ES 2 709 481 T3

gctgaatatg ggccaaacag gatatctgtg gtaagcagtt cctgccccgg ctcagggcca	9660
agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccatcagatg	9720
tttccaggggt gcccgaagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag	9780
ttcgctttctc gctttctgttc gcgcgcttct gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa	9840
cccctcactc gggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca	9900
ataaaccctc ttgcagttgc atccgacttg tgggtctcgct gttccttggg aggggtctcct	9960
ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca	10020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	10080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccga caggactata	10140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	10200
gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc	10260
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	10320
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	10380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	10440
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag	10500
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	10560
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca	10620
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggctctga	10680
cgctcagtggt aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat	10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga	10800
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg	10860
tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgtg tagataacta cgatacggga	10920
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc	10980
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcctgcaac	11040
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc	11160
gtttgggatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	11220
catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt	11280
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc	11340
atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg	11400
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag	11460

ES 2 709 481 T3

cagaacttta aaagtgtctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat	11520
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaccaact gatcttcagc	11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa	11640
aaaggggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta	11700
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa	11760
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga	11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct	11880
tcaagaattc at	11892

<210> 20
 <211> 11892
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

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

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactcgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttccttggga gggctctctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc	720
tttcattttg gggctcgcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgcctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccg	900
tgggtggaact gacgagttcg gaacacccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt	960
cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt caaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020

ES 2 709 481 T3

gtgcaccccc	cttagaggag	ggatatgtgg	ttctggtagg	agacgagaac	ctaaaacagt	1080
tcccgcctcc	gtctgaatth	ttgctttcgg	tttgggaccg	aagccgcgcc	gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag	catcgttctg	tggtgtctct	gtctgactgt	gtttctgtat	ttgtctgaga	1200
atatgggcca	gactgttacc	actcccttaa	gtttgacctt	aggtcactgg	aaagatgtcg	1260
agcggatcgc	tcacaaccag	tcggtagatg	tcaagaagag	acgttggggt	accttctgct	1320
ctgcagaatg	gccaacctth	aacgtcggat	ggccgcgaga	cggcacctth	aaccgagacc	1380
tcatcaccca	ggttaagatc	aaggtcttht	cacctggccc	gcatggacac	ccagaccagg	1440
tcccctacat	cgtgacctgg	gaagccttgg	cttttgacct	ccctccctgg	gtcaagccct	1500
ttgtacaccc	taagcctccg	cctcctcttc	ctccatccgc	ccggtctctc	ccccttgaac	1560
ctcctcgthc	gaccccgctt	cgatectccc	tttatccagc	cctcactcct	tctctaggcg	1620
ccaaacctaa	acctcaagtt	ctttctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	caccccttcc	cgacagggac	ggaaatgggt	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcacccg	accctccccc	aatggcatct	cgcctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaaactgac	agctctgatc	gagtctgttc	1980
tcatcaccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgcccaat	gaagtcgatg	ccgcttttcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcgag	agccccacca	atttggccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcttag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcagggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agaggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagatth	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaacc	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaga	gaaagaaaga	gatcgttaga	gacatagaga	gatgagcaag	ctattggcca	2640
ctgtcgthtag	tggacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaagaaa	aggggcactg	ggctaaagat	tgtcccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	gggggggaac	2880

ES 2 709 481 T3

cogtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgacccaa aatcctggac	2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgttgga	3000
ccacggatcg caaagtacat ctagctaccg gtaagggtcac ccactctttc ctccatgtac	3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gcccaaatcc	3120
actttgaggg atcaggagcc caggttatgg gaccaatggg gcagcccctg caagtgttga	3180
ccctaaatat agaagatgag catcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc	3240
taggggtccac atggctgtct gattttcttc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac	3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca	3360
taaaacaata ccccatgtca caagaagcca gactggggat caagccccac atacagagac	3420
tgttggaacca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctacccg	3480
ttaagaaacc agggactaat gattataggc ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc	3540
gggtggaaga catccacccc accgtgccca acccttacia cctcttgagc gggctccac	3600
cgtcccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc	3660
acccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag	3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg	3780
aggcactgca cagagaccta gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac	3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caagggtactc	3900
gggcccgtgtt acaaacctta gggaacctcg ggtatcgggc ctcggccaag aaagccaaa	3960
tttgccagaa acaggtcaag tatctggggg atcttctaaa agaggggtcag agatggctga	4020
ctgaggccag aaaagagact gtgatggggc agcctactcc gaagaccctc cgacaactaa	4080
gggagttcct agggacggca ggcttctgtc gcctctggat ccctgggttt gcagaaatgg	4140
cagccccctt gtaccctctc accaaaacgg ggactctgtt taattggggc ccagaccaac	4200
aaaaggccta tcaagaaatc aagcaagctc ttctaactgc ccagccctg gggttgccag	4260
atttgactaa gccctttgaa ctctttgtcg acgagaagca gggctacgcc aaagggtgtcc	4320
taacgcaaaa actgggacct tggcgtcggc cggtggccta cctgtccaaa aagctagacc	4380
cagtagcagc tgggtggccc ccttgccctac ggatggtagc agccattgcc gtactgacaa	4440
aggatgcagg caagctaacc atgggacagc cactagtcac tctggcccc catgcagtag	4500
aggcactagt caaacaaccc cccgaccgct ggctttccaa cgcccggatg actcactatc	4560
aggccttgct tttggacacg gaccgggtcc agttcggacc ggtggtagcc ctgaaccggg	4620
ctacgtgct cccactgcct gaggaagggc tgcaacacaa ctgccttgat atcctggccg	4680

ES 2 709 481 T3

aagcccacgg	aacccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcggga	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	cagggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccatatcca	tggagaaaata	tacagaaggc	4980
gtggggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggtgacca	agcggcccg	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcaccc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagt	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggtt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggctgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaagg	gagtcagaca	gtggccgac	tgttggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	ccaaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gtcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	cggggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttcctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtgg	acctcacctt	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggtgg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcggtta	acgctctcaa	aacccccctca	agataagatt	aaccggtgga	agcccttaat	6420
agtcattggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	cccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtcaccaacc	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540

ES 2 709 481 T3

aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcagggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg	6720
tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaata ctcccttaag cgcggtaaca cccctggga	6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caacctctta gtcctagaat tcaactgatgc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
ccccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ccttcctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctagccccct caataccagt tccccctt ccaactaccag	7200
tacacctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccacccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctcacca atcccgacaa	7320
gaccaagaa tggttggtgt gcttagtgctc gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgcgggtca ggatcctact accttgacgc	7560
acccgccgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taatttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggtttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aacccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa	8340

ES 2 709 481 T3

gccgcttgga	ataaggccgg	tgtgcgtttg	tctatatgtt	attttccacc	atattgccgt	8400
cttttgga	tgtgaggcc	cggaaacctg	gccctgtctt	cttgacgagc	attcctaggg	8460
gtctttcccc	tctcgccaaa	ggaatgcaag	gtctgttgaa	tgtcgtgaag	gaagcagttc	8520
ctctggaagc	ttcttgaaga	caaacaacgt	ctgtagcgac	cctttgcagg	cagcggaacc	8580
ccccacctgg	cgacaggtgc	ctctgcggcc	aaaagccacg	tgtataagat	acacctgcaa	8640
aggcggcaca	accccagtg	cacgttgtga	gttgatagt	tgtggaaaga	gtcaaatggc	8700
tctcctcaag	cgtattcaac	aaggggctga	aggatgcccc	gaaggtaacc	cattgtatgg	8760
gatctgatct	ggggcctcgg	tgacatgct	ttacatgtgt	ttagtcgagg	ttaaaaaac	8820
gtctaggccc	cccgaaccac	ggggacgtgg	tttccctttg	aaaaacacga	ttataaatgg	8880
tgacaggggg	aatggcaagc	aagtgggatc	agaagggtat	ggacattgcc	tatgaggagg	8940
cggccttagg	ttacaaagag	ggtggtgttc	ctattggcgg	atgtcttacc	aataacaaag	9000
acggaagtgt	tctcggtcgt	ggtcacaaca	tgagatttca	aaagggatcc	gccacactac	9060
atggtgagat	ctccactttg	gaaaactgtg	ggagattaga	gggcaaagtg	tacaaagata	9120
ccactttgta	tacgacgctg	tctccatgct	acatgtgtac	aggtgccacc	atcatgtatg	9180
gtattccacg	ctgtgttgct	ggtgagaacg	ttaatttcaa	aagtaagggc	gagaaatatt	9240
tacaaactag	aggtcacgag	gttgtgtgtg	ttgacgatga	gaggtgtaaa	aagatcatga	9300
aacaatttat	cgatgaaaga	cctcaggatt	ggtttgaaga	tattggtgag	taggcggccg	9360
cagataaaat	aaaagatttt	atttagtctc	cagaaaaagg	ggggaatgaa	agacccacc	9420
tgtagggtttg	gcaagctagc	ttaagtaacg	ccattttgca	aggcatggaa	aaatacataa	9480
ctgagaatag	agaagttcag	atcaagggtc	ggaacagatg	gaacagctga	atatgggcca	9540
aacaggatat	ctgtggtaag	cagttcctgc	cccggctcag	ggccaagaac	agatggaaca	9600
gctgaatatg	ggccaaacag	gatatctgtg	gtaagcagtt	cctgccccgg	ctcagggcca	9660
agaacagatg	gtccccagat	gcggtccagc	cctcagcagt	ttctagagaa	ccatcagatg	9720
tttccagggt	gccccaaagg	cctgaaatga	ccctgtgcct	tatttgaact	aaccaatcag	9780
ttcgcttctc	gcttctgttc	gcgcgcttct	gtccccgag	ctcaataaaa	gagcccacaa	9840
cccctcactc	ggggcgccag	tcttccgatt	gactgagtcg	cccgggtacc	cgtgtatcca	9900
ataaaccttc	ttgcagttgc	atccgacttg	tggctctcgt	gttccttggg	agggctctct	9960
ctgagtgatt	gactaccctg	cagcgggggt	ctttcattac	atgtgagcaa	aaggccagca	10020
aaaggccagg	aaccgtaaaa	aggccgcgtt	gctggcggtt	ttccataggc	tccgcccccc	10080
tgacgagcat	cacaaaaatc	gacgtcaag	tcagaggtgg	cgaaaccgga	caggactata	10140
aagataccag	gcgtttcccc	ctggaagctc	cctcgtgcgc	tctcctgttc	cgaccctgcc	10200

ES 2 709 481 T3

gcttaccgga tacctgtccg cttttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcaatgctc 10260
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cggtcgctcc aagctgggct gtgtgcacga 10320
accccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc 10380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag 10440
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag 10500
gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag 10560
ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcggtggt ttttttggtt gcaagcagca 10620
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cgggggtctga 10680
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttgggtc atgagattat caaaaaggat 10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga 10800
gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg 10860
tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga 10920
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc 10980
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaaagt gtcctgcaac 11040
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc 11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtgggtg cacgctcgtc 11160
gtttggtatg gcttcattca gctccggtt ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc 11220
catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttggtc gaagtaagtt 11280
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataacc cgccacatag 11460
cagaacttta aaagtgtca tcattgaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta accactcgt gacccaact gatcttcagc 11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa 11640
aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
tcaagaattc at 11892

<210> 21

<211> 12007

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 709 481 T3

<220>

<223> Vector RCR - pACE-CD

<400> 21

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata tggagttccg	60
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt	120
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	180
atgggtggag tatttacggg aaactgcccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc	240
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta	300
catgacctta tgggactttc ctacttgga gtacatctac gtattagtca tcgctattac	360
catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg	420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg	480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt	540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg	600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaacctct tgcagttgca tccgacttgt	660
ggtctcgctg ttcttggga gggctctctc tgagtgattg actaccgctc agcgggggctc	720
tttcatttgg gggctcgctc gggatcggga gacccctgcc cagggaccac cgaccaccca	780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac	840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaaccg	900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgg cgcgaacct gggagacgtc ccagggactt	960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg	1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagAAC ctaaaacagt	1080
tcccgctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg	1140
tctgctgcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaga	1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg	1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttgggtt accttctgct	1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc	1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg	1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc cctccctgg gtcaagccct	1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac	1560
ctcctcgttc gaccccgctt cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg	1620

ES 2 709 481 T3

ccaaacctaa	acctcaagtt	ctttctgaca	gtggggggcc	gctcatcgac	ctacttacag	1680
aagaccccc	gccttatagg	gacccaagac	cacccccttc	cgacagggac	ggaaatggtg	1740
gagaagcgac	ccctgcggga	gaggcaccgg	accctcccc	aatggcatct	cgcctacgtg	1800
ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	1860
gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	1920
ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	gtaaactgac	agctctgac	gagtctgttc	1980
tcatcaccca	tcagcccacc	tgggacgact	gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	2040
gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	2100
gccccactca	actgcccaat	gaagtcgatg	ccgcttttcc	cctcgagcgc	ccagactggg	2160
attacaccac	ccaggcaggt	aggaaccacc	tagtccacta	tcgccagttg	ctcctagcgg	2220
gtctccaaaa	cgcgggcaga	agccccacca	atttggccaa	ggtaaaagga	ataacacaag	2280
ggcccaatga	gtctccctcg	gccttcctag	agagacttaa	ggaagcctat	cgcaggtaca	2340
ctccttatga	ccctgaggac	ccagggcaag	aaactaatgt	gtctatgtct	ttcatttggc	2400
agtctgcccc	agacattggg	agaaagttag	agagggttaga	agatttaaaa	aacaagacgc	2460
ttggagattt	ggttagagag	gcagaaaaga	tctttaataa	acgagaaacc	ccggaagaaa	2520
gagaggaacg	tatcaggaga	gaaacagagg	aaaaagaaga	acgccgtagg	acagaggatg	2580
agcagaaaga	gaaagaaaga	gatcgtagga	gacatagaga	gatgagcaag	ctatttgcca	2640
ctgtcgttag	tggacagaaa	caggatagac	agggaggaga	acgaaggagg	tcccaactcg	2700
atcgcgacca	gtgtgcctac	tgcaaagaaa	aggggcactg	ggctaaagat	tgtcccaaga	2760
aaccacgagg	acctcgggga	ccaagacccc	agacctccct	cctgacccta	gatgactagg	2820
gaggtcaggg	tcaggagccc	ccccctgaac	ccaggataac	cctcaaagtc	ggggggcaac	2880
ccgtcacctt	cctggtagat	actggggccc	aacactccgt	gctgacccaa	aatcctggac	2940
ccctaagtga	taagtctgcc	tgggtccaag	gggctactgg	aggaaagcgg	tatcgctgga	3000
ccacggatcg	caaagtacat	ctagctaccg	gtaaggtcac	ccactctttc	ctccatgtac	3060
cagactgtcc	ctatcctctg	ttaggaagag	atttgctgac	taaactaaaa	gccccaatcc	3120
actttgaggg	atcaggagcc	caggttatgg	gaccaatggg	gcagccccctg	caagtgttga	3180
ccctaaatat	agaagatgag	catcggctac	atgagacctc	aaaagagcca	gatgtttctc	3240
taggggtccac	atggctgtct	gattttcctc	aggcctgggc	ggaaaccggg	ggcatgggac	3300
tggcagttcg	ccaagctcct	ctgatcatac	ctctgaaagc	aacctctacc	cccgtgtcca	3360
taaaacaata	ccccatgtca	caagaagcca	gactgggggat	caagccccac	atacagagac	3420

ES 2 709 481 T3

tgttggacca	gggaataactg	gtaccctgcc	agtccccctg	gaacacgccc	ctgctacccg	3480
ttaagaaacc	agggactaat	gattataggc	ctgtccagga	tctgagagaa	gtcaacaagc	3540
gggtggaaga	catccacccc	accgtgccc	acccttacaa	cctcttgagc	gggctccccc	3600
cgtcccacca	gtggtacact	gtgcttgatt	taaaggatgc	ctttttctgc	ctgagactcc	3660
accccaccag	tcagcctctc	ttcgcccttg	agtggagaga	tccagagatg	ggaatctcag	3720
gacaattgac	ctggaccaga	ctcccacagg	gtttcaaaaa	cagtcccacc	ctgtttgatg	3780
aggcactgca	cagagaccta	gcagacttcc	ggatccagca	cccagacttg	atcctgctac	3840
agtacgtgga	tgacttactg	ctggccgcca	cttctgagct	agactgcaa	caaggtactc	3900
gggccctggt	acaaacccta	gggaacctcg	ggtatcgggc	ctcggccaag	aaagcccaaa	3960
tttgccagaa	acaggtcaag	tatctgggg	atcttctaaa	agagggtcag	agatggctga	4020
ctgaggccag	aaaagagact	gtgatggggc	agcctactcc	gaagaccctc	cgacaactaa	4080
gggagttcct	agggacggca	ggcttctgtc	gcctctggat	ccctgggttt	gcagaaatgg	4140
cagccccctt	gtaccctctc	acaaaaacgg	ggactctggt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
atttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggctacgcc	aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgctcggc	cgggtggcta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcac	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccgaccgct	ggctttccaa	cgcccggatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttgacacag	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaacccgg	4620
ctacgtgctg	cccactgctt	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aacccgaccc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcggga	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaa	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccatatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagtg	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccattttatg	5280

ES 2 709 481 T3

ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agacttttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccggca	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggatt	gatatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggtcgt	aaccaagaag	ctactagagg	5700
agatcttccc	caggttcggc	atgcctcagg	tattgggaac	tgacaatggg	cctgccttcg	5760
tctccaaggt	gagtcagaca	gtggccgata	tggtggggat	tgattggaaa	ttacattgtg	5820
catacagacc	caaagctca	ggccaggtag	aaagaatgaa	tagaaccatc	aaggagactt	5880
taactaaatt	aacgcttgca	actggctcta	gagactgggt	gtcctactc	cccttagccc	5940
tgtaccgagc	ccgcaacacg	ccgggcccc	atggcctcac	cccatatgag	atcttatatg	6000
gggcaccccc	gccccttgta	aacttcctg	accctgacat	gacaagagtt	actaacagcc	6060
cctctctcca	agctcactta	caggctctct	acttagtcca	gcacgaagtc	tggagacctc	6120
tggcggcagc	ctaccaagaa	caactggacc	gaccggtggt	acctcaccct	taccgagtcg	6180
gcgacacagt	gtgggtccgc	cgacaccaga	ctaagaacct	agaacctcgc	tggaaaggac	6240
cttacacagt	cctgctgacc	acccccaccg	ccctcaaagt	agacggcatc	gcagcttgga	6300
tacacgccgc	ccacgtgaag	gctgccgacc	ccgggggtgg	accatcctct	agactgacat	6360
ggcgcgttca	acgctctcaa	aacccccctca	agataagatt	aacccttgga	agcccttaat	6420
agtcattggga	gtcctgttag	gagtagggat	ggcagagagc	ccccatcagg	tctttaatgt	6480
aacctggaga	gtaccaaac	tgatgactgg	gcgtaccgcc	aatgccacct	ccctcctggg	6540
aactgtacaa	gatgccttcc	caaaattata	ttttgatcta	tgtgatctgg	tcggagagga	6600
gtgggaccct	tcagaccagg	aaccgtatgt	cgggtatggc	tgcaagtacc	ccgcagggag	6660
acagcggacc	cggacttttg	acttttacgt	gtgccctggg	cataccgtaa	agtcgggggtg	6720
tgggggacca	ggagagggct	actgtggtaa	atgggggtgt	gaaaccaccg	gacaggctta	6780
ctggaagccc	acatcatcgt	gggacctaat	ctcccttaag	cgcggttaaca	ccccctggga	6840
cacgggatgc	tctaaagttg	cctgtggccc	ctgctacgac	ctctccaaag	tatccaattc	6900
cttccaaggg	gctactcgag	ggggcagatg	caaccctcta	gtcctagaat	tcactgatgc	6960
aggaaaaaag	gctaactggg	acgggcccaa	atcgtgggga	ctgagactgt	accggacagg	7020
aacagatcct	attacatgt	tctccctgac	ccggcaggtc	cttaatgtgg	gaccccgagt	7080

ES 2 709 481 T3

cccataggg	cccaaccag	tattaccga	ccaaagactc	ccttcctcac	caatagagat	7140
tgtaccggct	ccacagccac	ctagccccct	caataccagt	tacccccctt	ccactaccag	7200
tacaccctca	acctccccta	caagtccaag	tgtcccacag	ccacccccag	gaactggaga	7260
tagactacta	gctctagtca	aaggagccta	tcaggcgctt	aacctcacca	atcccgacaa	7320
gaccaagaa	tgttggctgt	gcttagtgtc	gggacctcct	tattacgaag	gagtagcggt	7380
cgtgggcact	tataccaatc	attccaccgc	tccggccaac	tgtacggcca	cttcccaaca	7440
taagcttacc	ctatctgaag	tgacaggaca	gggcctatgc	atgggggcag	tacctaaaac	7500
tcaccaggcc	ttatgtaaca	ccacccaaag	cgccggctca	ggatcctact	accttgacgc	7560
acccgccgga	acaatgtggg	cttgacgcac	tggattgact	ccctgcttgt	ccaccacggt	7620
gctcaatcta	accacagatt	attgtgtatt	agttgaactc	tggcccagag	taattttacca	7680
ctccccgat	tatatgtatg	gtcagcttga	acagcgtacc	aaatataaaa	gagagccagt	7740
atcattgacc	ctggcccttc	tactaggagg	attaaccatg	ggagggattg	cagctggaat	7800
agggacgggg	accactgcct	taattaaaac	ccagcagttt	gagcagcttc	atgccgctat	7860
ccagacagac	ctcaacgaag	tcgaaaagtc	aattaccaac	ctagaaaagt	cactgacctc	7920
gttgtctgaa	gtagtcctac	agaaccgcag	aggcctagat	ttgctattcc	taaaggaggg	7980
aggtctctgc	gcagccctaa	aagaagaatg	ttgtttttat	gcagaccaca	cggggctagt	8040
gagagacagc	atggccaaat	taagagaaag	gcttaatcag	agacaaaaac	tatttgagac	8100
aggccaagga	tggttcgaag	ggctgtttta	tagatcccc	tggtttacca	ccttaatctc	8160
caccatcatg	ggacctctaa	tagtactctt	actgatctta	ctctttggac	cttgcaattct	8220
caatcgatta	gtccaatttg	ttaaagacag	gatatcagtg	gtccaggctc	tagttttgac	8280
tcaacaatat	caccagctga	agcctataga	gtacgagcca	tgacgtacgt	tactggccga	8340
agccgcttgg	aataaggccg	gtgtgcgttt	gtctatatgt	tattttccac	catattgccg	8400
tcttttgga	atgtgagggc	ccggaaacct	ggccctgtct	tcttgacgag	cattcctagg	8460
ggctctttccc	ctctcgccaa	aggaatgcaa	ggtctgttga	atgtcgtgaa	ggaagcagtt	8520
cctctggaag	cttcttgaag	acaaacaacg	tctgtagcga	ccctttgcag	gcagcggaac	8580
ccccacctg	gcgacagggt	cctctgcggc	caaaagccac	gtgtataaga	tacacctgca	8640
aaggcgccac	aaccccagtg	ccacgttgtg	agttggatag	ttgtggaaag	agtcaaattg	8700
ctctcctcaa	gcgtattcaa	caaggggctg	aaggatgccc	agaaggtacc	ccattgtatg	8760
ggatctgatc	tggggcctcg	gtgcacatgc	tttacctgtg	tttagtcgag	gttaaaaaaa	8820
cgtctaggcc	ccccgaacca	cggggacgtg	gttttccttt	gaaaaaacacg	ataataccat	8880
ggtgacaggg	ggaatggcaa	gcaagtggga	tcagaagggg	atggacattg	cctatgagga	8940

ES 2 709 481 T3

ggcggcctta ggttacaaag aggggtggtgt tcctattggc ggatgtctta tcaataacaa	9000
agacggaagt gttctcggtc gtggtcacaa catgagattt caaaagggat cgcgcacact	9060
acatggtgag atctccactt tggaaaactg tgggagatta gagggcaaag tgtacaaaga	9120
taccactttg tatacgacgc tgtctccatg cgacatgtgt acaggtgcca tcatcatgta	9180
tggatttcca cgctgtgttg tcggtgagaa cgtaatttc aaaagtaagg gcgagaaata	9240
tttacaaact agaggtcacg aggttgttgt tgttgacgat gagaggtgta aaaagatcat	9300
gaaacaattt atcgatgaaa gacctcagga ttggtttgaa gatattgggtg agtaggcggc	9360
cgcgccatag ataaaataaa agattttatt tagtctccag aaaaaggggg gaataaaaga	9420
ccccacctgt aggtttggca agctagctta agtaacgcca ttttgcaagg catggaaaaa	9480
tacataactg agaatagaga agttcagatc aaggtcagga acagatggaa cagctgaata	9540
tgggccaac aggatattctg tggttaagcag ttcttgcccc ggctcagggc caagaacaga	9600
tggaacagct gaatatgggc caaacaggat atctgtggta agcagttcct gccccggctc	9660
agggccaaga acagatggtc ccagatgctg gtccagccct cagcagtttc tagagaacca	9720
tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct gaaatgacct tgtgccttgt ttaaactaac	9780
caatcagttc gcttctcgct tctgttcgct cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag	9840
cccacaacct ctactcggg gcgccagtcc tccgattgac tgagtcgccc gggtagccgt	9900
gtatccaata aacctcttg cagttgcatc cgacttgttg tctcgctgtt ccttgggagg	9960
gtctcctctg agtgattgac taccgctcag cgggggtctt tcatttgggg gctcgtccgg	10020
gatcgggaga cccttgccca gggaccaccg acccaccacc gggaggtaag ctggctgcct	10080
cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg	10140
ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggetccgc cccctgacg	10200
agcatcacia aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat	10260
accaggcggt tccccctgga agtccctcg tgcgctctcc tgttcgacc ctgccgtta	10320
cggataacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcggtgc gctttctcaa tgcacacgt	10380
gtaggatatct cagttcggtg taggtcggtc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc	10440
cgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa	10500
gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg	10560
taggcgggtgc tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaaggacag	10620
tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt	10680
gatccggcaa acaaacacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta	10740

ES 2 709 481 T3

cgcgagagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc 10800
 agtgggaacga aaactcacgt taagggaattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca 10860
 cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa 10920
 cttgggtctga cagttaccaaa tgcttaataca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat 10980
 ttcgttcacac catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggaggggt 11040
 taccatctgg cccagtggt gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt 11100
 tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgagc aagtggctct gcaactttat 11160
 ccgcctccat ccagttctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta 11220
 atagtttgcg caacgttggt gccattgctg caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg 11280
 gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt 11340
 tgtgcaaaaa agcgggttagc tccttcgggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg 11400
 cagtgttata actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg 11460
 taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgatgac 11520
 ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcggtcaa cacgggataa taccgcgcca catagcagaa 11580
 ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac 11640
 cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt 11700
 ttactttcac cagcgtttct gggtagagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg 11760
 gaataagggc gacacggaaa tggtgaatac tcatactctt cttttttcaa tattattgaa 11820
 gcattttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata 11880
 aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca 11940
 ttattatcat gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtcttcaag 12000
 aattcat 12007

<210> 22

<211> 11893

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Vector RCR - pAC3-yCD2

<400> 22

tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 60
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt 120
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 180
 atgggtggag tattttacggt aaactgocca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 240

ES 2 709 481 T3

aagtaagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 300
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 360
catggtgatg cggtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 420
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 480
ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggag gtaggcgtgt 540
acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cggcgccagt cctccgattg 600
actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt 660
ggtctcgctg ttctttggga gggctctctc tgagtgattg actaccgctc agcggggggtc 720
tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga gaccctgcc cagggaccac cgaccacca 780
ccgggaggta agctggccag caacttatct gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac 840
tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt agctaactag ctctgtatct ggcggaccgg 900
tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgg ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt 960
cggggggcgt ttttgtggcc cgacctgagt ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg 1020
gtgcaccccc cttagaggag ggatatgtgg ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt 1080
tcccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg 1140
tctgtctcag catcgttctg tgttgtctct gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaaa 1200
atatgggcca gactgttacc actcccttaa gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg 1260
agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg tcaagaagag acgttggggtt accttctgct 1320
ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc 1380
tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt cacctggccc gcatggacac ccagaccagg 1440
tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg cttttgaccc ccctccctgg gtcaagccct 1500
ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac 1560
ctcctcgttc gaccccgct cgatcctccc tttatccagc cctcactcct tctctaggcg 1620
ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag 1680
aagaccccc gccttatagg gacccaagac cacccttctc cgacagggag ggaaatggtg 1740
gagaagcgac ccctgcggga gaggcaccgg acccctcccc aatggcatct cgcctacgtg 1800
ggagacggga gccccctgtg gccgactcca ctacctcgca ggcattcccc ctccgcgcag 1860
gaggaaacgg acagcttcaa tactggccgt tctcctcttc tgacctttac aactggaaaa 1920
ataataaccc ttctttttct gaagatccag gtaaaactgac agctctgatc gagtctgtcc 1980
tcatcaccca tcagcccacc tgggacgact gtcagcagct gttggggact ctgctgaccg 2040

ES 2 709 481 T3

gagaagaaaa acaacgggtg ctcttagagg ctagaaaggc ggtgcggggc gatgatgggc 2100
gccccactca actgccaat gaagtcgatg ccgcttttcc cctcgagcgc ccagactggg 2160
attacaccac ccaggcaggt aggaaccacc tagtccacta tcgccagttg ctccatagcgg 2220
gtctccaaaa cgcgggcaga agccccacca atttggccaa ggtaaaagga ataacacaag 2280
ggcccaatga gtctccctcg gccttcctag agagacttaa ggaagcctat cgcagggtaca 2340
ctccttatga cctgaggac ccagggcaag aaactaatgt gtctatgtct ttcatattggc 2400
agtctgcccc agacattggg agaaagttag agaggttaga agatttaaaa aacaagacgc 2460
ttggagattht ggtagagag gcagaaaaga tctttaataa acgagaaacc ccggaagaaa 2520
gagaggaacg tatcaggaga gaaacagagg aaaaagaaga acgccgtagg acagaggatg 2580
agcagaaaga gaaagaaaga gatcgttaga gacatagaga gatgagcaag ctattggcca 2640
ctgtcgttag tggacagaaa caggatagac agggaggaga acgaaggagg tcccaactcg 2700
atcgcgacca gtgtgcctac tgcaaagaaa aggggcactg ggctaaagat tgtccaaga 2760
aaccacgagg acctcgggga ccaagacccc agacctccct cctgacccta gatgactagg 2820
gaggtcaggg tcaggagccc cccctgaac ccaggataac cctcaaagtc ggggggcaac 2880
ccgtcacctt cctggtagat actggggccc aacactccgt gctgaccaa aatcctggac 2940
ccctaagtga taagtctgcc tgggtccaag gggctactgg aggaaagcgg tatcgctgga 3000
ccacggatcg caaagtacat ctactaccg gtaaggtcac ccactctttc ctccatgtac 3060
cagactgtcc ctatcctctg ttaggaagag atttgctgac taaactaaaa gccc aaatcc 3120
actttgaggg atcaggagcc cagggttatgg gaccaatggg gcagccctg caagtgttga 3180
ccctaaatat agaagatgag tatcggctac atgagacctc aaaagagcca gatgtttctc 3240
tagggccac atggctgtct gattttctc aggcctgggc ggaaaccggg ggcatgggac 3300
tggcagttcg ccaagctcct ctgatcatac ctctgaaagc aacctctacc cccgtgtcca 3360
taaaacaata cccatgtca caagaagcca gactgggat caagccccac atacagagac 3420
tgttggaaca gggaatactg gtaccctgcc agtccccctg gaacacgccc ctgctacccg 3480
ttaagaaacc agggactaat gattataagg ctgtccagga tctgagagaa gtcaacaagc 3540
gggtggaaga catccacccc accgtgcca acccttaca cctcttgagc gggctccac 3600
cgccccacca gtggtacact gtgcttgatt taaaggatgc ctttttctgc ctgagactcc 3660
accccaccag tcagcctctc ttgcctttg agtggagaga tccagagatg ggaatctcag 3720
gacaattgac ctggaccaga ctcccacagg gtttcaaaaa cagtcccacc ctgtttgatg 3780
aggcactgca cagagacctc gcagacttcc ggatccagca cccagacttg atcctgctac 3840
agtacgtgga tgacttactg ctggccgcca cttctgagct agactgcaa caaggctac 3900

ES 2 709 481 T3

gggccctgtt	acaaacccta	gggaacctcg	ggtatcgggc	ctcggccaag	aaagcccaaa	3960
tttgccagaa	acaggtcaag	tatctggggt	atcttctaaa	agagggtcag	agatggctga	4020
ctgaggccag	aaaagagact	gtgatggggc	agcctactcc	gaagaccctt	cgacaactaa	4080
gggagttcct	agggacggca	ggcttctgtc	gcctctggat	ccctggggtt	gcagaaatgg	4140
cagccccctt	gtaccctctc	acaaaaacgg	ggactctgtt	taattggggc	ccagaccaac	4200
aaaaggccta	tcaagaaatc	aagcaagctc	ttctaactgc	cccagccctg	gggttgccag	4260
atttgactaa	gccctttgaa	ctctttgtcg	acgagaagca	gggctacgcc	aaaggtgtcc	4320
taacgcaaaa	actgggacct	tggcgtcggc	cgggtggccta	cctgtccaaa	aagctagacc	4380
cagtagcagc	tgggtggccc	ccttgccctac	ggatggtagc	agccattgcc	gtactgacaa	4440
aggatgcagg	caagctaacc	atgggacagc	cactagtcat	tctggccccc	catgcagtag	4500
aggcactagt	caaacaaccc	cccgaccgct	ggctttccaa	cgcccggatg	actcactatc	4560
aggccttgct	tttggacacg	gaccgggtcc	agttcggacc	ggtggtagcc	ctgaaccggy	4620
ctacgttgct	cccactgcct	gaggaagggc	tgcaacacaa	ctgccttgat	atcctggccg	4680
aagcccacgg	aaccgcgacc	gacctaacgg	accagccgct	cccagacgcc	gaccacacct	4740
ggtacacgga	tggaagcagt	ctcttacaag	agggacagcg	taaggcgggg	gctgcggtga	4800
ccaccgagac	cgaggtaatc	tgggctaaag	ccctgccagc	cgggacatcc	gctcagcggg	4860
ctgaactgat	agcactcacc	caggccctaa	agatggcaga	aggtaagaag	ctaaatgttt	4920
atactgatag	ccgttatgct	tttgctactg	cccatatcca	tggagaaata	tacagaaggc	4980
gtgggttgct	cacatcagaa	ggcaaagaga	tcaaaaataa	agacgagatc	ttggccctac	5040
taaaagccct	ctttctgccc	aaaagactta	gcataatcca	ttgtccagga	catcaaaagg	5100
gacacagcgc	cgaggctaga	ggcaaccgga	tggctgacca	agcggcccga	aaggcagcca	5160
tcacagagac	tccagacacc	tctaccctcc	tcatagaaaa	ttcatcacc	tacacctcag	5220
aacattttca	ttacacagt	actgatataa	aggacctaac	caagttgggg	gccatttatg	5280
ataaaacaaa	gaagtattgg	gtctaccaag	gaaaacctgt	gatgcctgac	cagtttactt	5340
ttgaattatt	agactttctt	catcagctga	ctcacctcag	cttctcaaaa	atgaaggctc	5400
tcctagagag	aagccacagt	ccctactaca	tgctgaaccg	ggatcgaaca	ctcaaaaata	5460
tcactgagac	ctgcaaagct	tgtgcacaag	tcaacgccag	caagtctgcc	gttaaacagg	5520
gaactagggg	ccgcgggcat	cggcccgga	ctcattggga	gatcgatttc	accgagataa	5580
agcccggatt	gtatggctat	aaatatcttc	tagtttttat	agataccttt	tctggctgga	5640
tagaagcctt	cccaaccaag	aaagaaaccg	ccaaggctcg	aaccaagaag	ctactagagg	5700

ES 2 709 481 T3

agatcttccc caggttcggc atgcctcagg tatttggaac tgacaatggg cctgccttcg	5760
tctccaaggt gagtcagaca gtggccgatc tgttggggat tgattggaaa ttacattgtg	5820
catacagacc ccaaagctca ggccaggtag aaagaatgaa tagaaccatc aaggagactt	5880
taactaaatt aacgcttgca actggctcta gagactgggt gctcctactc cccttagccc	5940
tgtaccgagc ccgcaacacg ccggggcccc atggcctcac cccatatgag atcttatatg	6000
gggcaccccc gcccttgta aacttccttg accctgacat gacaagagtt actaacagcc	6060
cctctctcca agctcactta caggctctct acttagtcca gcacgaagtc tggagacctc	6120
tggcggcagc ctaccaagaa caactggacc gaccggtggt acctaccctt taccgagtcg	6180
gcgacacagt gtgggtccgc cgacaccaga ctaagaacct agaacctcgc tggaaaggac	6240
cttacacagt cctgctgacc acccccaccg ccctcaaagt agacggcatc gcagcttgga	6300
tacacgccgc ccacgtgaag gctgccgacc ccgggggtgg accatcctct agactgacat	6360
ggcgcgttca acgctctcaa aacccccctc agataagatt aaccggtgga agcccttaat	6420
agtcatggga gtctctgttag gtagtaggat ggcagagagc ccccatcagg tctttaatgt	6480
aacctggaga gtcaccaacc tgatgactgg gcgtaccgcc aatgccacct ccctcctggg	6540
aactgtacaa gatgccttcc caaaattata ttttgatcta tgtgatctgg tcggagagga	6600
gtgggaccct tcagaccagg aaccgtatgt cgggtatggc tgcaagtacc ccgcaggag	6660
acagcggacc cggacttttg acttttacgt gtgccctggg cataccgtaa agtcgggggtg	6720
tgggggacca ggagagggct actgtggtaa atgggggtgt gaaaccaccg gacaggctta	6780
ctggaagccc acatcatcgt gggacctaat ctcccttaag cgcggtaaca ccccctggga	6840
cacgggatgc tctaaagttg cctgtggccc ctgctacgac ctctccaaag tatccaattc	6900
cttccaaggg gctactcgag ggggcagatg caaccctcta gtcttagaat tctactgatc	6960
aggaaaaaag gctaactggg acgggcccac atcgtgggga ctgagactgt accggacagg	7020
aacagatcct attaccatgt tctccctgac ccggcaggtc cttaatgtgg gaccccgagt	7080
cccataggg cccaaccag tattaccga ccaaagactc ctttctcac caatagagat	7140
tgtaccggct ccacagccac ctgccccct caataccagt tccccctt ccactaccag	7200
tacaccctca acctccccta caagtccaag tgtcccacag ccacccccag gaactggaga	7260
tagactacta gctctagtca aaggagccta tcaggcgctt aacctacca atcccgacaa	7320
gacccaagaa tgttggctgt gcttagtgct gggacctcct tattacgaag gagtagcgg	7380
cgtgggcaact tataccaatc attccaccgc tccggccaac tgtacggcca cttcccaaca	7440
taagcttacc ctatctgaag tgacaggaca gggcctatgc atgggggcag tacctaaaac	7500
tcaccaggcc ttatgtaaca ccacccaaag cgccggctca ggatcctact accttgagc	7560

ES 2 709 481 T3

accgcgcgga acaatgtggg cttgcagcac tggattgact ccctgcttgt ccaccacggt	7620
gctcaatcta accacagatt attgtgtatt agttgaactc tggcccagag taattttacca	7680
ctccccgat tatatgtatg gtcagcttga acagcgtacc aaatataaaa gagagccagt	7740
atcattgacc ctggcccttc tactaggagg attaaccatg ggagggattg cagctggaat	7800
agggacgggg accactgcct taattaaaac ccagcagttt gagcagcttc atgccgctat	7860
ccagacagac ctcaacgaag tcgaaaagtc aattaccaac ctagaaaagt cactgacctc	7920
gttgtctgaa gtagtcctac agaaccgcag aggcctagat ttgctattcc taaaggaggg	7980
aggtctctgc gcagccctaa aagaagaatg ttgtttttat gcagaccaca cggggctagt	8040
gagagacagc atggccaaat taagagaaag gcttaatcag agacaaaaac tatttgagac	8100
aggccaagga tggttcgaag ggctgtttaa tagatcccc tggttttacca ccttaatctc	8160
caccatcatg ggacctctaa tagtactctt actgatctta ctctttggac cttgcattct	8220
caatcgattg gtccaatttg ttaaagacag gatctcagtg gtccaggctc tggttttgac	8280
tcagcaatat caccagctaa aaccataga gtacgagcca tgaacgcgtt actggccgaa	8340
gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt	8400
cttttgga caa tgtgagggcc cgaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg	8460
gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc	8520
ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcggaacc	8580
ccccacctgg cgacagggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa	8640
agggggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc	8700
tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgcca gaaggtaacc cattgtatgg	8760
gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaaac	8820
gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga ttataaatgg	8880
tgaccggcgg catggcctcc aagtgggatc aaaagggcat ggatatcgct tacgaggagg	8940
ccctgctggg ctacaaggag ggcggcgtgc ctatcggcgg ctgtctgac aacaacaagg	9000
acggcagtgt gctgggcagg ggccacaaca tgaggttcca gaagggtcc gccaccctgc	9060
acggcgagat ctccaccctg gagaactgtg gcaggctgga gggcaagggtg tacaaggaca	9120
ccaccctgta caccaccctg tccccttgtg acatgtgtac cggcgctatc atcatgtacg	9180
gcatccctag gtgtgtgatc ggcgagaacg tgaacttcaa gtccaagggc gagaagtacc	9240
tgcaaaccag gggccacgag gtggtggttg ttgacgatga gaggtgtaag aagctgatga	9300
agcagttcat cgacgagagg cctcaggact ggttcgagga tatcggcgag taagcggccg	9360

ES 2 709 481 T3

cagataaaat aaaagatttt atttagtctc cagaaaaagg ggggaatgaa agaccccacc	9420
tgtaggtttg gcaagctagc ttaagtaacg ccattttgca aggcattggaa aaatacataa	9480
ctgagaatag agaagttcag atcaagggtc ggaacagatg gaacagctga atatgggcca	9540
aacaggatat ctgtggtaag cagttcctgc cccggctcag ggccaagaac agatggaaca	9600
gctgaatatg ggccaaacag gatattctgt gtaagcagtt cctgccccgg ctgaggcca	9660
agaacagatg gtccccagat gcggtccagc cctcagcagt ttctagagaa ccatcagatg	9720
tttccagggt gcccacagga cctgaaatga ccctgtgcct tatttgaact aaccaatcag	9780
ttcgcttctc gcttctgttc gcgcgcttct gctccccgag ctcaataaaa gagcccacaa	9840
cccctcactc gggggcgccag tcctccgatt gactgagtcg cccgggtacc cgtgtatcca	9900
ataaaccttc ttgcagttgc atccgacttg tggctctcgt gttccttggg agggctctct	9960
ctgagtgatt gactaccctg cagcgggggt ctttcattac atgtgagcaa aaggccagca	10020
aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccatagge tccgcccccc	10080
tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagagggtg cgaaaccgga caggactata	10140
aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	10200
gcttaccgga tacctgtcgg cttttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	10260
acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	10320
acccccggt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc	10380
ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcgag	10440
gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag	10500
gacagtatth ggtatctgcg ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag	10560
ctcttgatcc ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt ttttttgttt gcaagcagca	10620
gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcccttg atcttttcta cgggggtctga	10680
cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat	10740
cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	10800
gtaaaacttg tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg	10860
tctatttcgt tcatccatag ttgctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga	10920
gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc	10980
agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtcttgcaac	11040
tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc	11100
agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctgcaggc atcgtgggtg cacgctcgtc	11160
gtttggtatg gcttcattca gctccgggtc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc	11220

ES 2 709 481 T3

catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgtca gaagtaagtt 11280
ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc 11340
atccgtaaga tgcttttctg tgactgggtga gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg 11400
tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag 11460
cagaacttta aaagtgtctca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat 11520
cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc 11580
atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa 11640
aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta 11700
ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa 11760
aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga 11820
aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct 11880
tcaagaattc cat 11893

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

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

<400> 23
aaggggaggt aaccctggcc ctttgggtcg gggccccggg cagccgcgcg ccccttccca 60
cggggccctt tactgcgcgc cgcgcccggc cccaccct cgagcaccc cgcgccccgc 120
gccctcccag ccgggtccag ccggagccat ggggcccggag ccgcagtgag cacc atg 177
Met
1
gag ctg gcg gcc ttg tgc cgc tgg ggg ctc ctc ctc gcc ctc ttg ccc 225
Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu Pro
5 10 15
ccc gga gcc gcg agc acc caa gtg tgc acc ggc aca gac atg aag ctg 273
Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys Leu
20 25 30
cgg ctc cct gcc agt ccc gag acc cac ctg gac atg ctc cgc cac ctc 321
Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His Leu
35 40 45
tac cag ggc tgc cag gtg gtg cag gga aac ctg gaa ctc acc tac ctg 369
Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr Leu
50 55 60 65

ES 2 709 481 T3

ccc acc aat gcc agc ctg tcc ttc ctg cag gat atc cag gag gtg cag Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val Gln 70 75 80	417
ggc tac gtg ctc atc gct cac aac caa gtg agg cag gtc cca ctg cag Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu Gln 85 90 95	465
agg ctg cgg att gtg cga ggc acc cag ctc ttt gag gac aac tat gcc Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr Ala 100 105 110	513
ctg gcc gtg cta gac aat gga gac ccg ctg aac aat acc acc cct gtc Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro Val 115 120 125	561
aca ggg gcc tcc cca gga ggc ctg cgg gag ctg cag ctt cga agc ctc Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser Leu 130 135 140 145	609
aca gag atc ttg aaa gga ggg gtc ttg atc cag cgg aac ccc cag ctc Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln Leu 150 155 160	657
tgc tac cag gac acg att ttg tgg aag gac atc ttc cac aag aac aac Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn Asn 165 170 175	705
cag ctg gct ctc aca ctg ata gac acc aac cgc tct cgg gcc tgc cac Gln Leu Ala Leu Thr Leu Ile Asp Thr Asn Arg Ser Arg Ala Cys His 180 185 190	753
ccc tgt tct ccg atg tgt aag ggc tcc cgc tgc tgg gga gag agt tct Pro Cys Ser Pro Met Cys Lys Gly Ser Arg Cys Trp Gly Glu Ser Ser 195 200 205	801
gag gat tgt cag agc ctg acg cgc act gtc tgt gcc ggt ggc tgt gcc Glu Asp Cys Gln Ser Leu Thr Arg Thr Val Cys Ala Gly Gly Cys Ala 210 215 220 225	849
cgc tgc aag ggg cca ctg ccc act gac tgc tgc cat gag cag tgt gct Arg Cys Lys Gly Pro Leu Pro Thr Asp Cys Cys His Glu Gln Cys Ala 230 235 240	897
gcc ggc tgc acg ggc ccc aag cac tct gac tgc ctg gcc tgc ctc cac Ala Gly Cys Thr Gly Pro Lys His Ser Asp Cys Leu Ala Cys Leu His 245 250 255	945
ttc aac cac agt ggc atc tgt gag ctg cac tgc cca gcc ctg gtc acc Phe Asn His Ser Gly Ile Cys Glu Leu His Cys Pro Ala Leu Val Thr 260 265 270	993
tac aac aca gac acg ttt gag tcc atg ccc aat ccc gag ggc cgg tat Tyr Asn Thr Asp Thr Phe Glu Ser Met Pro Asn Pro Glu Gly Arg Tyr 275 280 285	1041
aca ttc ggc gcc agc tgt gtg act gcc tgt ccc tac aac tac ctt tct Thr Phe Gly Ala Ser Cys Val Thr Ala Cys Pro Tyr Asn Tyr Leu Ser 290 295 300 305	1089
acg gac gtg gga tcc tgc acc ctc gtc tgc ccc ctg cac aac caa gag	1137

ES 2 709 481 T3

Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln	Glu	
				310					315					320		
gtg	aca	gca	gag	gat	gga	aca	cag	cgg	tgt	gag	aag	tgc	agc	aag	ccc	1185
Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	Pro	
			325					330					335			
tgt	gcc	cga	gtg	tgc	tat	ggg	ctg	ggc	atg	gag	cac	ttg	cga	gag	gtg	1233
Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	Val	
			340				345					350				
agg	gca	gtt	acc	agt	gcc	aat	atc	cag	gag	ttt	gct	ggc	tgc	aag	aag	1281
Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	Lys	
			355			360					365					
atc	ttt	ggg	agc	ctg	gca	ttt	ctg	ccg	gag	agc	ttt	gat	ggg	gac	cca	1329
Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	Pro	
370					375				380						385	
gcc	tcc	aac	act	gcc	ccg	ctc	cag	cca	gag	cag	ctc	caa	gtg	ttt	gag	1377
Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	Glu	
				390					395				400			
act	ctg	gaa	gag	atc	aca	ggg	tac	cta	tac	atc	tca	gca	tgg	ccg	gac	1425
Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	Asp	
			405				410					415				
agc	ctg	cct	gac	ctc	agc	gtc	ttc	cag	aac	ctg	caa	gta	atc	cgg	gga	1473
Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	Gly	
		420				425					430					
cga	att	ctg	cac	aat	ggc	gcc	tac	tcg	ctg	acc	ctg	caa	ggg	ctg	ggc	1521
Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	Gly	
		435				440					445					
atc	agc	tgg	ctg	ggg	ctg	cgc	tca	ctg	agg	gaa	ctg	ggc	agt	gga	ctg	1569
Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	Leu	
450					455				460						465	
gcc	ctc	atc	cac	cat	aac	acc	cac	ctc	tgc	ttc	gtg	cac	acg	gtg	ccc	1617
Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	Pro	
				470					475					480		
tgg	gac	cag	ctc	ttt	cgg	aac	ccg	cac	caa	gct	ctg	ctc	cac	act	gcc	1665
Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr	Ala	
			485				490						495			
aac	cgg	cca	gag	gac	gag	tgt	gtg	ggc	gag	ggc	ctg	gcc	tgc	cac	cag	1713
Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His	Gln	
		500					505					510				
ctg	tgc	gcc	cga	ggg	cac	tgc	tgg	ggg	cca	ggg	ccc	acc	cag	tgt	gtc	1761
Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys	Val	
		515				520					525					
aac	tgc	agc	cag	ttc	ctt	cgg	ggc	cag	gag	tgc	gtg	gag	gaa	tgc	cga	1809
Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys	Arg	
530					535					540					545	
gta	ctg	cag	ggg	ctc	ccc	agg	gag	tat	gtg	aat	gcc	agg	cac	tgt	ttg	1857
Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys	Leu	

ES 2 709 481 T3

550	555	560	
ccg tgc cac cct gag tgt cag ccc cag aat ggc tca gtg acc tgt ttt Pro Cys His Pro Glu Cys Gln Pro Gln Asn Gly Ser Val Thr Cys Phe 565 570 575			1905
gga ccg gag gct gac cag tgt gtg gcc tgt gcc cac tat aag gac cct Gly Pro Glu Ala Asp Gln Cys Val Ala Cys Ala His Tyr Lys Asp Pro 580 585 590			1953
ccc ttc tgc gtg gcc cgc tgc ccc agc ggt gtg aaa cct gac ctc tcc Pro Phe Cys Val Ala Arg Cys Pro Ser Gly Val Lys Pro Asp Leu Ser 595 600 605			2001
tac atg ccc atc tgg aag ttt cca gat gag gag ggc gca tgc cag cct Tyr Met Pro Ile Trp Lys Phe Pro Asp Glu Glu Gly Ala Cys Gln Pro 610 615 620 625			2049
tgc ccc atc aac tgc acc cac tcc tgt gtg gac ctg gat gac aag ggc Cys Pro Ile Asn Cys Thr His Ser Cys Val Asp Leu Asp Asp Lys Gly 630 635 640			2097
tgc ccc gcc gag cag aga gcc agc cct ctg acg tcc atc atc tct gcg Cys Pro Ala Glu Gln Arg Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ile Ile Ser Ala 645 650 655			2145
gtg gtt ggc att ctg ctg gtc gtg gtc ttg ggg gtg gtc ttt ggg atc Val Val Gly Ile Leu Leu Val Val Val Leu Gly Val Val Phe Gly Ile 660 665 670			2193
ctc atc aag cga cgg cag cag aag atc cgg aag tac acg atg cgg aga Leu Ile Lys Arg Arg Gln Gln Lys Ile Arg Lys Tyr Thr Met Arg Arg 675 680 685			2241
ctg ctg cag gaa acg gag ctg gtg gag ccg ctg aca cct agc gga gcg Leu Leu Gln Glu Thr Glu Leu Val Glu Pro Leu Thr Pro Ser Gly Ala 690 695 700 705			2289
atg ccc aac cag gcg cag atg cgg atc ctg aaa gag acg gag ctg agg Met Pro Asn Gln Ala Gln Met Arg Ile Leu Lys Glu Thr Glu Leu Arg 710 715 720			2337
aag gtg aag gtg ctt gga tct ggc gct ttt ggc aca gtc tac aag ggc Lys Val Lys Val Leu Gly Ser Gly Ala Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly 725 730 735			2385
atc tgg atc cct gat ggg gag aat gtg aaa att cca gtg gcc atc aaa Ile Trp Ile Pro Asp Gly Glu Asn Val Lys Ile Pro Val Ala Ile Lys 740 745 750			2433
gtg ttg agg gaa aac aca tcc ccc aaa gcc aac aaa gaa atc tta gac Val Leu Arg Glu Asn Thr Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp 755 760 765			2481
gaa gca tac gtg atg gct ggt gtg ggc tcc cca tat gtc tcc cgc ctt Glu Ala Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu 770 775 780 785			2529
ctg ggc atc tgc ctg aca tcc acg gtg cag ctg gtg aca cag ctt atg Leu Gly Ile Cys Leu Thr Ser Thr Val Gln Leu Val Thr Gln Leu Met 790 795 800			2577

ES 2 709 481 T3

ccc tat ggc tgc ctc tta gac cat gtc cgg gaa aac cgc gga cgc ctg Pro Tyr Gly Cys Leu Leu Asp His Val Arg Glu Asn Arg Gly Arg Leu 805 810 815	2625
ggc tcc cag gac ctg ctg aac tgg tgt atg cag att gcc aag ggg atg Gly Ser Gln Asp Leu Leu Asn Trp Cys Met Gln Ile Ala Lys Gly Met 820 825 830	2673
agc tac ctg gag gat gtg cgg ctc gta cac agg gac ttg gcc gct cgg Ser Tyr Leu Glu Asp Val Arg Leu Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg 835 840 845	2721
aac gtg ctg gtc aag agt ccc aac cat gtc aaa att aca gac ttc ggg Asn Val Leu Val Lys Ser Pro Asn His Val Lys Ile Thr Asp Phe Gly 850 855 860 865	2769
ctg gct cgg ctg ctg gac att gac gag aca gag tac cat gca gat ggg Leu Ala Arg Leu Leu Asp Ile Asp Glu Thr Glu Tyr His Ala Asp Gly 870 875 880	2817
ggc aag gtg ccc atc aag tgg atg gcg ctg gag tcc att ctc cgc cgg Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg Arg 885 890 895	2865
cgg ttc acc cac cag agt gat gtg tgg agt tat ggt gtg act gtg tgg Arg Phe Thr His Gln Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp 900 905 910	2913
gag ctg atg act ttt ggg gcc aaa cct tac gat ggg atc cca gcc cgg Glu Leu Met Thr Phe Gly Ala Lys Pro Tyr Asp Gly Ile Pro Ala Arg 915 920 925	2961
gag atc cct gac ctg ctg gaa aag ggg gag cgg ctg ccc cag ccc ccc Glu Ile Pro Asp Leu Leu Glu Lys Gly Glu Arg Leu Pro Gln Pro Pro 930 935 940 945	3009
atc tgc acc att gat gtc tac atg atc atg gtc aaa tgt tgg atg att Ile Cys Thr Ile Asp Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp Met Ile 950 955 960	3057
gac tct gaa tgt cgg cca aga ttc cgg gag ttg gtg tct gaa ttc tcc Asp Ser Glu Cys Arg Pro Arg Phe Arg Glu Leu Val Ser Glu Phe Ser 965 970 975	3105
cgc atg gcc agg gac ccc cag cgc ttt gtg gtc atc cag aat gag gac Arg Met Ala Arg Asp Pro Gln Arg Phe Val Val Ile Gln Asn Glu Asp 980 985 990	3153
ttg ggc cca gcc agt ccc ttg gac agc acc ttc tac cgc tca ctg ctg Leu Gly Pro Ala Ser Pro Leu Asp Ser Thr Phe Tyr Arg Ser Leu Leu 995 1000 1005	3201
gag gac gat gac atg ggg gac ctg gtg gat gct gag gag tat ctg Glu Asp Asp Asp Met Gly Asp Leu Val Asp Ala Glu Glu Tyr Leu 1010 1015 1020	3246
gta ccc cag cag ggc ttc ttc tgt cca gac cct gcc ccg ggc gct Val Pro Gln Gln Gly Phe Phe Cys Pro Asp Pro Ala Pro Gly Ala 1025 1030 1035	3291

ES 2 709 481 T3

ggg Gly 1040	ggc Gly	atg Met	gtc Val	cac His	cac His	agg Arg	cac His	cgc Arg	agc Ser	tca Ser	tct Ser	acc Thr	agg Arg	agt Ser	3336
ggc Gly 1055	ggt Gly	ggg Gly	gac Asp	ctg Leu	aca Thr	cta Leu	ggg Gly	ctg Leu	gag Glu	ccc Pro	tct Ser	gaa Glu	gag Glu	gag Glu	3381
gcc Ala 1070	ccc Pro	agg Arg	tct Ser	cca Pro	ctg Leu	gca Ala	ccc Pro	tcc Ser	gaa Glu	ggg Gly	gct Ala	ggc Gly	tcc Ser	gat Asp	3426
gta Val 1085	ttt Phe	gat Asp	ggt Gly	gac Asp	ctg Leu	gga Gly	atg Met	ggg Gly	gca Ala	gcc Ala	aag Lys	ggg Gly	ctg Leu	caa Gln	3471
agc Ser 1100	ctc Leu	ccc Pro	aca Thr	cat His	gac Asp	ccc Pro	agc Ser	cct Pro	cta Leu	cag Gln	cgg Arg	tac Tyr	agt Ser	gag Glu	3516
gac Asp 1115	ccc Pro	aca Thr	gta Val	ccc Pro	ctg Leu	ccc Pro	tct Ser	gag Glu	act Thr	gat Asp	ggc Gly	tac Tyr	gtt Val	gcc Ala	3561
ccc Pro 1130	ctg Leu	acc Thr	tgc Cys	agc Ser	ccc Pro	cag Gln	cct Pro	gaa Glu	tat Tyr	gtg Val	aac Asn	cag Gln	cca Pro	gat Asp	3606
gtt Val 1145	cgg Arg	ccc Pro	cag Gln	ccc Pro	cct Pro	tcg Ser	ccc Pro	cga Arg	gag Glu	ggc Gly	cct Pro	ctg Leu	cct Pro	gct Ala	3651
gcc Ala 1160	cga Arg	cct Pro	gct Ala	ggt Gly	gcc Ala	act Thr	ctg Leu	gaa Glu	agg Arg	ccc Pro	aag Lys	act Thr	ctc Leu	tcc Ser	3696
cca Pro 1175	ggg Gly	aag Lys	aat Asn	ggg Gly	gtc Val	gtc Val	aaa Lys	gac Asp	gtt Val	ttt Phe	gcc Ala	ttt Phe	ggg Gly	ggt Gly	3741
gcc Ala 1190	gtg Val	gag Glu	aac Asn	ccc Pro	gag Glu	tac Tyr	ttg Leu	aca Thr	ccc Pro	cag Gln	gga Gly	gga Gly	gct Ala	gcc Ala	3786
cct Pro 1205	cag Gln	ccc Pro	cac His	cct Pro	cct Pro	cct Pro	gcc Ala	ttc Phe	agc Ser	cca Pro	gcc Ala	ttc Phe	gac Asp	aac Asn	3831
ctc Leu 1220	tat Tyr	tac Tyr	tgg Trp	gac Asp	caq Gln	gac Asp	cca Pro	cca Pro	gag Glu	cgg Arg	ggg Gly	gct Ala	cca Pro	ccc Pro	3876
agc Ser 1235	acc Thr	ttc Phe	aaa Lys	ggg Gly	aca Thr	cct Pro	acg Thr	gca Ala	gag Glu	aac Asn	cca Pro	gag Glu	tac Tyr	ctg Leu	3921
ggt Gly 1250	ctg Leu	gac Asp	gtg Val	cca Pro	gtg Val	tga Val	accagaaggc	caagtccgca	gaagccctga						3972
tgtgtcctca	gggagcaggg	aaggcctgac	ttctgctggc	atcaagaggt	gggagggccc										4032

ES 2 709 481 T3

tccgaccact tccaggggaa cctgccatgc caggaacctg tcctaaggaa ccttccttcc 4092
 tgcttgagtt cccagatggc tggaaggggt ccagcctcgt tggaagagga acagcactgg 4152
 ggagtctttg tggattctga ggccctgccc aatgagactc taggggccag tggatgccac 4212
 agcccagctt ggccctttcc ttccagatcc tgggtactga aagccttagg gaagctggcc 4272
 tgagagggga agcggcccta agggagtgtc taagaacaaa agcgacccat tcagagactg 4332
 tccctgaaac ctagtactgc ccccatgag gaaggaacag caatggtgtc agtatccagg 4392
 ctttgtagag agtgcttttc tgtttagttt ttactttttt tgttttgttt ttttaaagat 4452
 gaaataaaga cccaggggga g 4473

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

<400> 24
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95
 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

385						390										395						400
Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro							
				405					410					415								
Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg							
			420					425					430									
Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu							
		435					440						445									
Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly							
	450					455					460											
Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val							
465					470					475					480							
Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr							
				485					490					495								
Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His							
			500					505					510									
Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys							
		515					520					525										
Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys							
	530					535					540											
Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys							
545					550					555					560							
Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys							
				565					570					575								
Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp							
			580					585					590									
Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu							
		595					600					605										
Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln							
	610					615					620											
Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys							
625					630					635					640							

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

Gly Gly Lys Val Pro Ile Lys Trp Met Ala Leu Glu Ser Ile Leu Arg
 885 890 895

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 709 481 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Gly Leu Asp Val Pro Val
1250 1255

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

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

<400> 25
atg aca gcc atc atc aaa gag atc gtt agc aga aac aaa agg aga tat 48
Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1 5 10 15
caa gag gat gga ttc gac tta gac ttg acc tat att tat cca aac att 96
Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
20 25 30
att gct atg gga ttt cct gca gaa aga ctt gaa ggc gta tac agg aac 144
Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn

ES 2 709 481 T3

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

ES 2 709 481 T3

```

aaa gta gaa aat gga agt cta tgt gat caa gaa atc gat agc att tgc      912
Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
290                               295                               300

agt ata gag cgt gca gat aat gac aag gaa tat cta gta ctt act tta      960
Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu
305                               310                               315                               320

aca aaa aat gat ctt gac aaa gca aat aaa gac aaa gcc aac cga tac      1008
Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr
325                               330                               335

ttt tct cca aat ttt aag gtg aag ctg tac ttc aca aaa aca gta gag      1056
Phe Ser Pro Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu
340                               345                               350

gag ccg tca aat cca gag gct agc agt tca act tct gta aca cca gat      1104
Glu Pro Ser Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp
355                               360                               365

gtt agt gac aat gaa cct gat cat tat aga tat tct gac acc act gac      1152
Val Ser Asp Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp
370                               375                               380

tct gat cca gag aat gaa cct ttt gat gaa gat cag cat aca caa att      1200
Ser Asp Pro Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile
385                               390                               395                               400

aca aaa gtc tga      1212
Thr Lys Val

```

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

5

```

<400> 26
Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
1                               5                               10                               15

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

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

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

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

```

ES 2 709 481 T3

Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro
 85 90 95
 Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu
 100 105 110
 Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
 115 120 125
 Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
 130 135 140
 Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
 145 150 155 160
 Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
 180 185 190
 Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
 195 200 205
 Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
 210 215 220
 Tyr Ser Ser Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr
 225 230 235 240
 Phe Glu Phe Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu
 245 250 255
 Phe Phe His Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His
 260 265 270
 Phe Trp Val Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu
 275 280 285
 Lys Val Glu Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys
 290 295 300
 Ser Ile Glu Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu
 305 310 315 320
 Thr Lys Asn Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr

ES 2 709 481 T3

325

330

335

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

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

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

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

Thr Lys Val

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

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

<400> 27

ES 2 709 481 T3

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

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

<400> 28

ES 2 709 481 T3

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

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

<220>

ES 2 709 481 T3

<221> CDS

<222> (1)..(894)

<400> 29

atg	aca	aca	ccc	aga	aat	tca	gta	aat	ggg	act	ttc	ccg	gca	gag	cca	48
Met	Thr	Thr	Pro	Arg	Asn	Ser	Val	Asn	Gly	Thr	Phe	Pro	Ala	Glu	Pro	
1				5					10					15		
atg	aaa	ggc	cct	att	gct	atg	caa	tct	ggg	cca	aaa	cca	ctc	ttc	agg	96
Met	Lys	Gly	Pro	Ile	Ala	Met	Gln	Ser	Gly	Pro	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	
			20					25					30			
agg	atg	tct	tca	ctg	gtg	ggc	ccc	acg	caa	agc	ttc	ttc	atg	agg	gaa	144
Arg	Met	Ser	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Phe	Phe	Met	Arg	Glu	
			35				40					45				
tct	aag	act	ttg	ggg	gct	gtc	cag	att	atg	aat	ggg	ctc	ttc	cac	att	192
Ser	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Phe	His	Ile	
	50					55					60					
gcc	ctg	ggg	ggg	ctt	ctg	atg	atc	cca	gca	ggg	atc	tat	gca	ccc	atc	240
Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ile	
65						70				75				80		
tgt	gtg	act	gtg	tgg	tac	cct	ctc	tgg	gga	ggc	att	atg	tat	att	att	288
Cys	Val	Thr	Val	Trp	Tyr	Pro	Leu	Trp	Gly	Gly	Ile	Met	Tyr	Ile	Ile	
				85					90					95		
tcc	gga	tca	ctc	ttg	gca	gca	acg	gag	aaa	aac	tct	agg	aag	tgt	ttg	336
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu	

ES 2 709 481 T3

	100	105	110	
	gtc aaa gga aaa atg ata atg aat tca ttg agc ctc ttt gct gcc att			384
	Val Lys Gly Lys Met Ile Met Asn Ser Leu Ser Leu Phe Ala Ala Ile			
	115	120	125	
	tct gga atg att ctt tca atc atg gac ata ctt aat att aaa att tcc			432
	Ser Gly Met Ile Leu Ser Ile Met Asp Ile Leu Asn Ile Lys Ile Ser			
	130	135	140	
	cat ttt tta aaa atg gag agt ctg aat ttt att aga gct cac aca cca			480
	His Phe Leu Lys Met Glu Ser Leu Asn Phe Ile Arg Ala His Thr Pro			
	145	150	155	160
	tat att aac ata tac aac tgt gaa cca gct aat ccc tct gag aaa aac			528
	Tyr Ile Asn Ile Tyr Asn Cys Glu Pro Ala Asn Pro Ser Glu Lys Asn			
	165	170	175	
	tcc cca tct acc caa tac tgt tac agc ata caa tct ctg ttc ttg ggc			576
	Ser Pro Ser Thr Gln Tyr Cys Tyr Ser Ile Gln Ser Leu Phe Leu Gly			
	180	185	190	
	att ttg tca gtg atg ctg atc ttt gcc ttc ttc cag gaa ctt gta ata			624
	Ile Leu Ser Val Met Leu Ile Phe Ala Phe Phe Gln Glu Leu Val Ile			
	195	200	205	
	gct ggc atc gtt gag aat gaa tgg aaa aga acg tgc tcc aga ccc aaa			672
	Ala Gly Ile Val Glu Asn Glu Trp Lys Arg Thr Cys Ser Arg Pro Lys			
	210	215	220	
	tct aac ata gtt ctc ctg tca gca gaa gaa aaa aaa gaa cag act att			720
	Ser Asn Ile Val Leu Leu Ser Ala Glu Glu Lys Lys Glu Gln Thr Ile			
	225	230	235	240
	gaa ata aaa gaa gaa gtg gtt ggg cta act gaa aca tct tcc caa cca			768
	Glu Ile Lys Glu Glu Val Val Gly Leu Thr Glu Thr Ser Ser Gln Pro			
	245	250	255	
	aag aat gaa gaa gac att gaa att att cca atc caa gaa gag gaa gaa			816
	Lys Asn Glu Glu Asp Ile Glu Ile Ile Pro Ile Gln Glu Glu Glu			
	260	265	270	
	gaa gaa aca gag acg aac ttt cca gaa cct ccc caa gat cag gaa tcc			864
	Glu Glu Thr Glu Thr Asn Phe Pro Glu Pro Pro Gln Asp Gln Glu Ser			
	275	280	285	
	tca cca ata gaa aat gac agc tct cct taa			894
	Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro			
	290	295		

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

<400> 30

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

ES 2 709 481 T3

Met	Lys	Gly	Pro	Ile	Ala	Met	Gln	Ser	Gly	Pro	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg			
			20					25					30					
Arg	Met	Ser	Ser	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Gln	Ser	Phe	Phe	Met	Arg	Glu			
		35					40					45						
Ser	Lys	Thr	Leu	Gly	Ala	Val	Gln	Ile	Met	Asn	Gly	Leu	Phe	His	Ile			
	50					55					60							
Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ile	Pro	Ala	Gly	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ile			
65					70					75					80			
Cys	Val	Thr	Val	Trp	Tyr	Pro	Leu	Trp	Gly	Gly	Ile	Met	Tyr	Ile	Ile			
				85					90					95				
Ser	Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Ala	Thr	Glu	Lys	Asn	Ser	Arg	Lys	Cys	Leu			
			100					105					110					
Val	Lys	Gly	Lys	Met	Ile	Met	Asn	Ser	Leu	Ser	Leu	Phe	Ala	Ala	Ile			
		115					120					125						
Ser	Gly	Met	Ile	Leu	Ser	Ile	Met	Asp	Ile	Leu	Asn	Ile	Lys	Ile	Ser			
	130					135					140							
His	Phe	Leu	Lys	Met	Glu	Ser	Leu	Asn	Phe	Ile	Arg	Ala	His	Thr	Pro			
145					150					155					160			
Tyr	Ile	Asn	Ile	Tyr	Asn	Cys	Glu	Pro	Ala	Asn	Pro	Ser	Glu	Lys	Asn			
				165					170					175				
Ser	Pro	Ser	Thr	Gln	Tyr	Cys	Tyr	Ser	Ile	Gln	Ser	Leu	Phe	Leu	Gly			
			180					185					190					
Ile	Leu	Ser	Val	Met	Leu	Ile	Phe	Ala	Phe	Phe	Gln	Glu	Leu	Val	Ile			
		195					200					205						
Ala	Gly	Ile	Val	Glu	Asn	Glu	Trp	Lys	Arg	Thr	Cys	Ser	Arg	Pro	Lys			
	210					215					220							
Ser	Asn	Ile	Val	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Glu	Lys	Lys	Glu	Gln	Thr	Ile			
225					230					235					240			
Glu	Ile	Lys	Glu	Glu	Val	Val	Gly	Leu	Thr	Glu	Thr	Ser	Ser	Gln	Pro			
				245					250					255				

ES 2 709 481 T3

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

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

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
 290 295

REIVINDICACIONES

1. Un retrovirus recombinante competente en replicación que comprende:

- 5 una proteína GAG retroviral;
una proteína POL retroviral;
una envoltura retroviral; y
un polinucleótido retroviral que comprende una secuencia como se expone en las SEQ ID NO: 19 o 22

10 2. Un retrovirus como se define en la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de un sujeto que tiene un trastorno proliferativo en combinación con 5-fluorocitosina, en condiciones de manera que se exprese el polinucleótido retroviral.

15 3. El retrovirus para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el polinucleótido retroviral está integrado en una célula del sujeto,
y/o donde un vector retroviral comprende el polinucleótido,
y/o donde el trastorno proliferativo celular es un glioblastoma multiforme,
y/o donde el trastorno proliferativo celular se selecciona de entre cáncer de pulmón, cáncer de colon-recto, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer uterino, cáncer cerebral, cáncer de cabeza y cuello,
20 cáncer pancreático, melanoma, cáncer de estómago o cáncer ovárico.

4. Un retrovirus como se define en la reivindicación 1 para su uso en un sujeto que tiene un trastorno proliferativo celular en combinación con un agente anticáncer o un agente quimioterápico, en condiciones de manera que el retrovirus infecte las células con el trastorno.

25 5. El retrovirus para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el agente anticáncer se selecciona de entre bevacizumab, pegaptanib, ranibizumab, sorafenib, sunitinib, AE-941, VEGF Trap, pazopanib, vandetanib, vatalanib, cediranib, fenretinida, escualamina, INGN-241, tetratiomolibdato oral, tetratiomolibdato, Panzem NCD, 2-metoxiestradiol, AEE-788, AG-013958, bevasiranib sódico, AMG-706, axitinib, BIBF-1120, CDP-791, CP-547632, PI-88, SU-14813, SU-6668, XL-647, XL-999, IMC-1121B, ABT-869, BAY-57-9352, BAY-73-4506, BMS-582664, CEP-7055, CHIR-265, CT-322, CX-3542, E-7080, ENMD-1198, OSI-930, PTC-299, Sirna-027, TKI-258, Veglin, XL-184, o ZK-304709.

ES 2 709 481 T3

SEQ ID NO:2: 1 MVTGGMASKWDQKGMEDIAEYEEAALGYKEGGVPIGGCLINNKDGSVLGRGHNMRFQKGSAT
 SEQ ID NO:4: 1 MVTGGMASKWDQKGMEDIAEYEEAALGYKEGGVPIGGCLINNKDGSVLGRGHNMRFQKGSAT

SEQ ID NO:2: 61 LHGEISTLENCGRLECKVYKDTTLYTTLSPCDMCTGAIIMYGIPRCVIGENVNFKSKGEK
 SEQ ID NO:4: 61 LHGEISTLENCGRLECKVYKDTTLYTTLSPCDMCTGAIIMYGIPRCVIGENVNFKSKGEK

SEQ ID NO:2: 121 YLQTRGHEVVVVDDERCKKIMKQFIDERPQDWFEDIGE-
 SEQ ID NO:4: 121 YLQTRGHEVVVVDDERCKKIMKQFIDERPQDWFEDIGE-

SEQ ID NO: 31
 Longitud: 596 nt
 Tipo: ADN pri-miR-128-1
 Organismo: humano
 ACGCGTactggagtcgaatgaaagcaaCTATTTCAAAGATCAGATTACTTACCAGTTTCACTAATAAAGATTTAT
 TACTTTAAACCTTTATCATAAAATGTATGCTTTGAATACTGTGAAGTACACTGCATATAAGGAGTGTGGTATAGT
 ATAAAGAACTTTCTGCAGGTAGTAATTATAGTGAAGATTTAGGTTTACAAAGCCCTAGCTGTTTTCTGTGTAG
 CTTTTATTATTCTTATGACTCTTGACAAGTTTGTAGCTTCACCATATACATTTAATATTTTGAATAATTGGCCT
 TGTTCCTGAGCTGTTGGATTGCGGGCCGTAGCACTGTCTGAGAGGTTTACATTTCTCACAGTGAACCGGTCTCTT
 TTTGAGCTGCTTCCTGGCTTCTTTTTACTCAGGTTTCCACTGCTTTTTTGTCTTTTTTAAATGCTGTATGAAGGTG
 TTAACATTTGTTTATATTTTCATTAATTGTAATACCTTTAAATCATGCATCATACTCAGAAATAGGGATTAGAA
 TTTAAGTGACATCTTTGGCCTAATATAATTTACCTGTTAAAAatttgtgaaagctattgcttaGCGGCCGC

SEQ ID No.32
 Longitud: 511 nt
 Tipo: ADN pri-miR-128-2
 Organismo: humano
 ACGCGTCCATGTCCGTACCTTTCTAGTTTCATACCTTCTTTTAATTTTTTTTTTCTTTTCAATTTGAAGAGAGTGC
 TTCCTCTGTTCTTAAGGCTAGGGAAACCAATTAGGTTGTTTCAATATCGTGCTAAAAGATACTGCCTTTAGAAGA
 AGGCTATTGACAATCCAGCGTGTCTCGGTGGAACCTGACTCCATGGTTCACCTTCATGATGGCCACATGCCTCC
 TGCCCAGAGCCCGGACGCACTGTGCAGTGGGAAGGGGGCCGATACACTGTACGAGAGTGAGTAGCAGGTCTCA
 CAGTGAACCGGTCTCTTTCCCTACTGTGTACACTCCTAATGGAATGCCGTTATCCAAAGAGCAGCACGAACCCG
 ACAGGGCTGAGTGGCTTGTGCTAGGGAGAGGTTTGTGTCAATTCCTGCTGACCAAACTGCAGGAAAAACTGCTAAT
 TGTCTGCTGAAGACTGCCTGACGGGGAGACTCTGCCTTCTGTAAGTAGGTCAGCGGCCGC

SEQ ID NO:33
 Longitud: 203 nt
 Tipo: ADN pri-miR128-1 enlazado al promotor H1 humano
 Organismo: humano
 acgcgtAATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGGG
 AATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCGGATgagctgttgattcggggccgtagcactgtctgagaggttta
 catttctcacagtgaaccggtctctctttttcagctgcttcTTTTTgcgccgc

SEQ ID NO: 34
 Longitud: 205 nt
 Tipo: ADN pri-miR128-1 enlazado al promotor H1 humano
 Organismo: humano
 gcggccgcAATTCATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTGG
 GGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACTCGGATgagctgttgattcggggccgtagcactgtctgagaggtt
 tacatttctcacagtgaaccggtctctctttttcagctgcttcTTTTTgcggccgc

Secuencia ID No. 35
 Longitud: 205 pb
 Tipo: secuencia de ADN diana del miR-142-3p
 Organismo: N/D
 gcggccgcGTCGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACAgcgccgc

FIGURA 1A

Secuencia ID No. 36

Longitud: 128 pb

Tipo: secuencia de ADN diana de miR-142-3pT4X repetido cuatro veces

Organismo: N/D

gcggccgcGTCGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACAaccggtTCCAT
AAAGTAGGAAACACTACATCACTCCATAAAGTAGGAAACACTACAgcggccgc

Secuencia ID No. 37

Longitud: 1131 pb

Tipo: ADN HSV-TK

Organismo: virus del herpes simple-1

ATGGCTTCGTACCCCGGCCATCAGCACGCGTCTGCGTTCGACCAGGCTGCGCGTTCTCGCGGCCATAGCAACCGA
CGTACGGCGTTGCGCCCTCGCCGGCAGCAAGAAGCCACGGAAGTCCGCCCCGAGCAGAAAATGCCACGCTACTG
CGGGTTTATATAGACGGTCCCCACGGGATGGGGAAAACCACCACGCAACTGCTGGTGGCCCTGGGTTTCGCGC
GACGATATCGTCTACGTACCCGAGCCGATGACTTACTGGCAGGTGCTGGGGGCTTCCGAGACAATCGCGAACATC
TACACCACACAACACCGCCTCGACCAGGGTGAGATATCGGCCGGGGACGCGCGGTGGTAATGACAAGCGCCAG
ATAACAATGGGCATGCCTTATGCCGTGACCGACGCGTTCCTGGCTCCTCATATCGGGGGGAGGCTGGGAGCTCA
CATGCCCGCCCCCGGCCCTCACCTCATCTTCGACCGCCATCCCATCGCCGCCCTCCTGTGTATCCCGGCCGCG
CGATACTTATGGGCAGCATGACCCCCAGGCCGTGCTGGCGTTGCTGGCCCTCATCCCGCCGACCTTGCCCGGC
ACAAACATCGTGTTGGGGGGCCCTTCCGGAGGACAGACATCGACCGCTGGCCAAACGCCAGCGCCCCGGCGAG
CGGCTTGACCTGGCTATGCTGGCCGCGATTGCGCGCGTTTACGAGCTGCTTGCCAATACGGTGCGGTATCTGCAG
GGCGGCGGGTCTGTTGGCGGGAGGATTGGGGACAGCTTTCGGGACGCGCGTGGCCGCCCGAGGTGCCGAGCCCCAG
AGCAACGCGGGGCCACGACCCCATATCGGGGACAGTTATTTACCTGTTCGGGCCCCGAGTTGCTGGCCCCC
AACGCGCAGCTGTATAACGTGTTTGCCTGGGCCTTGACGTCTTGCCAAACGCCTCCGTCCCATGCACGTCTTT
ATCCTGGATTACGACCAATCGCCCGCGGTACCGGGACGCGCTGCTGCAACTTACCTCCGGGATGGTCCAGACC
CACGTCACCACCCCGGCTCCATACCGACGATCTGCGACCTGGCGCGCACGTTTGCCCGGAGATGGGGGAGGCT
AACTAA

Secuencia ID No. 38

Longitud: 501 pb

Tipo: ADN de IFN gamma

Organismo: humano

ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTTTCAGCTCTGCATCGTTTGGGTCTCTTGGCTGTTACTGCCAGGAC
CATATGTAAAAGAAGCAGAAAACCTTAAGAAATATTTTAAATGCAGGTCATTGAGATGTAGCGGATAATGGAACCTC
TTTTCTTAGGCATTTTGAAGAATTGGAAAGAGGAGAGTGACAGAAAAATAATGCAGAGCCAAATGTCTCCTTTT
ACTTCAAACTTTTTAAAAACTTTAAAGATGACCAGAGCATCCAAAAGAGTGTTGGAGACCATCAAGGAAGACATGA
ATGTAAGTTTTTCAATAGCAACAAAAGAAACGAGATGACTTCGAAAAGCTGACTAATTATTCGGTAAGTGAATT
GAATGTCCAACGCAAAGCAATACATGAACTCATCAAGTGATGGCTGAACTGTGCGCAGCAGCTAAACAGGGAA
GCGAAAAAGGAGTCAGATGCTGTTTCGAGGTGCAAGAGCATCCAGTAA

Secuencia ID No. 39

Longitud: 468 pb

Tipo: ADN de IFN gamma

Organismo: ratón

ATGAACGCTACACACTGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGCTGTTTCTGGCTGTTACTGCCACGGCACA
GTCATTGAAAGCCTAGAAAGTCTGAATAACTATTTTAACTCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAAAAGAGTCTCTTC
TTGGATATCTGGAGGAACCTGGCAAAAGGATGGTGACATGAAAATCCTGCAGAGCCAGATTATCTCTTTCTACCTC
AGACTCTTTGAAGTCTTGAAAGACAAATCAGGCCATCAGCAACAACATAAGCGTCATTGAATCACACCTGATTACT
ACCTTCTTCAGCAACAGCAAGGCGAAAAGGATGCATTCATGAGTATTGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAG
GTCCAGCGCCAAGCATTCAATGAGCTCATCCGAGTGGTCCACCAGCTGTTGCCGGAATCCAGCCTCAGGAAGCGG
AAAAGGAGTCGCTGCTGA

FIGURA 1B

Secuencia ID No. 40

ES 2 709 481 T3

Longitud: 462 pb
Tipo: ADN de IL-2
Organismo: humano

```
ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACAAACAGTGACCTACTTCAAGT
TCTACAAAGAAAACACAGCTACAACTGGAGCATTTACTGCTGGATTTACAGATGATTTTGAATGGAATTAATAAT
TACAAGAATCCCAAACCTCACCAGGATGCTCACATTTAAGTTTTACATGCCCAAGAAGGCCACAGAAGTAAACAT
CTTCAGTGTCTAGAAGAAGAACTCAAACCTCTGGAGGAAGTGCTAAATTTAGCTCAAAGCAAAAACCTTCACTTA
AGACCCAGGGACTTAATCAGCAATATCAACGTAATAGTTCTGGAACTAAAGGGATCTGAAACAACATTCATGTGT
GAATATGCTGATGAGACAGCAACCATTGTAGAATTTCTGAACAGATGGATTACCTTTTGTCAAAGCATCATCTCA
ACACTGACTTGA
```

FIGURA 1C

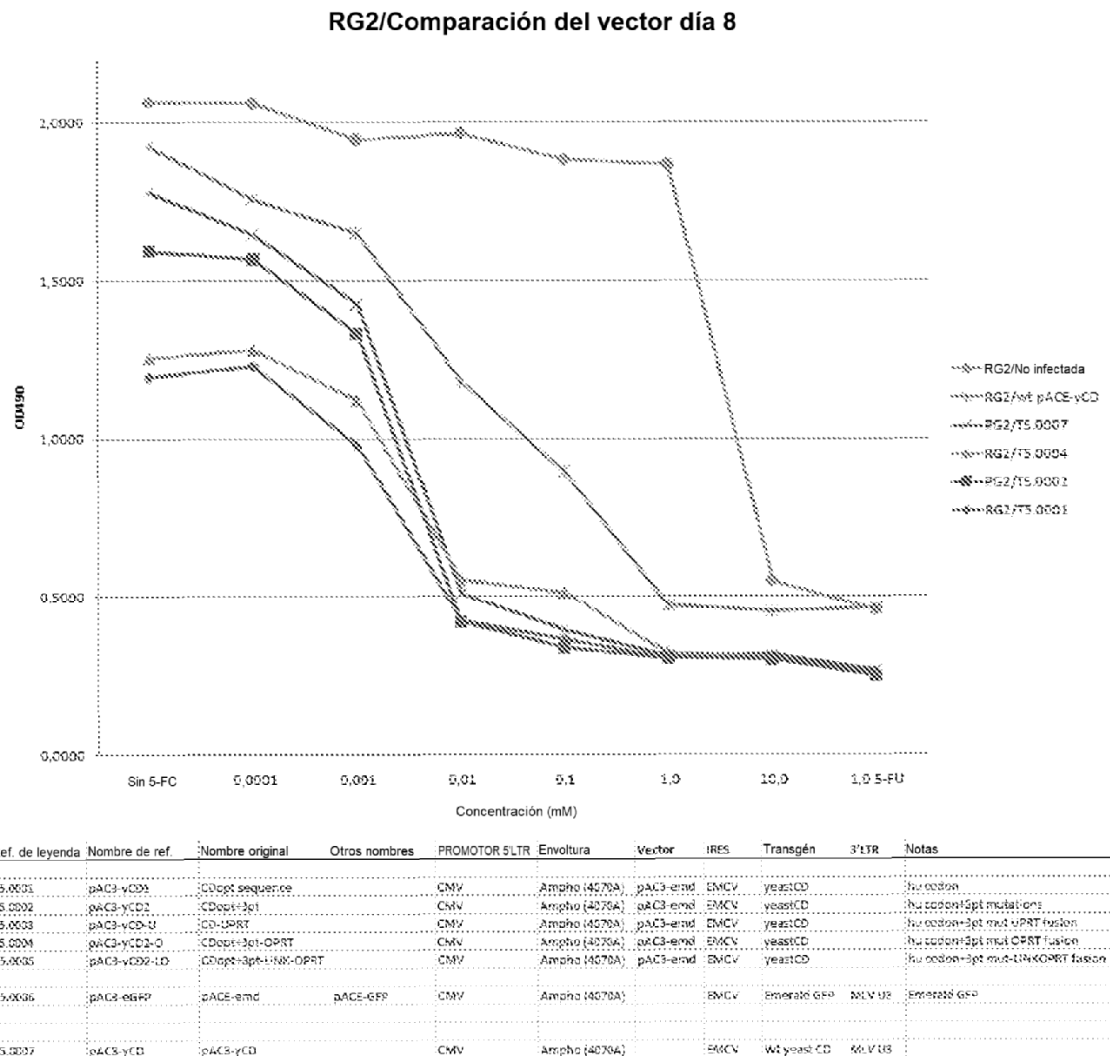


FIGURA 2

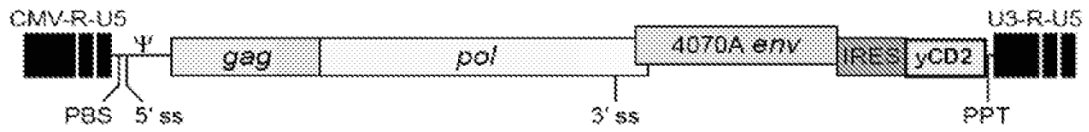


FIGURA 3A

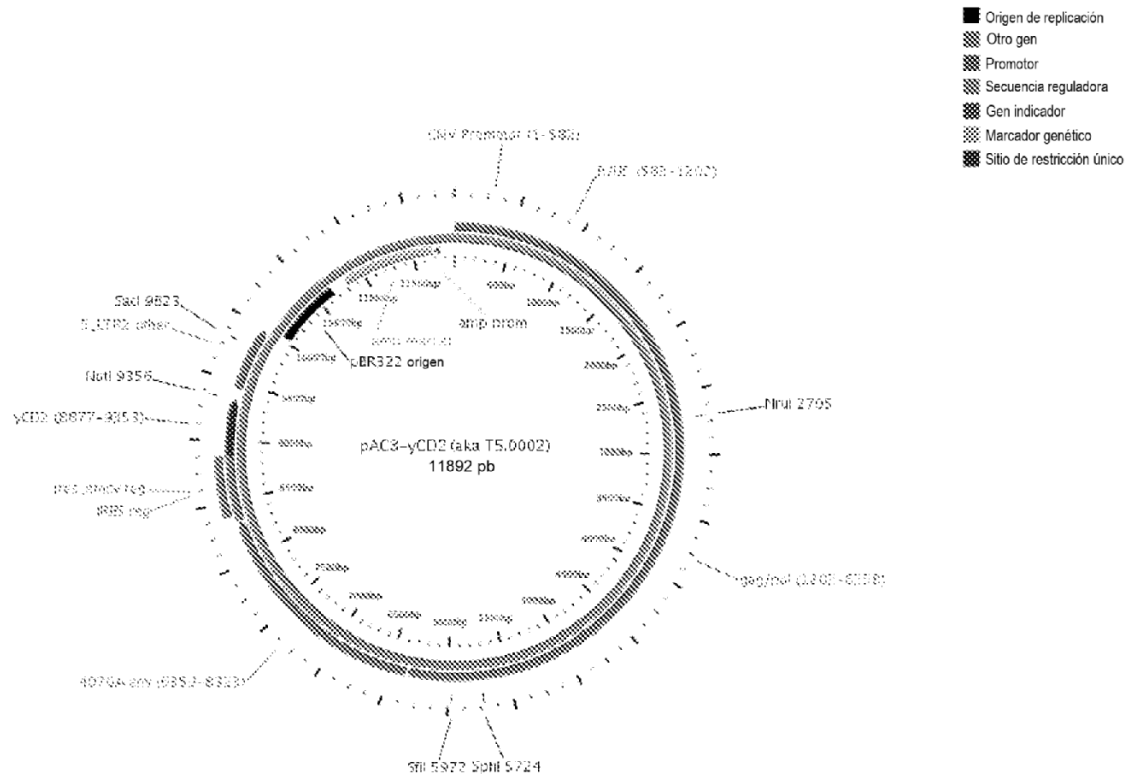


FIGURA 3B

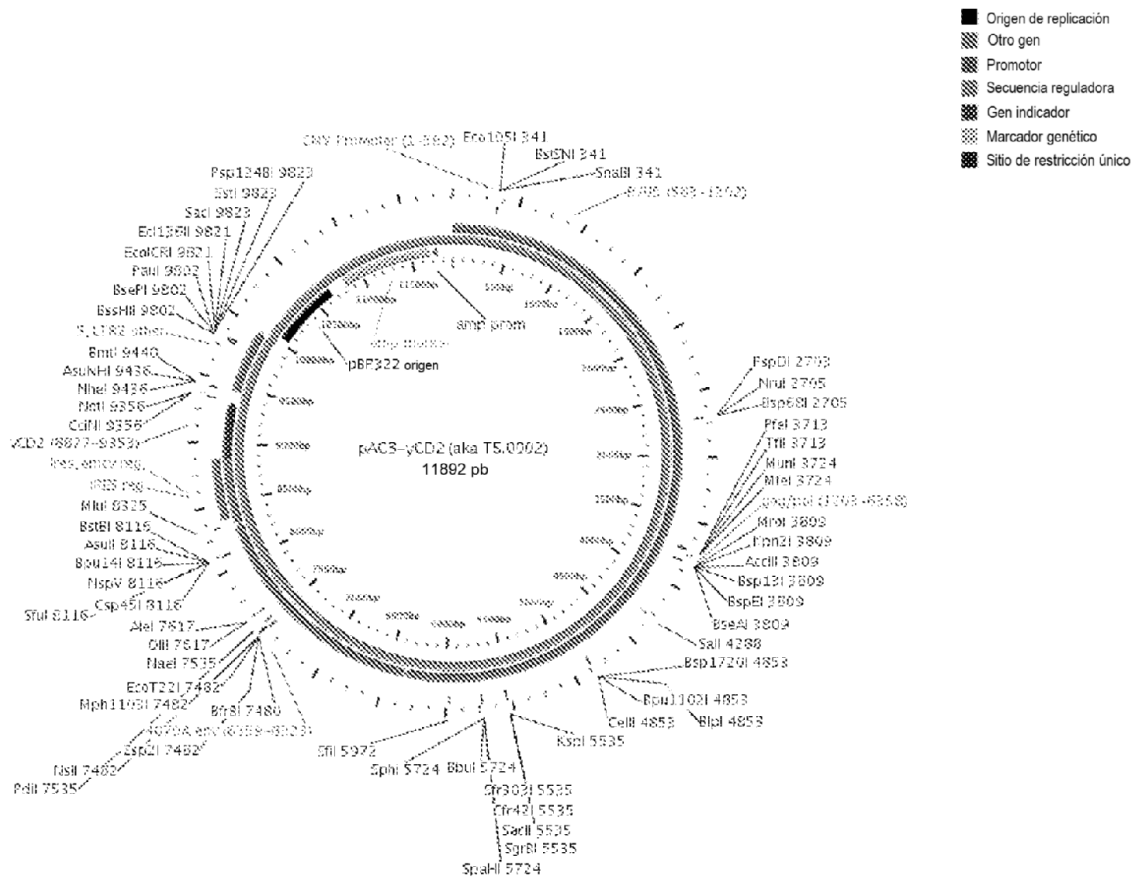


FIGURA 3C



FIGURA 3D-2

TCACCTAGATCCTTTTAAATTA AAAARTGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGACTAAACTTGGTCTGACAG  CCA
 ATGCTTAATCAGTGAAGGCACCTATCTCAGCGATCTGCTTATTTGGTTTCATCCATAGTTGCGCTGACTGCGCGCTGGTGTAGATA
 ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTTGGCCCGCAGTGGTGCATATGATACGGGCGAGAACCCGCTCAGCGGCTCCAGATTTTAT
 CAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAASTGGTCTGCAACTTTATCCGCGCTCCATCCAGTCTATTAAATG  *AsaI*
 TTGCGCGGAAGGTAGASTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTTGTGGCATTTCTGCAAGGCATCGTGGTGTCA
 CGCTCGTGGTTTGGTATGGCTTCATTCAAGCTCCGCTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCGCATGTTGTGCAAAA  *AmpR GRF*
 AAGCGGTTAGCTGCTTGGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAAGTAAGTTGGCCGCGAGTTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT
 GCATTAATTCCTTACGTCTATGCCATCCGTAAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTG  CAGCCAAAGTCATTCTGAGAAATAG 
 TGTATGCGCGACCGAGTTGCTGTTGGCCGCGCTCAACACGGGATAAATACCGCGCCATATACGAGAACTTTAAAASTGCTCA
 TCATTGGAARAAGCTTCTCGGGGGGAAAGCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTSHAATGAACCCACTCGTGC
 ACGCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCAACAGCGTTTCTGGGTGAGGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCGGCAAAAAAG
 GGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACT  ACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTCAGGGTTATTGTC
 TCAAGAGCGGATACATATTTGAATGTAATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCACCC
 TGAAGTCTAAGAAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACAGAGGCCCTTTCTGTTCTCAAGAAATTC
 AT

FIGURA 3D-3

ES 2 709 481 T3

```

Promotor CMV (1-582)>>>
|
1   TAGTTAATTAATAGTAATCAATTAACGGGGTCATTAGTTCAATAGCCCTATATGAGATTCCG 60
    ATCAATAATTTATCAATTAGTTAAATGCCCCAGTATCAGATATCTGGGTATATACCTCAAGGC

61   GGTACATAAAGTTACGGTAATATGGCCGGCTTGGCTGACGGGCCAACGACCCCGGGCCATT 120
    GCAATCTATTCAATGCCATTTCACGGGGGCAACCACTGGGGGCTTGCTGGGCGCCGCTAA

121  GAGGTCAATATGACGTATGTTCCATAGTAAACCCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTGA 180
    CTSCASTTATTACTGCAATACAAAGGTATCAATTCGGTTATCCCTGAAAGGTAACTGCAAT

181  ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAGGTGATCATATGCC 240
    TACCCACCTCATAAATGCCATTGACGGGTGATCCGTCAATGTAATTCATATGATATACGG

241  AAGTACGGCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATATGCGCCAGTA 300
    TCAATGGGGGGGATACCTGCAATTAATGACGGGGGACCGTAAATACGGGTCTAT

                                     Ec>106E
                                     |
                                     ScaRI
                                     |
                                     BstXNI
                                     |
301  CATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCCAGTCAACTACGTATTAATTCATCGCTATTAC 360
    GTACTGGATATACCTGAAAGCATGACCGCTCATGTAGATGCATAATCACTAGCGATATG

361  CATGCTATATGGCGTTTGGCCAGTACATCAATGGCGGTGGATAGCGGTTGACTCAGCGG 420
    GTACCACTACGCCAAAACCGTCAATGATATACCGGCACTTATCGCCAACTGAGTGGCC

421  ATTTGCAATGTCGCAACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTCTTTTGGGACCAAAATCAAG 480
    TAAAGGTTGAGAGGTGGGGTAACTGCACTTACCTCAAAACAAACCGTGGTTTATGTTGC

481  GGAATTTTCAAAATGTCATTAACAACTCCGGCCCATTTGACGCAATGGGGGGTGGGCTGT 540
    CCTGAAAGGTTTACAGCATTTGTTGAGGCGGGGTAATGCGTTTACCTCGCATTCGCGCA

                                     K region (555-650)>>>
                                     |
541  AGGTTGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGTTTAAAGTGAACCGGCGCCACTGCTCCGATTC 600
    TGGCACTCTCAAGATATATTCGCTCTGACCAAAATCACTTGGCTGGCGCTCAGGAGCTTAA

                                     U5 región (651-1202)>>>
                                     |
601  ACTGAGTGGCCCGGCTACCGCTGATCCAAATAAACCGCTTTTGGAGTTCATCCGACTTGT 660
    TGGCTCAGCGGGCCCTGGGGACATAGGTTATTTGGGAGGACCTCAAGCTAGGCTGAATCA

661  GGTCTGCTGTCTCTTGGTGGGAGGTCTCTCTGAGTGATGACTACCGTCAAGCGGSGGTC 720
    CCAGAGCGACAAAGGAACCTCCAGAGGAGACTCACTAACTGATGGGCAGTGGCCGCCAG

721  TTTCAATTTGGGGGCTGCTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCCAGGGACACCGACCCACCA 780
    AAAGTAAACCCCGAGCAGGCCCTAGCCCTCTGCGGACGGGTCCCTGGTGGCTGGGTGGT

    5' SS (788)
    |
781  CCGGAGGTTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGCTAGTGTCTATGAC 840
    GGCCTCCATTGACCGGTGCTGAAATAGACACAGACAGGCTAACAGATCACAGATACTG

841  TGATTTTATGCGCTGCTGGGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGATCTGGGGGACCCG 900

```

FIGURA 3D-4

ACTAAAATACGGGACGCGAGCCATGATCAATCGATTGATCGAGACATAGACCGCCTGGGC

901 TGGTGGAACTGACGAGTTGGAACACCCGCGCCCAACCTGGGAGACGTCCAGGGACTT 960
 ACCACCTTGACTGCTCAAGCCTTGTGGGCGGGCTTGGGACCTCTGCAGGGTCCCTGAA

961 CGGGGGCCGTTTTTGTGGCCCGACCTGAGTCUAAAAATCCCGATCGTTTTTGGACTCTTTG 1020
 GCCCCCGGCAAAAACACCGGGCTGGACTCAAGTTTTTAGGGCTAGCAAAACCTGAGAAAC

1021 GTGCACCCCCCTTAGAGGAGGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCTAAACAGT 1080
 CACGTGGGGGAATCTCCTCCCTATACACCAAGACCATCCTCTGCTCTTGGATTTTGTCA

1081 TCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTTGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCGCGCTCTTG 1140
 AGGGCGGAGGCAGACTTAAAAACGAAAGCCAAACCTGGCTTCGGCGCGCGCGCAGAAC

1141 TCTGCTGCAGCATGTTCTGTGTTGTCTCTGCTGAETGTGTTTCTGIATTTGTCTGAGA 1200
 AGACGACGCTGTAGCAAGACACAACAGAGACAGACTGACACAAAGACATAAACAGACTCT

gag(1203,2319)>>>

1201 ATATGGGCGCAGACTGTTTACCACTCCCTTAAGTTTGGACCTTAGGTCACTGGAAGATGTG 1260
 TATACCGCGTCTGACAACTGCTGAGGGAATTCAACTGGAATCCAATGACCTTTCTACAGC

1261 AGCGGATCGCTCACAACCACTCGGTAGATGTTAAAGAGAGAGCGTTGGGTTACCTTCTGCT 1320
 TCGCTTATGAGTGTGTTGACACCAATCTAAGATTCCTCTGCAACCCATGGAAGACGA

1321 CTGCAGAATGGCCAACTTTAACGTGGGATGGGCGCGAGACGGACCTTTAAGCGAGACC 1380
 GAGCTCTTACCGTTGGAAATTTGAGGCTAGCGGCGCTCTGCGTGGAAATTTGGCTCTGG

1381 TCATCAGCCAGGTTAAGATCAAGGCTCTTTTCACTGGGCGCGATGAGACCCAGACCGAG 1440
 AGTACTGGGTCCAAATCTAGTTCCAGAAAGTGGACCGGCGCTACTGCTGGGTCTGGTCC

1441 TCCCTTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGTGTTTGGACCCCGCTCCCTGCTCAAGCCCT 1500
 AGGGATGTAAGCTGAGACCTTGGAAACCGAAGACTGGGGGAGAGACCGAGTTGGGA

1501 TTGTACGCCCTTAGGCCCTCCCTCTCTTTCATCGGCCCCGTCTCTCCCTTGAAC 1560
 AACATGTGGATTCGAGGCGCGGAGGAGAGAGAGGTAGCGCGGGCAGAGAGGGGAACCTT

1561 CTCTCTGTTGACCCCGCTCTGATCCTGCTTTATCCAGCCCTCACTCTCTCTAGGCG 1620
 GAGGAGCAGCTGGGGCGGAGCTAGGAGGGAATAGGTCTGGGAGTGGGAGCAGATCCGC

1621 CCAACCTTAACCTCAAGTCTTTCTGACAGTGGGGGGCGCTCATCGACCTACTTACAG 1680
 GCTTTGATTTGGASTTCAGAAAGACTGTACCCCCCGGCGAGTAGCTGGATGAATGTC

1681 AAGACCCCCCGCTTATAGGAGCCAGAGACCGCCCTTTCGACAGGGAGCGAANTGGTG 1740
 TTCTGGGGGGCGGATATGCTTGGTTCTGGTGGGGAGGGTGTCCCTGCTTTTACAC

1741 GAGAGCGGACCCCTSCGGGAGGGGACCGGACCCCTCCCCATGGCATCTGCGCTACGTG 1800
 CTCTTCTTGGGACCGCTCTCCGTGCTTGGGGAGGCTTACCGTAGAGCGGATGCAC

1801 GGAGACGGGAGCCCCCTGTGGGCGACTCCACTACCTCCGAGGCATCCCCCTCGGCGCAG 1860
 CCTCTGCTCGGGGAGACCGGCTGAGGGGATGCAAGGCTCCGTAAAGGGGAGGGCGCTC

1861 GAGGAACGGACAGCTTCAACTAGGCGGTCTCTCTCTGACCTTTAGAACTGGAAAA 1920
 CTCTTTTCCCTGTGCAAGTTATGACCGGCAGAGGAGAGAGACTGGAATGTTGACCTTTT

1921 ATAAATACCCCTCTTTTTCTGAAGATCCAGGTAAACTGACAGCTCTGATCGAGTCTGTT 1980
 TATTATTGGGAAGAGAAAGACTTCTAGGTCAATTTGACTGTGAGACTAGCTCAGACAG

1981 TCATACCCATCAGCCCACTGGGACGACTGTGACAGCTGTTGGGGACTCTGCTGACCG 2040
 ATASTGGGTAGTGGGTGGACCTGCTGACACTGCTGACACACCTTGACACGACTGGC

FIGURA 3D-5

```

3121  ACTTTGAGGGATCAGGAGCCCAGGTTATGGGACCAATGGGSCAGCCCCTGCAAGTGTGA 3180
      TGAACCTCCCTAGTCCCTCGGGTCCATACCTGGTTACCCCGTCGGGGACGTTACAACT

3181  CCTTAAATATAGAAATGAGCATCGGCTACATGASACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240
      GGGATTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAAGAG

3241  TAGGCTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCTTGGGCGGAAACCGGGGCTATGGGAC 3300
      ATCCAGGTTGTACCGACAGACTAAAGGAGTCCGGACCCGCTTTGGCCCGCTACCTTG

      3' SS (3314)
      |
3301  TGGCAGTTCCGCCAGCTCCTCTGATCATACCTGTGAAGGCAACCTCTACCCCGGTGTCCA 3360
      ACCGTCAAGCGGTTGGAGGAGACTAGTATGGAGACTTTCTGTTGGAGATGGGGACACAGGT

3361  TAAACCAATACCCCATGTCTCAAGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACAACAGAGAC 3420
      ATTTTGTATGGGGTACAGTGTCTTCTGCTCTGACCCCTAGTTCGGGTGTATGTCTCTG

3421  TGTGGACCAAGGAATACTGGTACCCCTGCCAGTCCCCCTGGAMCAGCCCTCTACCCG 3480
      ACAACCTGCTCCCTTATGACCATGGGACGGTCAGGGGGACCTGTGCGGGGACCATGGGC

3481  TTAAGAAAACAGGAGCTAATGATTATAGGCTGTCCAGGATCTGAGAGAGTCAACAAGC 3540
      AATTCTTTGGTCCCTGATTACTAATATCCGGACAGGTCTTAGACTCTCTTCASTTGTTCG

3541  GGTTGGAAGACATCCACCCACCGGTGCCCAACCCCTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCAC 3600
      CCCACCTTCTGTAGGTGGGGTGGCAAGGGTTGGGAATGTTGGAGAACTCGCCCGAGGGTG

3601  CGTCCACCAAGTGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCTTTTTCTGCTGAGACTCC 3660
      GCAGGGTGGTCAACATGTGACACGAACTAAATTTCTACGGGAAAAGACGGACTCTGAGG

                                                                 PfeI
                                                                 |
                                                                 TfiI
                                                                 |
3661  ACCCCACCAAGTCAGGCTCTCTTCGCCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAG 3720
      TGGGCTGGTCAGTCCGAGAGAGAAGCGGAACTCACCTCTCTAGGTCTCTACCCCTTAGAGTC

      MfeI
      |
      MunI
      |
3721  GACAAATGACCTGACCCAGACTTCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCACCCCTGTTTGAIG 3780
      CTGTTAACTGGACCTGCTCTGAGGTGTCCCAAAGTTTTTGTGAGGGTGGGACAACTAC

                                                                 MroI
                                                                 |
                                                                 BseAI
                                                                 |
                                                                 Esp13I
                                                                 |
                                                                 BspEI
                                                                 |
                                                                 Kpn2I
                                                                 |
                                                                 AccIII
                                                                 |
3781  AGGCACTGCACAGAGACCTAGCAGACTTCGGGATCCAGCACCCAGACTGATCCTGCTAC 3840
      TCCGTGACCTGTCTCTGATTCGCTGAGGCTTAGGTCTGGGTCTGAACTAGGACGATG

3841  AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCGGCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAAGGTACTC 3900
      TCATGCACCTACTGAATGACGACCGGGCGGTGAAGACTCAGTCTGACGGTGTGTTCCATGAG

```

FIGURA 3D-6

```

3121  ACTTTGAGGGATCAGGAGCCCCAGGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCCCTGCAAGTGTGA 3180
      TGAAACTCCCTAGTCCCTCGGGTCCAATACCCCTGGTTACCCCGTGGGGACGTTACAACT

3181  CCGTAAATATAGAAATGAGCATCGGCTACATGAGACCTCAAAAGAGCCAGATGTTTCTC 3240
      GGGATTATATCTTCTACTCGTAGCCGATGTACTCTGGAGTTTTCTCGGTCTACAAAGAG

3241  TAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCGCTGGGCGGAACCGGGGGCATGGGAC 3300
      ATCCAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGACCCCGCCTTTGGCCCCCGTACCGT

      3'BS (3314)
      |
3301  TGGCAGTTCGCCAAGCTCCTCTGATCATACCTCTGAAAGCAACCTCTACCCCCGTGTCCA 3360
      ACCGTCAAGCGGTTGGAGGAGACTAGTATGGAGACTTTCTGTTGGAGATGGGGGCACAGGT

3361  TAAACAAATACCCATGTCAAGAAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGAC 3420
      ATTTTGTATGGGTACAGTGTCTTCTGGTCTGACCCCTAGTTCGGGTGTATGTCTCTG

3421  TGTGGACACAGGAATACTGCTACCTGGCAGTCCCCCTGGAACAGCCCCCTGCTACCCG 3480
      ACAACCTGGTCCCTTATGACCATGGGACGGTCAGGGGGACCTTGTGGGGGACGATGGGC

3481  TTAAGAAACAGGGACTAATGATTATAGGCGCTGTCCAGGATCTGAGAGAACTCAACAAGC 3540
      AATTTCTTTGGTCCCTGATTACTAATATCCGGACAGGTCTTAGACTCTCTTCAGTTGTTG

3541  GGGTGGAAAGACATCCACCCACCGTGGCCAAACCTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCAC 3600
      CCCACCTTCTGTAGGTGGGGTGGCACGGGTGGGAATGTTGGAGAACTCGCCCCAGGGGTG

3601  CGTCCCAACAGTGGTACACTGTGCTTGATTAAAGGATGCCTTTTCTGCGCTGAGACTCC 3660
      GCAGGGTGGTCACCATGTGACACGAACATAAATTCTCTACGGAAGAGACCGACTCTGAGG

      PflI
      |
      TfiI
      |
3661  ACCCCACAGTCAGCCCTCTCTTTCGCCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAG 3720
      TGGGGTGGTCACTCGGAGAGAAAGCGGAACTCACCTCTCTAGGTCTCTACCCCTTAGAGTC

      MfeI
      |
      MnuI
      |
3721  GACAATTGACCTGGACGAGACTCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCCACCCCTGTTTGATG 3780
      CTGTTAACTGGACCTGGTCTGAGGGGTGTCGAAAGTTTTTGTGAGGGTGGGACAAACTAC

      MroI
      |
      BseAI
      |
      BspI3I
      |
      BspEI
      |
      Kpn2I
      |
      AccIII
      |
3781  AGGCACTGCACAGAGACCTAGCAGACTTCGGATCCAGCAACCCAGACTTGATCTCTGCTAC 3840
      TCCGTGACGTGTCTCTGGATCGTCTGAAGGCTAGGTCTGTGGGTCTGAAGTACGACGATG

3841  AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGGTACTC 3900
      TCATGCACCTACTGAAAGACGACCGGGCGGTGAAGACTCGATCTGACGGTTGTTCCATGAG

```

FIGURA 3D-7

```

3901  GGGCCCTGTTTACAAACCTAGGGAAACCTCGGGTATCGGGCCCTCGGGCCAAAGAAAGCCCAAA 3960
      CCCCAGGACAAATGTTTGGGATCCCTTGGAGCCCATAGCCCGGAGCCGGTTCTTTCCGGTTT

3961  TTTGCCAGAAACAGGTCAGATATCTGGGGTATCTTCTAAAGAGGGTCAGAGATGGCTGA 4020
      AAACGGTCTTTGTCCAGTTCATAGACCCCATAGAGATTTTCTCCAGTCTCTACCGACT

4021  CTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCCTACTCCGAGACCCCTCGACAACTAA 4080
      GACTCCGGTCTTTTCTCTGACACTACCCCGTCCGATGAGGCTTCTGGGGAGCTGTTGATT

4081  GGGAGTTCCTAGGGACGGCAGGCTTCTGTGCGCTCTGGATCCCTGGGTTTGCAGAAATGG 4140
      CCTCAAGGATCCCTGCGCTCCGAGACAGCCGAGACCTAGGGACCCAAACGCTCTTTACC

4141  CAGCCCTCTGTACCTCTCTACCAAAACGGGGACTCTGTTTAAATGGGGCCAGACCAAC 4200
      CTCGGGGCAACATGGGAGAGTGGTTTTGCCCTGACACAAATTAACCCCGGCTCTGCTTG

4201  AAAAGGCCATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGTTTGGCAG 4260
      TTTTCCGGATAGTTCTTTAGTTCTGTTGAGAGAGATTGACGGGGTCGGGACCCCAACGGTC

      Sall
      |
4261  ATTTGACTAAGCCCTTTGAACTCTTTGTGACGAGAGAGAGGGCTACGCCAAAGGTGTCC 4320
      TAAACTGATTCGGGAAACTTGAGAAACAGCTGCTCTTCTGTCGGATGGGGTTTCCACAGG

4321  TAACGCAAAAACCTGGGACCTTGGGCTCGGCGGGTGGCTTACCTGTCCAAAAGCTAGACC 4380
      ATTGGCTTTTGGACCTGGAAACCGCAGCCGGCCACCGGATGGACAGTTTTCGATCTGG

4381  CAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCGGTACTGACAA 4440
      GTCATGCTGACCCACCGGGGGAGCGGATGGCTACCATGCTCGGTAACGGCATGACTGTT

4441  AGGATGCAGGCAAGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCATTCTGGCCCCCATGCACTAG 4500
      TCCTACGTCCGTTTCGATTGGTACCTGTGCGTGAATCAGTAAGACCGGGGGGTACGTCATC

4501  AGGCACTAGTCAAAACAACCCCGGACCGCTGGCTTTCCAAAGCCCGGATGACTCACTATC 4560
      TCCGTGATCAGTTTGTGGGGGGCTGGCGACCGAAAGGTTGCGGGCCTACTGAGTGATAG

4561  AGGCTTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCCGACCGGTGTTAGCCCTGAACCCGG 4620
      TCCGGAACGAAAACCTGTGCTGGCCAGGTCAGGCTGACCACCATCGGGACTTGGGCC

4621  CTACGCTGCTCCCACTGCTGAGGAAGGGCTGCAACACAACTGCTTTGATATCTTGGCCG 4680
      GATGCGACGAGGGTGAACGACTCTTCCCGACCTTGTGTTGACGGAACTATAGGACCGGC

4681  AAGCCACCGGAACCCGACCCGACCTAACGGACCAAGCCCTCCAGACCGGACCAACCT 4740
      TTCGGGTGCTTGGGCTGGGCTGGATTGCTGCTGGCGAGGGTCTGCGGCTGGTGTGA

4741  GGTACACCGATGGAAGCACTCTCTTACAAGAGGGACAGCGTAAGGGCGGAGCTCCGGTGA 4800
      CCATGTGCTTACCTTCTGTCAGAGAAATGTTCTCCCTGTGCAATTCCGCCCTCGACGCCACT

      BlnI
      |
      CelIII
      |
      Epu1102I
      |
      Bsp1730I
      |
4801  CCACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCTAAAGCCCTGCCAGCCGGGACATCGGCTCAGCGGG 4860
      GGTGGCTCTGGCTCCATTAGACCCGATTTGGGGACGGTUGGCCCTGTAGGCGAGTGGCC

4861  CTGAAGTCTATAGCACTCACCCAGCCCTAAAGATGGCAGAAGGTAAGAAAGCTAAATCTTT 4920
      GACTTGACTATCGTGAAGTGGGTCCGGGATTTCTACCGTCTTCCATTCTTGGATTTACAA

```

FIGURA 3D-8

```

4921 ATACTGATAGCCCTTATGCTTTTGGCTACTGCCCATATCCATGGAGAAATATACAGAAGGC 4980
    TATGACTATCGGCAATAACGAAACGATGACGGGTATAGGTACCTCTTTATATGCTCTCCG

4981 GTGGGTGCTCAGATCAGAAGGCCAAAGAGATCAAAAATAAGACGAGATCTTGGCCCTAC 5040
    CACCCACAGAGTGTAGTCTTCCGTTTCTCTAGTTTTTATTTCTGCTCTAGAACCAGGATG

5041 TAAAAGCCCTCTTTCTGCCCAAAGACTTAGCATAATCCATTGTCCAGGACATCAAAAGG 5100
    ATTTTCGGGAGAAAGACGGSTTTTCTGAATCGTATTAGGTAACAGSTCCTGTAGTTTTCC

5101 GACACAGCCCGAGGCTAGAGGCCAACCGGATGGCTGACCAAGCGGCCCGAAAGGCAGCCA 5160
    CTGTGTGCGCGCTCCGATCTCCGTTGGCTTACCGACTGGTTCCCGGGCTTTCCGTCGGT

5161 TCACAGAGACTCCAGACACCTCTACCTCTCTCATAGAAAATTTCATCACCTTACACCTCAG 5220
    AGTGTCTCTGAGCTCTGTGGAGATGGGAGGAGTATCTTTAAGTAGTGGGATGTGGAGTC

5221 AACATTTTCATTACACAGTGAAGTATATAAGGACCTAACCAAGTGGGGGGCCATTTATG 5280
    TTGTAAAAGTAATGTGTCACTGACTATATTTCTCTGGATTGGTTCAACCCCGGTAATAAC

5281 ATAAAACAAAGAACTATTGGGTCTACCAAGGAAACCTGTGATGCTGACCAGTTTTACTT 5340
    TATTTTGTCTTCTTCATAACCCAGATGGTTCCCTTTTGGACACTACGGACTGGTCAAAATGAA

5341 TTGAATTATTAGACTTTCTTCATCAGCTGACTCACTCAGCTTCTCAAAAATGAAGGCTC 5400
    AACTTAATAATCTGAAAGAAGTAGTGCAGTGAAGTGGAGTCAAGAGTTTTTACTTCCGAG

5401 TCCTAGAGAGAGGCCACAGTCCCTACTACATGCTGAACCGGGATCGAACACTCAAAAATA 5460
    AGGATCTCTCTTCCGCTCTCAGGGATGATGTACGACTTGGCCCTAGCTTGTGAGTTTTAT

5461 TCACTGAGACCTGCAAAAGCTTGTGCACAAGTCAACGCCAGCAAGTGTGCCGTTAAACAGG 5520
    AGTGACTCTGGAAGTTTCGAACACGTGTTCAAGTTGCGGTCTGTTGAGACGGCAATTTGTCC

    SacII
    |
    SgrBI
    |
    Cfr42I
    |
    Sfr303I
    |
    KspI
    |

5521 GAAGTAGGGTCCCGCGGCATCGGCCCGGCACTCATTGGGAGATCGAATTCACCGAGATAA 5580
    CTTGATCCAGGCGCGCCGTAGCCGGGCGGTGAGTAACCTCTAGCTAAAGTGGCTCTATT

5581 AGCCCGGATTGTATGGCTATAAATATCTTCTAGTTTTTATAGATACCTTTCTGGCTGGA 5640
    TCGGGCCTAACATACCGATATTTAAGAAGATCAAAAATATCTATGGAAAAGACCGACCT

5641 TAGAAGCCTTCCCAACCAAGAAAGAAACCGCCAAAGGTCGTAACCAAGAAGCTACTAGAGG 5700
    ATCTTCGGAAGGCTTGGTTCTTTCTTTGGCGGTTCAGCATTGGTTCTTCGATGATCTCC

    PaeI
    |
    BbuI
    |
    SpaHI
    |
    SphI
    |

5701 AGATCTTCCCGAGGTTCCGCGATGCCTCAGGTATTGGGAACTGACAAATGGGCTGCTTCG 5760
    TCTAGAAGGGGTCCAAGCCGTACGGAGTCCATAACCTTGACTGTTACCGGAGCGGAAGC

```

FIGURA 3D-9

ES 2 709 481 T3



FIGURA 3D-10

ES 2 709 481 T3

```

6961  CTTCAGAGGGGCTACTGAGAGGGGGGAGATGCBACCCCTCTAGTCCTAGAAITCACTGATGC 6969
GAAGGTTCCCGGATGAGCTTCCCCGGTCTACCTTGGGAGATCAGGATCTTAAGTGAATAG

6961  AGGAAAAAAGGCTAACTGGGACGGGGCCAAATGGTGGGGGACTGAGACTGTACCGGACAGG 7020
TCCCTTTTTCGGATTGACCCCTGACCGGGTTTACGACCCCTGACTCTGACATGGCCTGTC

7021  AACAAATCCATTATLLATGTTCTTCC/AG/C/CGGKAGGTCTTAATGTHGACCCCGAT 7080
TTGTCTAGGATAATGCTACAAGAGGAGCTGCGCCCTCCAGGAATTACACCCCTGGGGCTCA

7081  CCCCATAGGGCCCAACCAAGTAATACCGSACCAAGGACTCCCTTCTCACCATAAGAGAT 7140
GGGATATCCCGGTTGGGTCATAATGGGCTGCTTCTCTGAAGGAAGGAGTGGTATCTCTA

7141  TGTACCGGCTCCACAGCCACCTAGCGCCCTCAATACCACTTACCGCCCTTCCACTACCA 7200
ACATGGCGGAGGTGTGGGTGGATCGGGGGAGTTATGCTCAATGGGGGAGGATGATGGT

7201  TACACCCCTCAACCTTCCCTACAGGTCCAGGTGTCCACAGCCACCCCGAGGACTGGAGA 7260
ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTTCAAGTTACACAGGTTGTCGGTGGGGGTCCTGACCTCT

7261  TAGACTACTAGCTCTAGTCAAAGGAGCCATATCAGGCGCTTAACTCAACCAATCCGACAA 7320
ATCTGATGATCGAGATCAGTTTCTCTCGATATCTCGCGAATTGGAGTGTATTAGGCTGTT

7321  GACCCAGAGATGTTGGCTGTGCTTAGTGTCCGGACCTCCTTATTAAGGAGGAGTACGGT 7380
CTGGGTTCTTACACCCGACAGGAATCAGAGCCCTGGAGGAATTAATGCTTCTCATCGCCA

7381  CGTGGGCACCTTAACCAATCATTCGCGCTCCGGCCAACTGTACGGCCACTTCCCAACA 7440
GCACCCGTGATATGCTTAGTAAGGTGGGAGGCCGGTTGACATNGCGGTGAAGGCTGT

                                     EcoT22I
                                     |
                                     NsiI
                                     |
                                     Msp1103I
                                     |
                                     Ssp2I
                                     |
                                     BfrBI
                                     |
7441  TAAGCTTACCTATGTGAAGTGACAGGACAGGGCCATGCAATGGGGGAGTACCTAAAGC 7500
ATTGGAATGGGATACACTTCACTGTCTCTCCGGATACGTACCCCGTCAATGATTTTG

                                     NaeI
                                     |
                                     PdaI
                                     |
                                     HcoNI
                                     |
                                     NgoMEV
                                     |
7501  TCACCAGGCTTATGTAAACACACCCAGAGCGCCGGCTCAGGATCCTACTACCTTGCAGC 7560
AGTGGTCCGGAATACATTGTGGTGGGTTTCCCGGGCGAGTCCATAGATGATGGAACGTG

                                     AclI
                                     |
                                     QLI
                                     |
7561  ACCCGCCGGAACATGTGGCTTGGAGGACTGGATTACTCCCTGCTTGTCCACACGGT 7620
TGGGCGGGCTTGTACACCCGAGGTCGTGACCTACTGAGGAGGAGACAGGTGGTGGCA

7621  GGTCAATCTAAGCACAGATTAATGTGATTAAGTGGAGCTCTGGCCAGAGTAATTTACCA 7680
CGAGTTAGATTGGTGTCTAATAACACATATCACTTGAGACCGGGTCTCATTAAATGGT

```

FIGURA 3D-11

```

7681 CTCCCCCGATTATATGTATGGTCAGCTTGAACAGCGTACCAAATATATAAAGAGAGCCAGT 7740
GAGGGGGGCTAATATACATACCAGTCGAACCTTGTCCCATGGTATTATATTTTCTCTCGGTCA

7741 ATCATTGACCCCTGGCCCTTCTACTAGGAGGATTAACCATGGGAGGGGATTGCCAGCTGGAA 7800
TAGTAACTGGGACCGGGGAAGATGATCTCTCTAATTGGTACCCCTCCCTAACGTCGACCTTA

7801 AAGGACGGGGACCACTGCGCTTAATTAAAACCCAGCAGTTTGASCAGCTTCATGCCCTAT 7860
TCCCTGCCCCCTGGTGACGGAATTAATTTTGGGTGGTCAAACCTCGTCGAAGTACGGCGATA

7861 CCGAGACAGACCTCAACGGAAGTCGAAAAGTCANTTACCAACCTAGAAAAATCACTGACCTC 7920
GGTCTGTCTGGAGTTGCTTCAGCTTTTCAGCTTAATGGTTGGATCTTTTCACTGACTGGAG

7921 GTTGTCTGAAGTASTCTACAGAACCGCAGAGCCCTAGATTTCCTATTTCCTAAGGAGGG 7980
CAACAGACTTCATCAGGATGTCTTGGGCTCTCCGGATCTAARCGATAAGGATTTCTCTCC

7981 AAGTCTCTGGCTAGCCCTAAGAGAGAGATGTTGTTTTTATGGACACCACACGGGGCTAGT 8040
TCAGAGAGAGCGGTGGGATTTTCTCTTACAAACAAAATACGTCTGTGTGCCCCGATCA

8041 GAGGACAGCCATGGCCAAATTAAGAGAGAGGCTTAATCAGAGACAAAACTATTTGAGAC 8100
CTCTCTGTGCTACCGGTTTAAATCTCTTCCGAATTAGTCTCTGTTTTTGATAAACTCTG

```

NspV
 |
 BstBI
 |
 Bsp119I
 |
 AseII
 |
 Csp45I
 |
 SfuI
 |
 Epu14I
 |
 BspT104I
 |

```

8101 AGGCCAAGGATGGTTCCGAAGGGCTGTTTAAATGATCCCCCTGGTTTACCACCTTAATCTC 8160
TCCGGTTCTTACCAAGCTTCCCGACAAATTATCTAGGGGACCAAATGGTGGATTAGAG

8161 CACCATCATGAGACCTCTAATAGTACTCTTACAGATCTTACTCTTTGGACCTTGCATTCT 8220
GTGGTAGTACCCCTGGAGATTATCATGAGAAATGACTAGAAATGAGAAACCTGGAAACGTAGA

8221 CAATCGATTGGTCCAATTTGTIAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGAC 8280
GTIAGCTAACCGAGGTIAACAAATTTCTGTCCCTAGAGTCACCGAGGTCCGAGACCAAACTG

```

IRIS reg(8327,8876)>>>

MluI(8325)

```

8281 TCAGCAATATCACCAGCTAAAACCCATAGAGTACGAGCCATGAACGCTTACTGGCCGAA 8340
AGTCGTTATAGTGGTCAATTTTGGGTATCTCTNAGCTCGGTACTTCCGCAATGACCGGCTT

```

ires_ensv reg(8378,8876)>>>

```

8341 GCGGCTTGGATAAGGCGGGTGTTCCTTTGTCTATATGTTATTTCCACCATATTGCGGT 8400
CGTGGAACTTATTTCCGGCCACACGCAAAACATATACAAATAAAAGGTGGTATAACGGCA

```

```

8401 CTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTTGGGCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGG 8460
GAAAACCGTTACACTCCCGGGGCTTTGGACCGGGACAGAGAACTGCTTCGTAGGATCCC

```

FIGURA 3D-12

8461 GTCTTTTCCCTCTCTGCCCCAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCTGTGAAGGAAACAGTTTC 8520
CAGAAAGGGGAGACCGGTTCCTTACGTTCCAGACAACCTTACAGCACTTCCTTCGTCAAG

8521 CTCTGGAAGCTTCTTTGAAGACAAACAACCTCTGTAGCGACCTTTTGACGGCAGCGGAAAC 8580
GAGACCTTCGAAGAATCTCTGTTTGTTCAGACATGCTTGGGAAACGTCCCTTCGCTTGG

8581 CCCCACCTGCGGACAGGTGCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACCTTCGAA 8640
GGGTGGACCGCTGTCCACGGAGACGCCGGTTTTCCGTGCACATATTTCTATGTGGACGTT

8641 AGGCGGCACAACCCCACTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTTGGAAAGAGTCAAAATGGC 8700
TCGCGCGTGTGTTGGGTGACGGTGAACACTCAACCTATCAACACCTTTCTCAATTTTACCG

8701 TCTCTCAAGCGTATTCACAAGGGGCTGAAGGATGCCAGAAAGGTACCCCATTTGTATGG 8760
AGAGGAGTTCCGATAAGTTGTTCCCGCACTTCTACGGGTCTTCCATGGGGTAACATACC

8761 GATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTGTGCGAGGTTAAAAAAAC 8820
CTAGACTAGACCCCGGAGCCACGTGTACGAAATGTACACAAATCAGCTCCATTTTTTTG

yCD2 (8877,9353)>>>

PsiI (3874)

8821 GTCTAGGCCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATTTTAA 8880
CAGATCCGGGGGCTTGGTGGCCCTGCACCAAAAGGAAACTTTTGTGCTAAATAT

8881 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 8881 to 8940]

8941 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 8941 to 9000]

9001 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 9001 to 9060]

9061 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 9061 to 9120]

9121 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 9121 to 9180]

9181 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 9181 to 9240]

9241 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 9241 to 9300]

NotI (9356)

CciNI

9301 [Sequencing chromatogram showing peaks for positions 9301 to 9360]

93 Región (9405,9854)>>>

9361 CAGATAAAATAAAAGATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCACCC 9420
GTCTATTTTATTTTCTAAAAATAAATCAGAGGTCTTTTTCCCCCTTACTTTCTGAGGTGG

FIGURA 3D-13

ES 2 709 481 T3

```

      EmtI
      |
      NheI
      |
      AseRI  5_LTR2  other(9447,9998)>>>>
      |
9421  TGTAGGTTTGGCAA/CTAGCTTAAGTATCCCATTTTSCRAAGCATGGAAAAATACATAA 9480
      ACATCCAAACCGTTGATTCGAATTCATTCGGGTAAAACGTTCCGTACCTTTTATGTATT
9481  CTGACAAATAGGAAATTCAGATCAAGGTCAGGACAGATGGAAACAGCTGAATAATGGGCA 9540
      GACTCTTATCTCTTCAAGTCTAGTTCCAGTCTTGTCTACCTTGTGACTTATACCCGGT
9541  AACAGGATATCTGTGGTAAGCAATTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAGAGACAGATGGACA 9600
      TTGTCCTATAGACACCATTCGTCAAGGACGGGGCCGAGTCCCGGTTCTTGTCTACCTTGT
9601  GTTGAATATGCCCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAATTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCA 9660
      CCACTTATACCCGGTTTGTCTTATAGACACCATTCGTCAAGGACGGGGCCGAGTCCCGGT
9661  AGAACAGATGCTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGACATTTCTAGAGAACCATCAGATG 9720
      TCTTGTCTACCAAGGGGTCTACGCCAGGTCGGGAGTCTGTCAAGATCTCTTGGTATCTAC
9721  TTTCAGGGTGCCTCCAAAGGACCTGAAATGACCTGTGCTTATTTGAACATAACCAATCAG 9780
      AAAGGTCCACAGGGGTTCCTGAGCTTTACTGGGACACGGAATAAACTTGAATGTTAGTC

      SacI
      |
      SstI
      |
      PvuI  PspI24BI
      |      |
      BsePI  EcoICRI
      |      |
      BseRII  Eco1136II
      |      |
9781  TTGCTTTCTGCTTCTGTTCTGCTGCGGCTTCTGCTGACCGAGCTCAATAAAGAGCCACAA 9840
      AAGCCAAAGACCGAAGGCAAGCCCGGCAAGACAGGGGCTTCAGCTTATTTTCTCGCTGTT
      R Región (9855,9921)>>>>
      |
9841  CCGCTCACTCGGGGCCAGTCCCTCCGATTGACTGAGTGGCCGGGTACCCGTGTATCCA 9900
      GGGCAGTGAAGCCCGCGGTGAGGAGGCTAAGTCACTCAGCGGGCCCATGGGCACATAGGT
      BS Región (9922,9998)>>>>
      |
9901  ATAAACCTCTTCAGTTGATCCGACTTGTGCTCTGCTTCTTCTTGGGAGGTTCTCT 9960
      TATTTGGGAGAACGTCAACCTAGGCTGAACACAGAGCGACAAAGGAACCTCCAGAGGA
9961  CTGAGTCAATTGACTACCCGTCAGCGGGGCTCTTTCAATACATGTGAGCAAAAGGCCAGCA 10020
      GACTCACTAAGTGAATGGGAGTCCGCCCCAGAAAGTAATGTACACTCGTTTTCCGGTCTGT
      pBR322 origin(10045,10664)<<<
      |
10021  AAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTCTGGGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC 10080
      TTTCCGGCTCCTTGGCATTTTTCGGGCGCAACGACCGCAAAAGGTATCCGAGCGGGGGG
10081  TGAAGAGCATCACAAAAATCGAAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATA 10140
      ACTGCTCGTAGTGTTTTATGCTGCGAGTTCAGTCTCCACCGCTTTGGGCTGTCTGTATAT
10141  AAGATACCAAGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCTGTGCGCTCTCTGTTCGACCCCTGCC 10200
      TTCTATGCTCCGCAAGGGGGACCTTCGAGGGAGCACGGAGAGGACAAGGCTGGGACGG

```

FIGURA 3D-14

10201 GCTTACCGGATACCTGTCCGGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGGCTTTCTCAATGCTC 10260
CGAATGGCCTATGGACAGGCGGAAAGAGGGAAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTTACGAG

10261 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAGCTGGGCTGTGTGSCACGA 10320
TGGACATCCATAGASTCAGCCACATCCAGCARGCGAGGTTGGAACCGACACACGTGCT

10321 ACCCCCCGTTCCAGCCCGACCGCTGGCCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAAACCC 10380
TGGGGGCAAGTCGGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGG

10381 GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGTAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG 10440
CCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCGTCTGTCGGTGACCATTGTCTTAATGCTCTCGCTC

10441 GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAASTGGTGGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAG 10500
CATACATCCGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCAACGGGATTGATGCCGATGTGATCTTC

10501 GACASTATTTGGTATCTGGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG 10560
CTGTATATAAACCATAGACGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAGCCCTTTTCTCAACCATC

10561 CTCTTGATCCGCAAAACAAACACCCCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTCTTTGCCAAGCAGCA 10620
GAGAACTAGGCCGTTTGTCTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAAACGTTCTGCTGT

10621 CATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGA 10680
CTAATGGCGCTCTTTTTTCTTAGAGTTCTTCTAGGAACTAGAAAAAGATGCCCCAGACT

10681 CGCTCAGTGGAAACGAAAACTCAGGTTAAGGSEATTTTGGTCAAGAGATTATCAAAAAAGGAT 10740
GCGASTCACCTTGCTTTTGAAGTGAATTCCCTAAAACCACTACTCTAATAGTTTTTCTTA

10741 CTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA 10800
CAAGTGGATCTAGGAAAAATTTAATTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTECATATATACT

amp marcador (10819, 11679) <<<
|

10801 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG 10860
CATTTGAACAGACTGTCAATGGTTACCAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTGGCTAGAC

10861 TCTATTTGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTGGTGTAGATAACTACGATACGGGA 10920
AGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGACTGAGGGGACGACATCTATTGATGCTATGCCCT

10921 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTCTGCAATGATACCGGAGACCCACGCTCACCGGCTCC 10980
CCCCAATGGTAGACCGGGGTACGACGTTACTATGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCCGAGG

10981 AGATTTATCAGCAATAAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCTTCAAC 11040
TCTAAATAGTGGTTATTTGGTGGTGGCCCTTCGGGCTCGGCTCTTCACCAAGGAGGTTG

11041 TTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATGTTGGCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGC 11100
AAATAGGCGGAGGTAGGTCAGATAATTAACAACGGCCCTTCGATCTCATTTCATCAAGCGG

11101 AGTTAATAGTTTGGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCAAGCTCGTC 11160
TCAATTATCAAAACGCTTGCAACAACGGTAACGACGTCGGTAGCACCACAGTGGGAGCAG

11161 GTTTGGTATGGCTTCATTTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC 11220
CAAACCATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCGGCTCAATGTACTAGGGG

11221 CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTT 11280
GTACAACAGGTTTTTTTGGCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATTCAA

11281 GCGCGCAGTGTATCACTCATGTTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTGATGCC 11340
CCGGCGTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCTGTGACGTATTAAGAGAATGACAGTACGG

11341 ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG 11400
TAGGCATTCTACGAAAAGACACTGACCACTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCAC

FIGURA 3D-15

```

11401 TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACAACGGGATAATAACCGCGCCACATAG 11460
      ATACGCGCGCTGGCTCAACGAGAACGGGCGCGAGTTGTGCCCTATTATGCGCGCGGTGTATC

11461 CAGAACTTTAAAGTGCTCATCTTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGAT 11520
      GTCTTGAAATTTTCACGAGTAGTAACCTTTTGCAAGAAGCCCGCTTTTGAGAGTTCCTA

11521 CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGC 11580
      GAATGGCGACAACCTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTGACTAGAAAGTCG

11581 ATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCCAAAATGCCGCAAA 11640
      TAGAAAAATGAAAGTGGTCGCAAGACCCACTCGTTTTTGTCTCTCCGTTTTACGGCGTTT

11641 AAAGGGAATAAGGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTA 11700
      TTTCCTTATTCGCCGCTGTGCCTTTACAACCTTATGAGTATGAGAAGGAAAAAGTTATAAT

      Promotor CMV(11721,11749)<<<
      |
11701 TTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA 11760
      AACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTT

11761 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGGCGCACATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGA 11820
      TTTATTTGTTTATCCCAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTCACGCTGGACTGCAGATTCT

11821 AACCATTATTATCATGACATTAACTATAAAAATAGGGCGTATCACGAGGCCCTTTTGTCT 11880
      TTGGTAATAATAGTACTGTAATTGGATATTTTATCCGCATAGTCTCCCGGAAAGCAGA

11881 TCAAGAAATTCAT 11892
      AGTTCTTAAGTA
  
```

FIGURA 3D-16

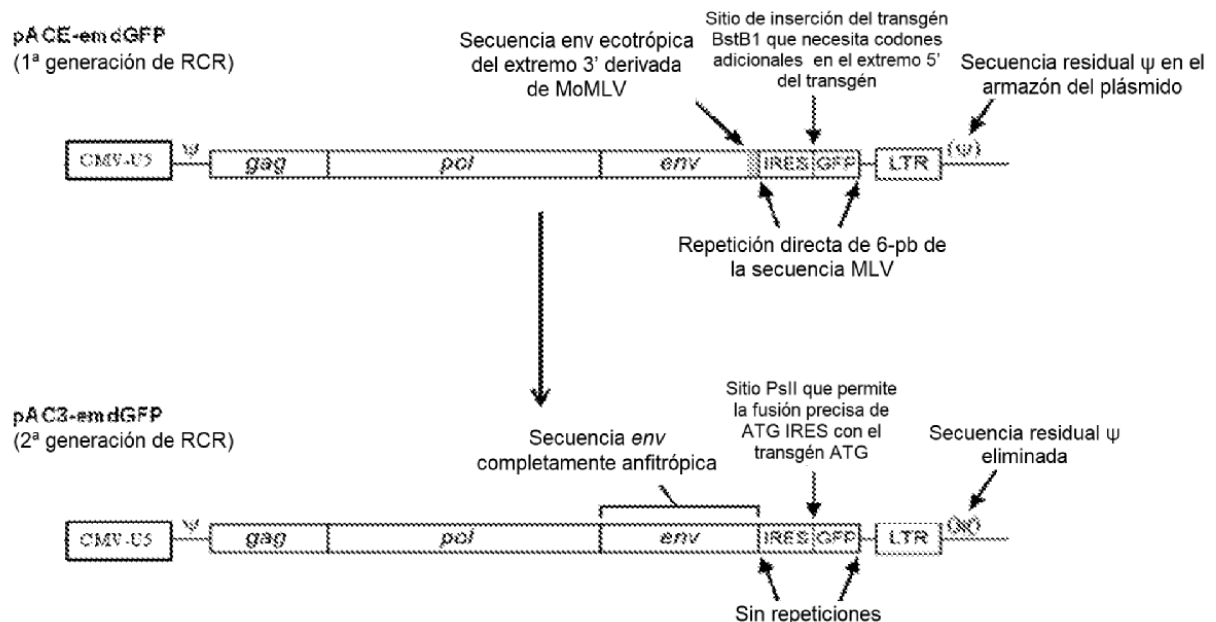


FIGURA 3E

Estructura de pAC3-γCD2 (aka T7.0002)

Diseño de la secuencia de CD de levadura (con codón optimizado + sustitución de 3 aminoácidos) Expresada en un vector retroviral MLV competente en replicación que codifica 4070A env

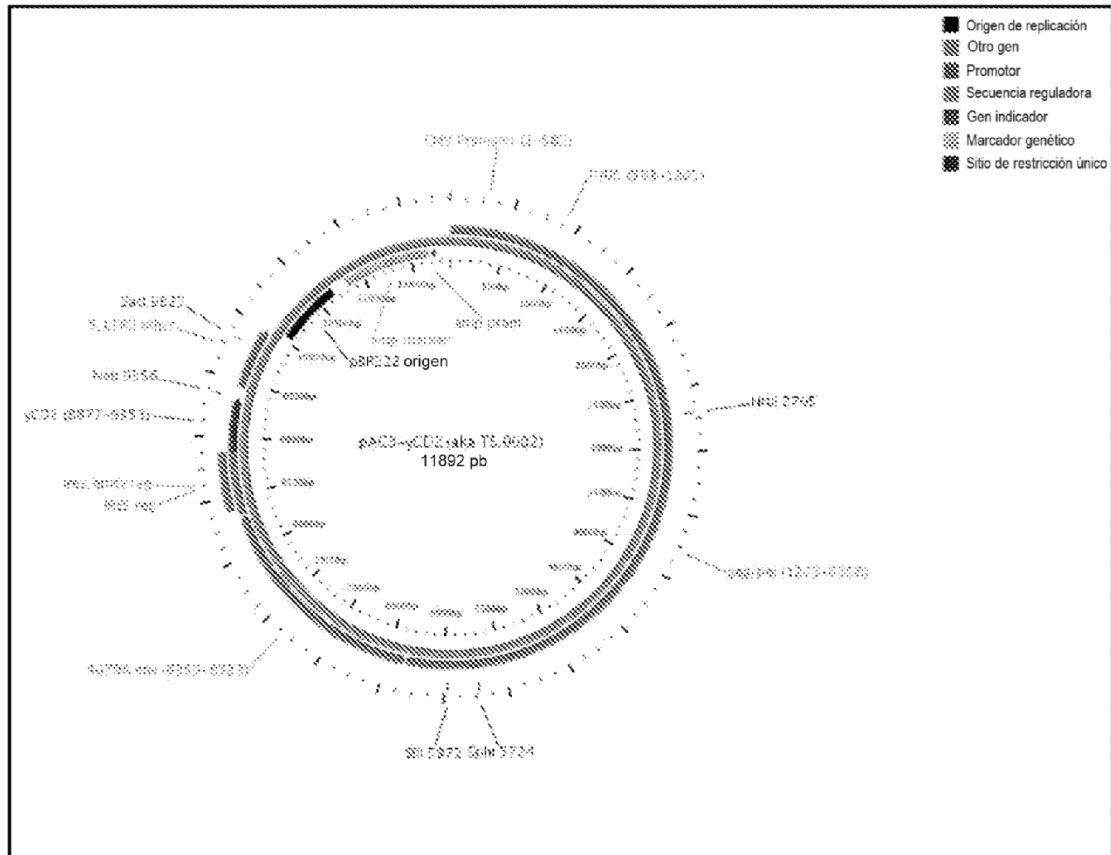
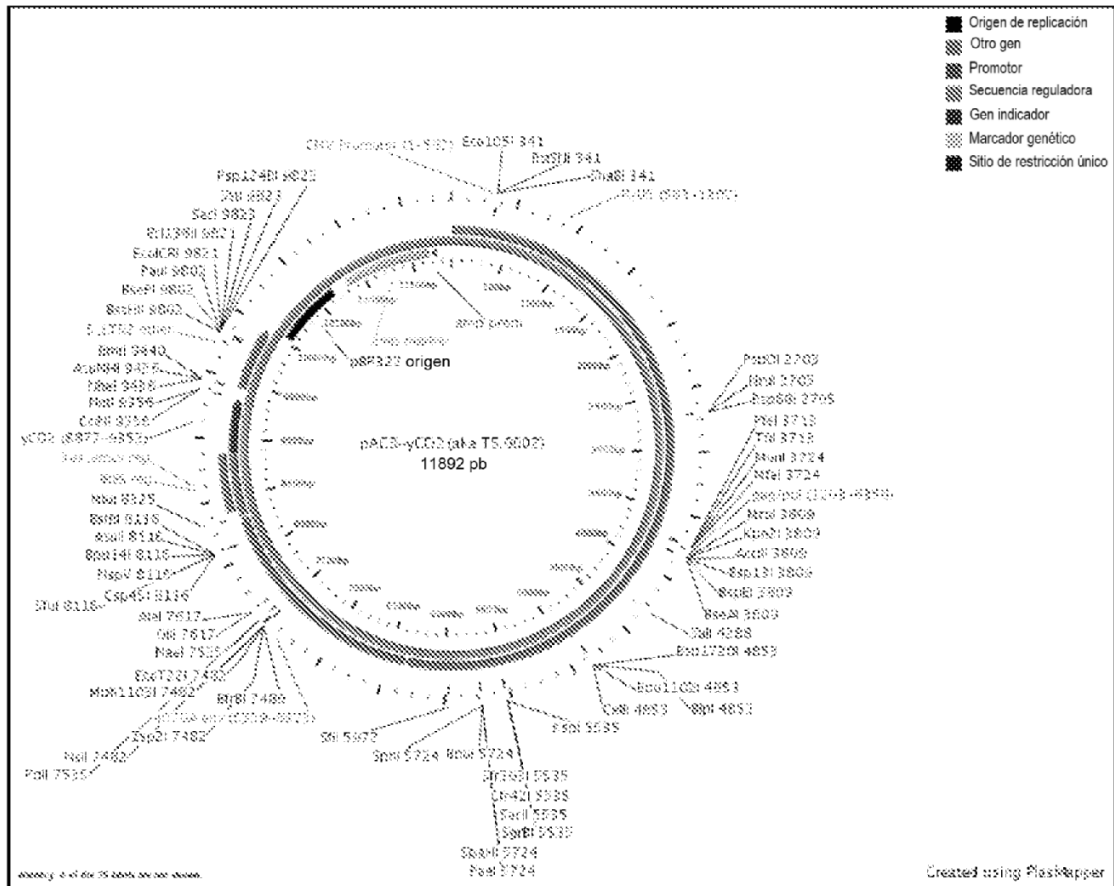


FIGURA 3F-1

Estructura de pAC3-γCD2 (aka T5.0002)

(Detalle de digestión de una única enzima)



El sitio de digestión del Psil existente (8874) no se muestra en el mapa.

FIGURA 3F-2

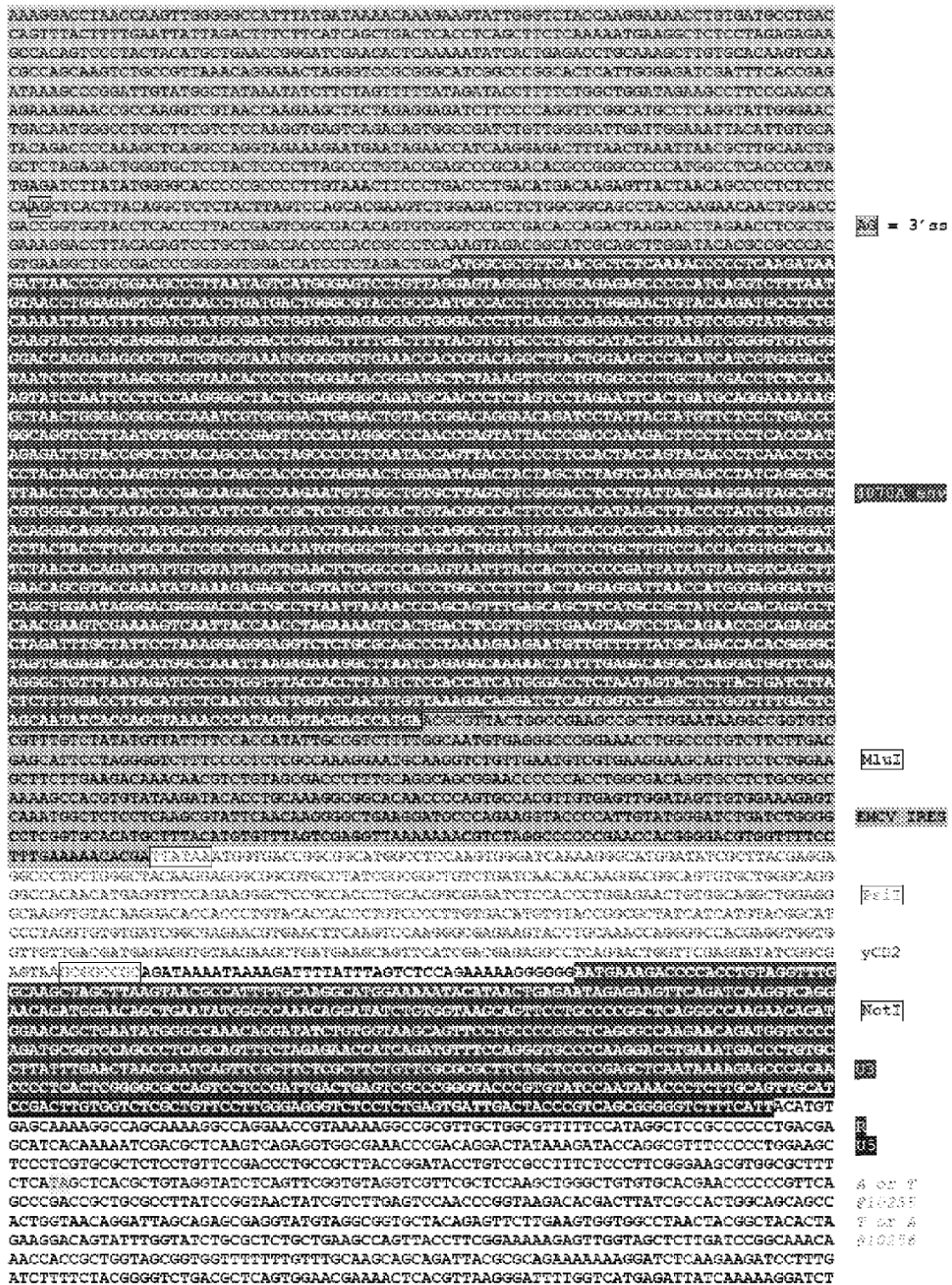


FIGURA 3F-4

TCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTCCA
 ATGCTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGGCTGACTCCCCCTCGTGTAGATA
 ACTACGATACGGGAGGGCTTAOCATCTGGCCCCAGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTAT
 CAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGGCTCCATCCAGTCTATTAAATTG
 TTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAAGTTTGGCGCAACSTTGTGGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCA
 CGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTTCAGTTCGCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA
 AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGAGAGTAAAGTTGGCCGCGAGTTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT
 GCATAATTCTCTTCTCTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGCAACCAAGTCAATCTGAGAAATAG
 TGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGGCCCGGCTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCA
 TCATTGGAAAACGTTCTTGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCTGTG
 ACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGSCAAAATGCCSCAAAAAG
 GGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTTACTCTTCCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTG
 TCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACC
 TGACGTTCTAAGAAAACATTATTATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCAAGAAATTC
 CAT

AseI
 AapI, GFI
 Add C after
 11690

FIGURA 3F-5

pAC3-γCD2 (Secuencia de digestión única)

```

Promotor CMV (1-582)>>>
|
1 TAGCTATTGAATACTAATCAAACTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCCATATATGGAGTTCCG 60
ATCAATATATATCAITAGTTTAAAGCCCCAGTAATCAAGTAATCGGGTATATACCTCCAGGCC

61 CTTTACATTAAGTTACGGTAAATGCCCCGCTTGGCTGACGGGCCAGGACCCCGCCCAAT 120
GCAATTTATTTGATGTCATTATACCGGGGGGAGCCGACTGGCGGGTTCCTGGGGGGGGGTAA

121 GAGCTCAATAATGACGTAATGTTCCCAATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGAGGTCA 180
CTGCAGTTATTTACTGCAATACAGGTTATTCATTTCGGTTATCCCTGAAAGCTAACTGCAAT

181 ATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGGCCGCTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAATGCCC 240
TACCGACCTGATAAATGCGATTGAGCGGTTGACCGTCAATGATAGTTCAGATAGTATACCG

241 AAGTACCGCCCTTATTGCGGTCAATGACGTAATGCGCCCGCTGGCATTTATGCGAGTA 300
TTCAATGGGGGATAACTGCACTTACTGCGATTTCGCGGGGGAGCGGTAAATACGGGTCAAT

Eco105I
|
SnaBI
|
BstSNI
|
301 CATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGGCACTACATCTCAAGTATTTASTCATCGCTATTAC 360
GTACCTGGAATACCGTGAAGGATGAACCGTCATCTAGATGCAATATCCAGTACCGATTAATG

361 CATGGTGATGCGCTTTTGGCGATCAATCAATGCGGCTGGATAGCGGTTTGAATCAGCGGG 420
GTACCGACTACGCCAAACCGCTATGTAGTACCGGCACTTATCGGTAACTGAGTGCCCGC

421 ATTTCCAGTCTGCCACCCCATTTGACGCTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCAGCAAAATCAACG 480
TAAAGGTTGACAGCGTGGGGTACTGCACTTACCGTCAACAAACCGGTGTTTATGTTGC

481 GGACTTTCCAAATGTCCTAAGCACTCCGCCCCATTGACGCAATGGGGGGTATGGCTGT 540
CCTGAAAGGTTTACAGCATCTTTGAGGGCGGGTAACTGCGGTTTACCGCCCATCCGACAA

E región (583-650)>>>
|
541 ACGGTGGGAGGTTCTAATGAAGCAAGGCTGCTTTAGTGAACCGGGCGGCACTCCTCCGATTC 600
TCCACCGCTCGAGATATATTCCTCTCAGCAAAATCACTTGGCCGGCGGTACGAGGCTAAC

U5 región (651-1202)>>>
|
601 ACTGAGTCCCGCGGATCCGCTTATCCATTAACCCCTCTTGCAGTTGCATCCGACTTGT 660
TCACTCGGGGGGCGATGGGCACATAGTTATTTGGGAGAGCGTCAAGCTAGGCTGAACA

661 GGTCTCGTGTCTCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGAATGACTACCGTCAAGCGGGGGTC 720
CCAGAGCGACAAAGGAACCCCTCCAGAGGAGACTCACTAACTGATGGGCACTCGCCGCCAG

721 TTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCCCAGGGACCAACGACCCACCA 780
AAAGTAAACCCCGAGGAGGCGCTAGCCCTCTGGGGACGGGTCCCTGGTGGCTGAGTGGT

E' SS (788)
|
781 CCGGGAGGTAAGCTGAGCAGCAAACTTATCTGTGTCGTCCGATTGTCTAGTGTCTATGAC 840
GGCCCTCCTTTCGACCGGTCGTTGAATAGACACAGACAGGCTAACAGATCACAGATACTG

841 TGATTTTATGCGGCTGCGTCCGTTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGACCCG 900

```

FIGURA 3F-6

ACTAAAATAAGGACGACGACCCATGATCAATCGATTGATCGAGACATAGACCGCCTGGGC

901 TGGTGGAACTGACGAGTTGCGAARACCCGGCCGCAACCCCTGGGAGACGTCOCAGGGACTT 960
AUCACCTTGACTGCTCAAGCCTTGTGGGCGCGGCTTGGGACCCCTGTGCAGGGTCCCTGAA

961 CCGGGGCGCTTTTGTGGCCGACCTGAGTCCAAAAATCCCGATCGTTTTGGACTCCTTG 1020
GCCCCCGGCAAAAACACCGGGCTGGACTCAGGTTTTTAGGGCTAGCAAAACCTGAGAAAC

1021 GTGCACTCCCTTAGAGGAGGATATGTGGTCTGTGAGGAGACGAGAACTAAACAGT 1080
CAGGTGGGGGGAATCTCCTCCCTATACACCAAGACCATCCTCTGCTCTTGGATTTTGTCA

1081 TCCCGCTCCGTCTGAATTTTTGTCTTTGGTTTGGGACCGAAGCCGCGCGCGCGCTCTG 1140
AGGGCGGAGGCAGACTTAAAAACGAAAGCCAAACCCCTGGCTTGGGCGCGCGCGCAGAAC

1141 TCTGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGCTGACTGGTTTCTGTATTTGTCTGAA 1200
AGACGACGCTCTAGCAAGACACAACAGAGACAGACTGACACAAAGACATAAACAGACTTT

gag (1203, 2819) >>>

1201 ATATGGGCGAGACTGTTACUACTCCCTTAAGTTTGAACCTTAGGTUACTGGAAAGATGTGG 1260
TATACCGGCTCTGACAAATGCTGAGGGAATTCAAACTGGAATCCAGTGACCTTTCTACAGC

1261 AGCGGATCGCTCACAACCACTCGGTAGTGTGAAAGAGAGACGTTGGCTTACCTTCTGCT 1320
TGGCTTAGCGAGTGTGTCTAGCCATCTACAGTTCTTCTCTGCAACCCCAATGGAAGACGA

1321 CTGTAGAAATGCGCAACCTTTAAGCTCGGATGGCGCGGAGACCGCACCTTTAAGCGAGACC 1380
GACCTCTTACCGGTTGGAATTTGAGCCTTACCGGCTCTGCTCTGGAATTTGCTCTG

1381 TCAACACCCAGGTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCGCGCATGGACACCGAGACCGG 1440
AGTAGTGGGTCCAAATCTAGCTTCCAGAAAGTGGACCGGGGCTACCTGTGGGTCTGCTCC

1441 TCCTCTACATCGTGACCTGGGAGGCTTGGCTTTTGAACCCCGCTCCCTGGGTCAAGCCCT 1500
AGGGGATGTAGCACTGGACCTTTCGGAACCGAAACTCGGGGAGAGGACCCAGTTCGGGA

1501 TTGTACACCTTAAGCTTCGCGCTCCTCTCTCTCCATCGGCGCGCTCTCTTCCCGCTTGAAC 1560
AACATGTGGGATTCGAGGCGCGAGGAGAAAGAGCTAGGCGCGGCAJAGAGGGGGAACTTG

1561 CTCTCTCTTCAACCTCGGCTCGATCTCTCTTTATCCAGGCTTCACTCCTTCTCTAGGCG 1620
GAGGAGCAAGCTGGGCGGAGCTAGGAGGAAATAGCTTGGAGTJAGGAAAGAGTTCG

1621 CCAAACTTAACCTCAAGTTCTTTCTGACACTGGGGGCGCGCTCATCGACCTACTTACAG 1680
GTTTTGGTTTGGAAATCAAGAAAGACTGTCAACCCCGCGGAGTAGCTGGATGAATGTC

1681 AAGACCGCGCGCTTATAGGAGCCAGAGACACCCCTTCCGACAGGAGCGGAATGCTG 1740
TCTTGGGGGGGGAATATCCCTGGGTCTGCTGGGGGGAAGGCTGTCCCTGCTTACCC

1741 GAGAGCGGACCCCTGCGGAGAGGACCGGACCCCTCCCAATGGCATCTCGGCTACGTG 1800
CTCTTCTGCTGGGACCGCCCTCTCGTGGCTTGGGAGGAGGTTACCTAGAGCGGATGAC

1801 GAGAGCGGAGCGCCCTGTGGGCGGACTGCACTACCTCGGAGGCACTCCCGCTCGGCGGAG 1860
CTCTTCTGCTCGGAGGACCGGCTGAGGAGGATGAGGCTGCTAGGCGGAGGAGGCGCTC

1861 GAGGAAACGGACAGCTTCAATACTGGCCCTTCTCTCTCTTCTGACCTTACAACTTAAAA 1920
CTCTTTTCTCTCTGAGCTTATGACCGGAGAGGAGGAGAGACTGGAATGTTGACCTTT

1921 ATAAATACCTCTCTTTTCTGAGGATCCAGGTAAGCTGACAGCTCTGAGTGGAGTCTCT 1980
TATVATTGGGAGAAAAAGACTTCTAGGTTCAATTGTGCTGTGAGACTAGCTCAGACAGG

1981 TCATCAGGCAATCAGCCCACTTGGGAGAGCTGTGAGGAGCTGTGTGGGAGCTCTGCTGACCG 2040
AGTAGTGGGTAGTGGGTGAGCCCTGTGAGAGTCTGTGAGACACCCCTGAGACGAGTGGC

FIGURA 3F-7

2041 GAGAGAGAAATCAACGGGTGCTCTTAGAAGCTAGAAAGGGGTGAGGGGGGATGATGGG 2100
CTCTTCTTTTGTGTGCCCCAGGAGATCTCCGATCTTTCCGCCACGGCCCCGATATGCCCC

2101 GCGCCACTGAAACGGCCCAATGAAAGTGGATGCGCGCTTTTCCCTCTCGAGCGGCGCAGGCTGGG 2160
CGGGGTGAGTTGAGGGGTTTACTTCAGCTACGGGGAAGAGGGGAGGCTGCGGGGTCTGACCC

2161 ATTACACCACCCAGGCGAGGTAGGAACCCACCTAGTCCACGATGCGCGAGTTGCTCTAGCGGG 2220
TAATGTGGTGGGTTCCTTCATCTCTTGGTGGATCAGGTGATAGCGGTCAACGAGGATCGGC

2221 GTCTCCAAAGCGCGGGCAGAAAGCCCCACCAATTTGGCCAGGTAGAAAGGAATAACACAAAG 2280
CAGAGGTTTTCGCGCCGTCTTCGGGGTGCTTAAGACCGGTTCCATTTCTCTTATTTGCTTTC

2281 GCGCCCAATGAGTTCGCTCTGGCTTTCTTASAGAGACITAAAGGAAGGCTATCGCGGATACA 2340
CGGGTTTACTCAGAGGGAGCGCGGAGGAGTCTCTCTGAATTCCTTCGGATAGGGTCCATGT

2341 CTCTCTTGTGACCTGAGGAGCAGAGGCGAGGAACTAATGTGTCTATGCTTTTCAATTTGGC 2400
GAGGAATACTGGGACTCTCTGAGTTCGGTCTTTTGTATACATCGATACAGAAAGTAAACCG

2401 AGTCTGCCCCAGACATTGGGAGAGAGTTTAAAGAGGTTAGAGGATTTAAAAAAGCAGAGCG 2460
TCAGAGCGGGTCTGTAAACCTCTCTTCAATCTCTCCAACTCTCTAATTTTCTTCTCTGCG

2461 TTGGAGATTTGGTTAGAGAGGCTCAGAAAGCTCTTTAATTAAGGAGAGAGAGCGCGGAGAGAA 2520
AAGCTCTAAGCAAGCTCTCTCGGCTTTTCTAGAAATTAATTTCTCTTTGGGGCTTCTCTT

2521 GAGGAGAGAGCTATCAGGAG 2580
CTCTCTCTGATAGTCT

2581 AGCAGAAAG 2640
TGGTCT

2641 CT 2700
GAG

RnuI
|
Esp81
|
PspDI
| |

2701 ATCTCGAG 2760
TAG

pol(2820, 6356) >>>
|

2761 AACGAG 2820
TTGGTCT

2821 GAGGTCAGGGTCAGGAGCG 2880
CTCCAGTCCAGTCTCTCGGGGGGGGACTTGGGTCTTATTGGGAGTTTCAGCGCGCGCGGTTG

2881 CGGTACCTTCTCTGTAGATACTGGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 2940
GGCAGTGGAGGAGCATCTATGACCGCGGGTGTGAGGCACGACTGGGTTTTAGGAGCTG

2941 CCCTAAGTATAGAGTCTGCGTGGGTCCAGGGGGCTACTGGAGGAAAGCGGTATCGGTGGA 3000
GGGATTCAGTATTGAGAGCGGACCCAGGTTCCCGGATGACCTCTCTTCCGATAGAGAGCTT

3001 CCAGGGATCGCAAAGTACATCTAGCTACCGGTAAGGTCAACCACTCTTTCTCTCATGTAC 3060
GGTGGCTAGCGTTTCATGTAGATCGATGGCCATTCCAGTGGGTGAGAAAGGAGGATCATG

3061 CAGACTGTCCCTATCTCTGTAGGAGAGAGATTTGCTGACTAACTAAAAGCCGAAATCC 3120
GTCTGACAGGGATAGGAGAGAGATCTCTCTAAGAGAGTGAATTTGATTTTCGGGTTTAGG

FIGURA 3F-8

```

3121  ACTTTGAGGATCAGGAGCCACGTTATGGGACCAATGGGGCAGCCCTGCAAGTGTTCGA 3180
      TGAAGTCCCTAGTCTCTGGGTCCCAATACCCCTGGTTACCCCGTCCGGGACGTTCCACAACT

3181  CCCTAAATATAGAAGATGAGTATCGGCTACATGAGAGCCTCAAAAGAGCCAGATGTTTTCTC 3240
      GGGATTTATATCTTCTACTCATAGCCGATGTACTCTGAGAGTTTTCTCGCTCTACAAAGAG

3241  TAGGGTCCACATGGCTGTCTGATTTTCTCAGGCTTGGGCGGAAACCGGGGCGATGGGAC 3300
      ATCCGAGGTGTACCGACAGACTAAAAGGAGTCCGGACCCGCTTTGGCCCCCGTACCCCTG

      3' SS (3314)
      |
3301  TGGCAGTTCCGCAAGCTCTCTGATCATACCTCTGAAAGCAACCTCTACCCCGTGTCCA 3360
      ACCGTCAGCGGTTCGAGGAGACTAGTATGGAGACTTTTCGTTGGAGATGGGGGCAACAGT

3361  TAAACAATACCCCATGTCCCAAGAGCCAGACTGGGGATCAAGCCCCACATACAGAGAC 3420
      ATTTTGTATGGGGTACAGTGTCTTCGGTCTGACCCCTAGTTCGGGGTGTATGTCTCTG

3421  TGTGGACCCAGGGAATACTGGTACCCCTGCCAGTCCCCCTGGAACACGCCCCCTGCTACCCG 3480
      ACACCTGGTCCCTTATGACCATGGGACGGTCCAGGGGACCTTGTGGGGGACGATGGGC

3481  TTAAGAAACCAGGGACTAATGATTATAGGCTCTCCAGGATCTGAGAGAAAGTCAACAAGC 3540
      AATTCCTTTGGTCCCTGATTACTAATATCCGGACAGGTCTTAGACTCTCTTCAGTTGTTGG

3541  GGGTGGAGACATCCACCCACCGTGGCCACCCCTTACAACCTCTTGAGCGGGCTCCAC 3600
      CCCACCTCTGTAGGTGGGGTGGCACGGGTGGGAATGTTGGAGAACTCGCCCGAGGGTG

3601  CGTCCACCACTGGGTACACTGTGCTTGATTTAAAGGATGCTTTTCTGCTGAGACTCC 3660
      GCAGGGTGGTCACCATGTGACACGAACATAAATTTCTACGGAAAAAGACGGACTCTGAGG

                                     PflI
                                     |
                                     TfiI
                                     |
3661  ACCCCACGAGTCAGCCTCTCTTCGCCCTTTGAGTGGAGAGATCCAGAGATGGGAATCTCAG 3720
      TGGGGTGGTCAGTCCGAGAGAGAGCGGAAACTCACCCTCTCTAGGTCTCTACCCCTTAGAGTC

      MfeI
      |
      MunI
      |
3721  GACAATTGACCTGGACACAGACTCCACAGGGTTTCAAAAACAGTCCACCCCTGTTTGAAG 3780
      CTGTTAACTGAGCTGGTCTGAGCGTGTCCCAAGTTTTTGTGAGGGTGGGACAAACTAC

                                     MroI
                                     |
                                     BseAI
                                     |
                                     Bsp13I
                                     |
                                     BspEI
                                     |
                                     Kpn2I
                                     |
                                     AccIII
                                     |
3781  AGGCACTGCACAGAGACCTAGCAGACTTCGGATCCAGCACCCAGACTTGATCCTGCTAC 3840
      TCCGTGAGCTGTCTCTGGATCGTCTGAAGGCTTAGGTCTGTGGGTCTGAACCTAGGACGATG

3841  AGTACGTGGATGACTTACTGCTGGCCGCCACTTCTGAGCTAGACTGCCAACAGGTACTTC 3900
      TCATGCACCTACTGAATGACGACCGGGCGGTGAAGACTCGATCTGACGGTTCTTCCATGAG

```

FIGURA 3F-9

```

3901  GGGCCCTGTTACAAACCCCTAGGCAACCTCGGGTATCGGGCCTCGGGCAAGAAAGCCCAAA 3960
      CCCGGACAAATGTTTGGGATCCCTTGGAGCCCATAGCCCGGAGCCGTTCTTTCCGGTTT

3961  TTTGCCAGAAAACAGGTCAAGTATCTGGGGTATCTTTCTAAAAGAGGGTCAGAGATGGCTGA 4020
      AAACGGTCTTTGTCCAGTTCATAGACCCCATAGAAGATTTTCTCCAGTCTCTACCGACT

4021  CTGAGGCCAGAAAAGAGACTGTGATGGGGCAGCCCTACTCCGAAGACCCCTCGACAACATAA 4080
      GACTCCGGTCTTTTCTCTGACACTACCCCGTCCGATGAGGCTTCTGGGGAGCTGTTGATT

4081  GGGAGTTCCTAGGGACGGCAGGCTTCTGTCCCTCTGCAATCCCTGGGTTTGCAGAAATGG 4140
      CCTCAAGGATCCCTGCCGTCCGAAGACAGCGGAGACCTAGGGACCCAAACGCTCTTTACC

4141  CAGCCCCCTTGTACCTCTCTACCAAAAACGGGGACTCTGTTTAAATTGGGGCCAGACCAAC 4200
      GTGGGGGGAACATGGGAGAGTGGTTTTCGCCCTGAGACAAATTAACCCCGGCTCTGGTTG

4201  AAAAGGCCATATCAAGAAATCAAGCAAGCTCTTCTAACTGCCCCAGCCCTGGGGTTGCCAG 4260
      TTTTCGGATAGTTCTTTAGTTCTGTTGAGAGAAGATTGACGGGGTGGGGACCCCAACGGTC

                                     SalI
                                     |
4261  ATTTGACTAAGCCCTTTGAAGTCTTTGTGACGAGAGAGCAGGGCTACGCCAAAGGTGTCC 4320
      TAAACTGATTCGGGAACCTTGAGAAACAGCTGCTCTTCGTCCCGATGCGGTTTCCACAGG

4321  TAACGCCAAAACTGGGACCTTGGCGTTCGGCCGGTGGCCCTACCTGTCCAAAAAGCTAGACC 4380
      ATTGGCTTTTGTACCCCTGGAAACCGCAGCCGGCCACCGGATGGACAGGTTTTTCGATCTGG

4381  CAGTAGCAGCTGGGTGGCCCCCTTGCCTACGGATGGTAGCAGCCATTGCGGTACTGACAA 4440
      GTCATCGTCCAGCCACCGGGGAACGGATGCCCTACCATCGTCCGTAACGGCATGACTGTT

4441  AGGATGCAGGCAAGCTAACCATGGGACAGCCACTAGTCAATTCTGGCCCCCATGCAAGTAG 4500
      TCCTAGTCCGTTTCGATTGGTACCTGTCCGGTATCACTAAGACCGGGGGGTACGTATC

4501  AGGCACTAGTCAAACAACCCCCGACCGCTGGCTTTTCAACGCCCGGATGACTCACTATC 4560
      TCCGTGATCAATTTGTTGGGGGCTGGCGACCGAAAGGTTGCGGGCTACTGAGTGATAG

4561  AGGCCCTTGCTTTTGGACACGGACCGGGTCCAGTTCGGACCGGTGGTAGCCCTGAACCCGG 4620
      TCCGGAACGAAAACCTGTGCTTGGCCAGGTCAAGCCTGGCCACCATCGGACTTGGGCC

4621  CTACGCTGCTCCCACTGCTGAGCAAGGGCTGCAACACAAGTGCCTTGATATCTTGGCCG 4680
      GATGCGACGAGGGTGACGGACTCCTTCCCGAGGTTGTGTTGACGGAATATAGGACCGGC

4681  AAGCCGACGGAACCCGACCCGAGCTTAACGGACGAGCCGCTCCAGACGCGGACACACCT 4740
      TPCGGGTGCTTGGGCTGGGCTGGATTGCTTGGTCCGCGAGGCTCTGCGGCTGGTGTGA

4741  GGTACACGGATGGAAGCACTCTCTTACAAGAGGGACAGCGTAAGGCGGGAGCTCCGGTGA 4800
      CCATGTGCTACCTTCGTACAGCAATGTTCTCCCTGTCCCATTCGGCCCTCGACGCCACT

                                     BspI
                                     |
                                     CelIII
                                     |
                                     Bpu1102I
                                     |
                                     Bsp1720I
                                     |
4801  CCACCGAGACCGAGGTAATCTGGGCTAAAGCCCTGCTAGCCCGGACATCCGCTCAGCGGG 4860
      GGTGGCTCTGGCTCCATTAGACCGGATTTCCGGACGGTCGGCCCTGTAGGCGAGTCCGCC

4861  CTGAAGTATAGCACTCAGCCAGGCCCTAAGATGGCAGAAGGTAAGAAGCTAAATGTTT 4920
      GACTTGACTATCGTGAGTGGGTCCGGGATTTCTACCGTCTTCCATTCTTCGATTACAAA

```

FIGURA 3F-10

```

4921 ATACTGATAGCCGTTATGCTTTTGGCTACTGCCCATATCCATGGAGAAATATACAGAAGGC 4980
TATGACTATCGGCAATACGAAAAACGATGACGGGTATAGGTACCTCTTTATATGTCTTCCG

4981 GTGGGTTGCTCAGATCAGAAAGCAAGAGATCAAAAATAAAGACGAGATCTTGGCCCTAC 5040
CACCCACGAGTGTAGTCTTCCGTTTCTCTAGTTTTTATTTCTGCTCTAGAACCCTGGATG

5041 TAAAAGCCCTCTTTCTGCCCBAAGACTTAGCATTAATCCATTGTCCAGGACATCAAAAGG 5100
ATTTTCGGGAGAAAGACGGGTTTCTGAATCGTATTAGGTAACAGGTCCCTGTAGTTTTCC

5101 GACACAGCGCCGAGGCTAGAGGCAACCGGATGGCTGACCAAGCGGGCCCGAAAGGCAGCCA 5160
CTGGTCTCGCGCTCCGATCTCCGTTGGCTACCGACTGGTTGCGCCGGGCTTTCCGTCGGT

5161 TCACAGAGACTCCAGACACCTCTACCCCTCCTCATAGAAAATTCATCACCTACACCTCAG 5220
AGTGTCTCTGAGGTCTGTGGAGATGGGAGGAGTATCTTTAAAGTAGTGGGATGTGGAGTC

5221 AACATTTTCATTACAGTGAAGTATATAAAGGACCTAACCAAGTTGGGGGCCATTTATG 5280
TTGTAAAATAATGTCTCACTGACTATATTTCCCTGGATTGCTTCAACCCCGGTAAATAC

5281 ATAAAACAAAGAAGTATGGGTCTACCAAGGAAAACCTGTGATGCCTGACCAAGTTTACTT 5340
TATTTTGTCTTTCATAACCCAGATGGTTCCCTTTGGACACTACGGAAGTGTCAAATGAA

5341 TTGAATTATTAGACTTTCTTCATCAGCTGACTCACCTCAGCTTCTCAAAAATGAAGGCTC 5400
AACTTAATAATCTGAAGAAGTACTGCACTGAGTGGAGTGAAGAGTTTTTACTTCCGAG

5401 TCCTAGAGAGAAGCCACAGTCCCTACTACATGCTGABCCGGGATCGAACACTCAAAAATA 5460
AGGATCTCTCTTCGGTGTGAGGATGATGTACGACTTGGCCCTAGCTTGTGAGTTTTTAT

5461 TCACTGAGACCTGCAAGGCTGTGTCACAAAGTCAACGCCAGCAAGTCTGCCGTAAACAGG 5520
AGTGAAGTCTGGAGCTTTCGAACAGGTGTTTCAAGTTGCGGTCTGTTCAAGACGGCAATTTGTCC

SacII
|
SgrBI
|
Cfr42I
|
Sfr303I
|
KspI
|
5521 GAACTAGGGTCCGCGGGCATCGGCCCGGCACTCATTTGGGAGATCGATTTTCAACGAGATAA 5580
CTEGATGCCAGGCGCCCGTAGCCGGGGCGTGAGTAACCTCTAGCTAAAGTGGCTCTATT

5581 AGCCCGGATTGTATGGCTATBAATATCTTCTAGTTTTTATAGATACCTTTTCTGGCTGGA 5640
TCGGGCTTAACATACCGATATTTATAGAAGATCAAAAATATCTATGGAAAAGACCGAAGCT

5641 TAGAAGCTTTCCCAACCAAGAAAGAAAACCGCCAGGTCGTAACCAAGAAGCTACTAGAGG 5700
ATCTTCGGAAGGGTTGGTTCTTTCTTTGGCGGTTCCAGCATTGGTTCTTCGATGATCTCC

PaeI
|
EbuI
|
SphI
|
SphI
|
5701 AGATCTTCCCGAGGTTCCGGCATGCTCAGGTATTGGGAAGTGAACAATGGGCTGCTTCG 5760
TCTAGAAGGGGTCCAAGCCGTACGGAGTCCATAACCTTGAAGTGTACCCGGGACGGAAAGC

```

FIGURA 3F-11

5761 TCTCCAGGTTGAGTCAGACAGTGGCCGATCTGTTGGGGATTGATTGGAAATTACATTGTC 5820
AGAGGTTCCACTCAGTCTGTCCGCGCTAGACAACCCCTAAGTAACCTTTAATGTAACTAC

5821 CATACAGACCCCAAGCTCAGGCCAGGTAGAGAAGATGAATAGAACCATCAAGGAGACTT 5880
GTATGCTCTGGGCTTTCGASTCCGGTCCATCTTCTTACTTATCTTGGTAGTTCCTCTGAA

5881 TAACTAAATTAACGCTTSCARCTGGCTCTAGAGACTGGGTGCTCCTACTCCCTTTAGCCC 5940
ATTGATTTAATTGCGAAGGTTGACCGAGATCTCTGACCCACGAGGATGAGGGGAATCGGG

SE11
|

5941 TGTACCGAGCCCGCAACACGCCGGGCCGCCCATGGCCCTCACCCCATATGAGATCTTATATG 6000
ACATGGCTCGGGCGTTGTGCGGCCCGGGGTTACCGGAGTGGGGTATACTCTAATAATATAC

6001 GGGCACCCCGCCCTTTGTAAACTTCCCTGACCTGACATGACAASAGTTACTAACAGCC 6060
CCCGTGGGGCGCGCAACATTTGAAGGAGACTGGGACTGTACTGTTCTCAATGATTGTCCG

6061 CCTCTCTCCAGCTCACTTACAGGCTCTCTACTTACTGACGACGAGGCTCTGGAGACCTC 6120
GGAGAGAGGTTCCGASTGAATGTCCGAGAGATGAATCAGGCTCTGCTTCAGACCTCTGGAG

6121 TGGGGGAGCCCTACCAAGAACAACCTGGACCGACCGGTGGTACCTCACCTTACCGAGTGG 6180
ACCGCCGTCGGATGGTTCTTGTGACCTGGCTGGGCCACCATGGAGTGGGAATGGCTCAGC

6181 GCGACACAGTGTGGGTCCCGGACACCGAGCTAAGAACTAGAACTCTGGCTGGAGAGGAC 6240
CGCTGTGTACACCCAGGCCGCTGTGGTCTGATTCTTGGATCTTGGACCGACCTTTCCTG

6241 CTTACACAGTCTCTGCTGACCCACCCACCGGCTCAAACTAGACGGCATCGCAGCTTGA 6300
GAATGTGTCTCAGGACGACTGGTGGGGGTGGCGGGAGTTTCATCTGCCGTAGCGTCGAACCT

4670A chr (6259-8323) >>>
|

6301 TACACGCGCGCCACGTTGAAGGCTGCCGACCCCGGGGTGGACCTATCCTCTAGACTGACCT 6360
ATGTGCGGCGGGTGCACCTCCGACGGCTGGGGCCCCCACCTGGTAGGAGATCTGACTGTA

6361 GGGCGGTTCACGCTCTCAAAACCCCTCAAGAAAGATTAACCCCTGGAAGCCCTTAAT 6420
CCGGCAGATTCGAGAGATTTTGGGGGAGTTCTATTCTAATGGGACCTTCGGGAATTA

6421 AGTCAGGGAGTCTTGTTCGGGTAGGGAGGGCAGAGGCCCCATCAGGCTTTTAAATGT 6480
TCATACCTCTACGACATCTCTCTCCCTACCTCTCTCGGGGCTGCTCAGAAATTACA

6481 AAGCTGACACTCACCAACCTGATGACTGGGCTACCCGCAATGCCACCTCCCTCTCCG 6540
TTGGACTCTGATGGGTGGGCTACCTGACCCCATGGGCTTACGGTGGAGGGAGGACCG

6541 AACTGTACAGAGAGGCTTCCCAAGATTATTTTGAATATGTAATCTGTAATCTGTCGAGGGA 6600
TTCACATGTTCTACGAGAGGCTTTAATATATAAATCAGATACCTAGACGAGCTCTCTCT

6601 GTGGGACCTTCAGACCGGACCTGATTTCCGGCTATGCTGCAATACCTCCGACGGAG 6660
CAGCTTCGGAGCTCTGGTCTCTGCCAATGACCCCATACCCAGCTTCATGGGGCTCTCTC

6661 ACAGCGGNCCTGGACTTTTGGCTTTTACGTGTCTCTGGGCTATACCTAAGTCCGGGCTG 6720
TGTCTCTGGGCTTGAAGCTGAAATGCAATGAGGAGCTGATGGGCTATTTGAGCTTCTAGCT

6721 TGGGGGACCAAGGAGGCTTACTGTGTAAATGCGGGTGTGAATGACCGGACAGGCTTA 6780
ACCCCTGGGCTCTCTCCGATGACACCACTTACCCCTACACTTTGGTGGCTGTCTGAGT

6781 CTGAGAGGCCACATCATCTGTGGACCTAATCTTCCTTAACTGCGGTACACCCCTGGA 6840
GACCTTCGGCTGTAGTGTGCTCTGCAATGAGAGGAATTCGCGCATTTGTGGGAGCTCT

6841 CAGCGATGCTTAAATTTCTGTGTGGTCTGCTACGACCTCTCAAACTATCAATTC 6900
CTGGCTGATGAGATTTTAACTGACACCCCGGATGATCTGAGAGGTTTCTATAGCTTAA

FIGURA 3F-12

ES 2 709 481 T3

6961 CTTCFRAGGGGCTACTTCGAGGGGGCAGATGCAACCCCTCTAGTCTTAAATTCATCTATGC 6960
 GAAGCTTCCCCGATGASCTCCCCCGTCTACCTTGGGAGATCAGGATCTTAAGTGACTACG
 7061 AGCAAAAAAGGCTAACTGGGACGGGCCCCAATTCGTGGGGACTGAGACTTATACCGGACAGG 7020
 TCTTTTTTTCGATTGACCGCTGCCCCGGGTTTAGCACCCTTGACTCTGACATGGGCTGTGC
 7161 AACAGATCTCTTTACCATGTTCTCCCTGACCCGFCAGGTCTTTAATGTGGGACCCGAGAT 7160
 TTGTCTAGGATAATGGTACAAGAGGGACTGGGCGCTCCAGGATTTACACCTGGGGCTCA
 7261 GGGCATAGGGGCCCCAACCCAGTATTACCCGACCAAAAGACTCCCTTCCTCACCATTAGAGAT 7140
 GGGGATCCCCGGGTTGGGTCATAATGGGCTGCTTCTCAGGGGAAGGAGTGGTTATCTCTA
 7361 TGTACCGGCTCCACAGGCACTTAGCCCCCTCAATACCAGTTACCCGCTTGCACTTACCAG 7200
 ACATGGCGGAGGTGTCTGGTGGATCGGGGAGCTTATGCTCACTGGGGGAAGGTGATGCTC
 7461 TACACCTCTAACCCTCCCTTACAGTCCAGTGTGTCCACAGGCCACCCCGAGGAAGTGGAGA 7260
 ATGTGGGAGTTGGAGGGGATGTTCAAGTTTACAGGGGTGTGGTGGGGGCTTCTTGACTCT
 7561 TAGACTACTAGCTCTAGTCAAGAGGAGCTATCGGGGCTTAACTTACCCATCCCGACAA 7320
 ATCTGTATGATCGAGATCACTTCTCTGGATAGTCCGGGATTTGAGTGGTTAGGGCTGTT
 7661 GACGGAAGATGTGTGGTGTCTTATGCTCGGAGCTCTTATTAGGAGGAGTACCGGT 7380
 CTGGGTTCTTACAGCCGACACGATATCAGAGCCCTGGAGGAGATATGCTTCTCATCGCA
 7761 CGTGGGCACTTATACCAATCATTCACACCGCTCCGGGCAACTGTACGGGCACTTCCCAACA 7440
 GCACCGCTCAATATGGTTAGTAAAGTGGCGAGGCGGCTTGACATGCGGGTGAAGGGTGT
 EcoRI
 |
 NsiI
 |
 MphI1931
 |
 LspII
 |
 BfrBI
 ||
 7441 TAAGCTTACCTTATCTGAGTGAACAGGACAGGGGCTATGCAATGGGGGAGTACCTAAGAC 7500
 ATTCGATGGGATAGACTTCAGTGTCTCTGCGGATAGGTAACCCGCTCATGGATTTTG
 NaeI
 |
 PstI
 |
 NcoNI
 ||
 NqoMIV
 ||
 7501 TCACCAAGGCTTATGTACAGCACCCTCAAGGCGCTCGGCTCAGGATCTTACTACCTTGCAGC 7560
 AGTGGTCCGATACATTTGTGCTGGGTTTCGCGGCCAGTCTTAGGATGATGGAGCTGC
 AseI
 |
 OsiI
 |
 7661 ACCGCGCGGACCAATGTGGGCTTGCAGGACTGGATTAAGTCCCTGCTTGTCCAGCGCGGT 7620
 TGGCGGCGCTTGTATACACCGAAGCTCTGACCTTACTGAGGAGCAAGACAGGTGGTCCCA
 7761 GCTCATGTCAACACAGATTATGTGTATTAGTTGAACTCTGGGCCAGAGTAATTTACCA 7680
 CAGATTAGATTGGTGTCTAAATACACATAATCACTTGAGAGCGGGTCTCATTAATGTT

FIGURA 3F-13

ES 2 709 481 T3

```

7681 CTCCCCGATTATATGTATGGTCAGCTTBAACAGGCGTCCAAATATAAAAGAGAGCCCACT 7740
GAGGGGGGCTAATATACATACCACTCGAAGCTGCTGGCTGGTTTATATTTCTCTCGGTCGA

7741 ATGATTTBACCTTGGGCTTCTTACTAGGAGGATTAACCTTGGGAGGGATTGCACTGGGAT 7800
TACTAATGCGGACCGGGAGATGATCTCTCTAATTGGTACCTTCCCTTAACTTCGACCTTA

7801 AAGGACGCGGACCCACTTCCCTTAATTAATAACCCAGGAGTTTGGGACAGCTTCATGCCGCTAT 7860
TCCCTGCCCCCTGGTGACGGAAATTAATTTTGGGCTGCTCAAACTCGTGGAGATACCGGAGATA

7861 CCAGACAGGACCTCAGCGAAGTGGAGGAGTCAATTTACGACCTTGGAAAAAGTCACTGACCTC 7920
GGCTCTGCTTGGAGTTGCTTCAGCTTTTTCAGTTTATGGTTGGATCTTTTCAGTCACTGGAG

7921 GTTGTCTGAAGTAGTCTTACAGAACCTGAGAGGCTTAGATTTCCTATTCTTAAAGGAGGG 7980
CAACAGACTTCATCAGGATCTCTTGGGCTCTCCGATCTTAAAGGATAGGAAATTTCTCTCC

7981 AAGGCTCTTGGGACGCTTAAAGAGAGATGTTTGTTTTATGCGAGACACACCGGGCTAGT 8040
TCCAGAGACCGCTCGGATTTTCTTCTTACAAACAAAATACGCTCTGGTGTGCCCCGATCA

8041 GAGACACAGCATGGCCAAATTAAGAGAGAGGCTTAATTCAGAGACAAAAATATTTGAGAGC 8100
CTCTCTCTCTGATCCGCTTAAATTCCTTTCCGATTTAGTCTCTGTTTTTATTAAGTCTCTG

```

NspV
|
BstBI
|
Bsp119I
|
AclII
|
Csp45I
|
SfuI
|
Bgl16I
|
BspT104I
|

```

8101 AAGCCAGGATGGTTGGAGGGCTGTTTAAAGATCCCCCTGGTTTACCAGCTTAACTCTC 8160
TCCGGTTCTTACCAAGCTTCCGACAAATTATCTAGGGGGACCAAAATGGTGGATTTAGAG

8161 CAGCATCATGGGACCTCTAAAGTACTCTTACTGATCTTACTCTTTGGACCTTGCATTCT 8220
GTGCTATACCTGGAGATTATCATGAGAAATGACTACGATGAGAAACCTGGAACTAAGA

8221 CATCTGATTGGTCCATTTGTTAAAGACAGGATCTCAGTGGTCCAGGCTCTGGTTTTGAC 8280
GTTAGCTAACCAGTTAAACAATTTCTGCTCTAGAGTCACCAAGCTCCGAGACCAAACTG

```

Ikes reg(8327,8376)>>>
|
MluI (8325)
| |

```

8281 TCAGCAATATCAGCAGCTAAAGCCATAGAGTACGAGCCATGACCGCTTACTGGCCGAA 8340
AGTGGTATAGGCTGGATTTGGGTATCTCATGCTGGTACTTGGCGAATGACCGGCTT

```

Ikes_ensv reg(8378,8376)>>>
|

```

8341 GCGGCTTGCATTAAGGCGCTGCTGCTTTCTCTATATCTTATTTTCCACCATATTGCGCT 8400
CGGCGAATCTTATTCGGGACACAGCGCAACGATATACAAATTAAGGTTGTTAAGCGCA

8401 CTTTTGGCAATGTAGGGGCGCGCAAACTGCGCTCTGCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGG 8460
GAAAAAGGTTACACTCCCGGCGCTTTGGAGCGGGACGAGAGAGCTGCTCTTAAGGATCCG

```

FIGURA 3F-14

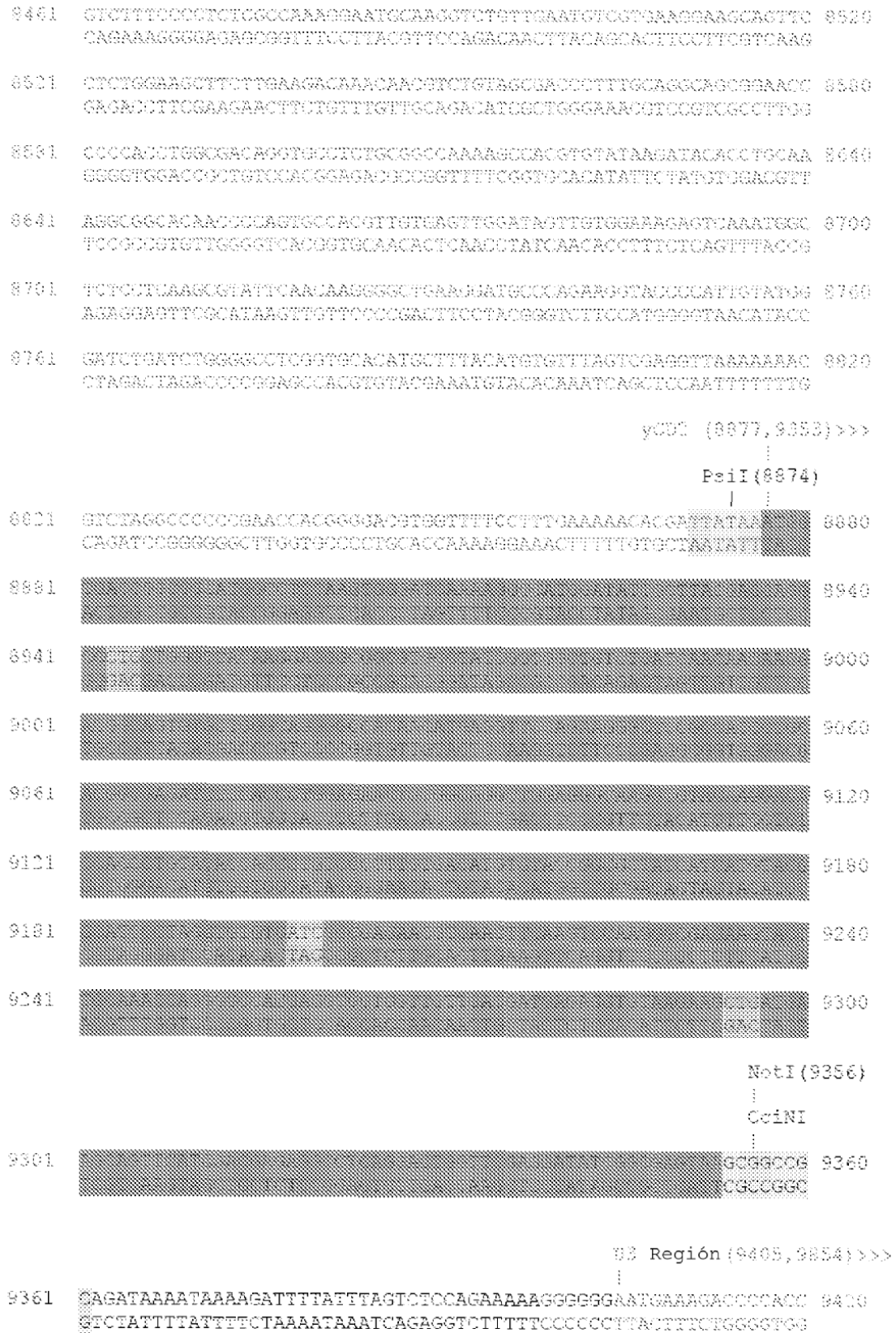


FIGURA 3F-15



FIGURA 3F-16

10201 GCTTACCGGATACTGTCCGCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAAGGCTC 10260
CGAATGGCCTATGGACAGCGCGGAAAGAGGGAAGCCCTTCGCACCGCGAAAGAGTATCGAG

10261 ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGTTCGCTTCGCTCCAAAGCTGGGCTGTGTSCACGA 10320
TGCACATCCATAGAGTCAAGCCACATCCASCAAGCGAGTTCCSACCCGACACACGCTGCT

10321 ACCCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGGCGCTTATCCGGTAAGTATCGTCTTGAGTCCAAACC 10380
TGGGGGGCAAGTCCGGCTGGCGACGCGGAATAGGCCATTGATAGCAGAACTCAGGTTGGG

10381 GGTAAACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAG 10440
CCATTCTGTGCTGAATAGCGGTGACCCTCGCTCGGTGACCAATGTCCTAATCGTCTCGCTC

10441 GTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTTGTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAG 10500
CATACATCGGCCACGATGTCTCAAGAACTTCACCCACCGGATTGATGCCGATGTGATCTTC

10501 GACAGTATTTGGTATCTCGGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG 10560
CTGTCCATAAACCATAGACGGCGAGACGACTTCGGTCAATGGAAGCCTTTTTCTCAACCATC

10561 CTCTTCATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTTGCAAGCAGCA 10620
GAGAAGTACGGCGCTTTGTTTGGTGGCGACCATCGCCACCAAAAAACAAACGTTGCTCGT

10621 GATTACGGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTCTGA 10680
CTAATGCGCGCTTTTTTTTCTAGAGTTCTTCTAGGAAACTAGAAAAAGATGCCCCAGACT

10681 CGCTCAGTGGAAACGAAACTCAAGTTAAGGCGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAAGGAT 10740
GCGAGTCACCTTGCTTTTGAGTGCATTCCTTAAACCAGTACTCTAATAGTTTTTCTTA

10741 CTTACCTTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGA 10800
GAAGTGGATCTAGGAAAAATTTAATTTTACTTCAAAATTTAGTTAGATTTCTATATATACT

marcador amp (10819, 11679) <<<

10801 GTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG 10860
CATTTGAACCAGACTGTCAATGGTTACGAATTAGTCACTCCGTGGATAGAGTCGCTAGAC

10861 TCTATTTCTGTTCCATCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGA 10920
AGATAAAGCAAGTAGGTATCAACGGACTGAGGGGACAGCATCTATTGATGCTATGCCCT

10921 GGGCTTACCATCTGGCCUCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCC 10980
CCCGAATGGTAGACCGGGCTCAGGACGTTACTATGGCGCTCTGGGTGCGAGTGGCGAGG

10981 AGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCCGAGAAGTGGTCTCTCAAC 11040
TCTAAATAGTGTATTTGGTCCGCTTCGCCCTTCCCGGCTCGCGTCTTCACCAGGACGTTG

11041 TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGC 11100
AAATAGGCGGAGGTAGGTCAGATAATTAAACAACGGCCCTTUGATCTCATTCATCAAGCGG

11101 AGTTAATAGTTTGGCCAAAGTTGTTGCCAATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTC 11160
TCAATTATCAAAACGCTTGCAACAACGGTAACGACGTCGGTAGCACCACAGTGGGAGCAG

11161 GTTGGGTATGGCTTCATTGAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCC 11220
CAAACCATACCGAAGTAAGTCGAGGCCAAGGGTTGCTAGTTCCGCTCAATGTACTAGGGG

11221 CATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGTCTCTTGGGTCCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTT 11280
GTACAACACGTTTTTTTCCCAATCGAGGAAGCCAGGAGGCTAGCAACAGTCTTCATTCAA

11281 GGGCGCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCC 11340
CCGGCGTCACAATAGTGAGTACCAATACCGTCTGTGACGTATTAAGAGAATGACASTACGG

11341 ATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG 11400
TAGGCATTCTACGAAAAGACACTGACCACTCATGAGTTGGTTCAGTAAGACTCTTATCAC

FIGURA 3F-17

```

11401 TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAG 11460
      ATACGCGCGTGGGTCAACGAGAACGGGCGCGAGTTGTGCCCTATTATGGCGCGGTGTATC

11461 CAGAACTTTAAAAGTGTCTCATTCATTGGAAAAAGTTCTTGGGGGCGAAAACTCTCAAGGAT 11520
      GTCTTGAAATTTTACGAGTAGTAACCTTTTGCAAGAAGCCCCGCTTTTGAGAGTTTCTA

11521 CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGC 11580
      GAATGGCGACAACTCTAGGTCAAGCTACATTGGGTGAGCACGTGGGTGACTAGAAAGTCG

11581 ATCTTTTACTTTCAACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAA 11640
      TAGAAAATGAAAGTGGTTCGCAAGACCCACTCGTTTTTGTCTTCCGTTTTACGCGGTTT

11641 AAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTA 11700
      TTTCCCTTATTTCCCGCTGTGCTTTTACAACCTTATGAGTATGAGAAGGAAAAAGTTATAAT

      promotor amp(11721,11749)<<<
      |
11701 TTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAA 11760
      AACTTCGTAAATAGTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAAATCTT

11761 AAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGA 11820
      TTTATTTGTTTATCCCCAAGGCGGTGTAAAGGGGCTTTTACGGTGGACTGCAGATTCT

11821 AACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCTCT 11880
      TTGGTAATAATAGTACTGTAATTGGATATTTTTATCCGCATAGTGTCTCCGGGAAAGCAGA

11881 TCAAGAATTCAT 11893
      AGTTCTTAAGGTA
  
```

FIGURA 3F-18

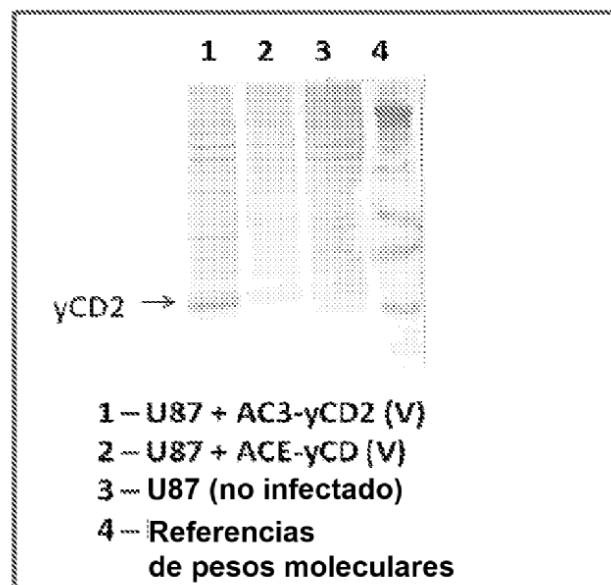


FIGURA 4

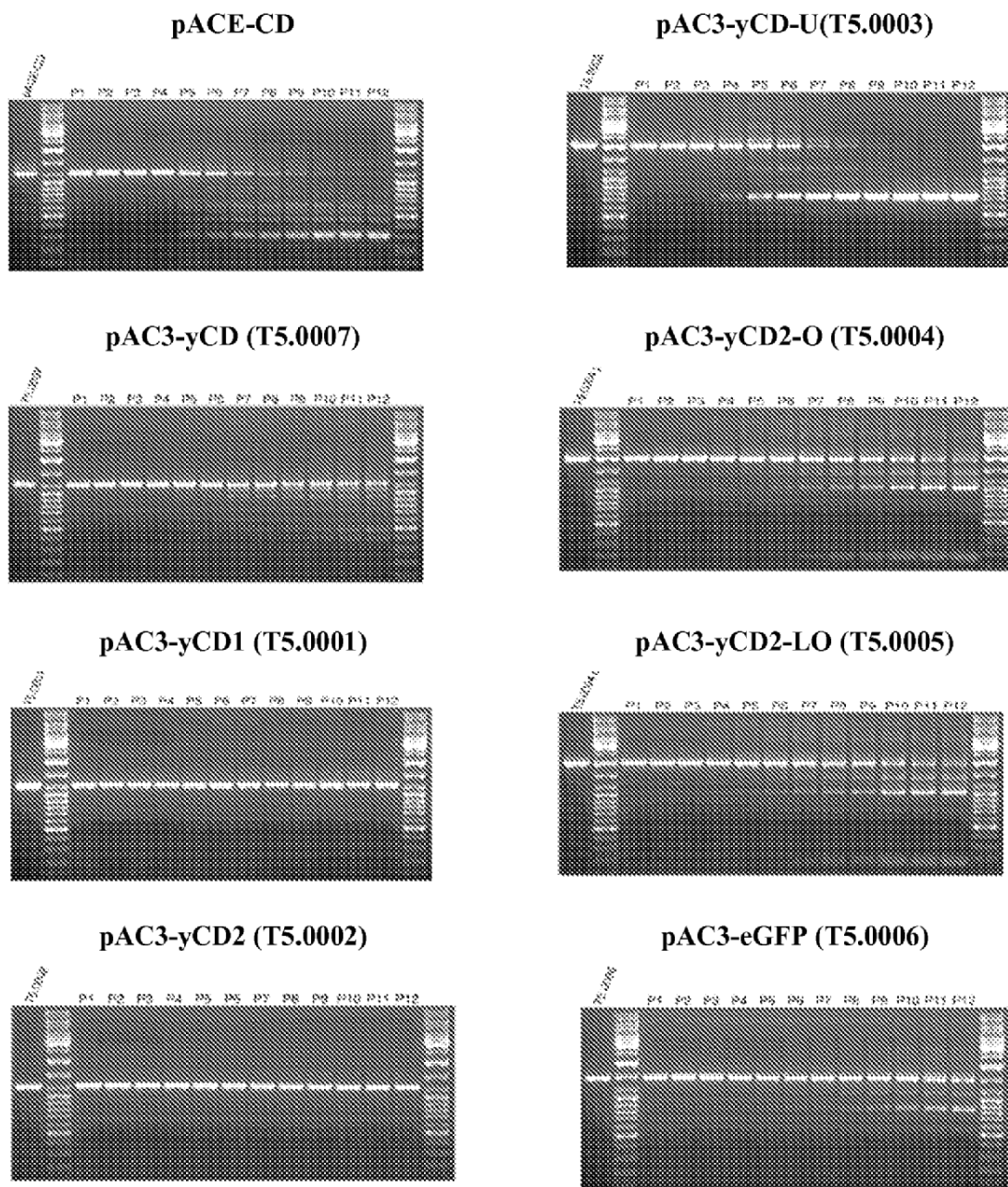


Figura 5

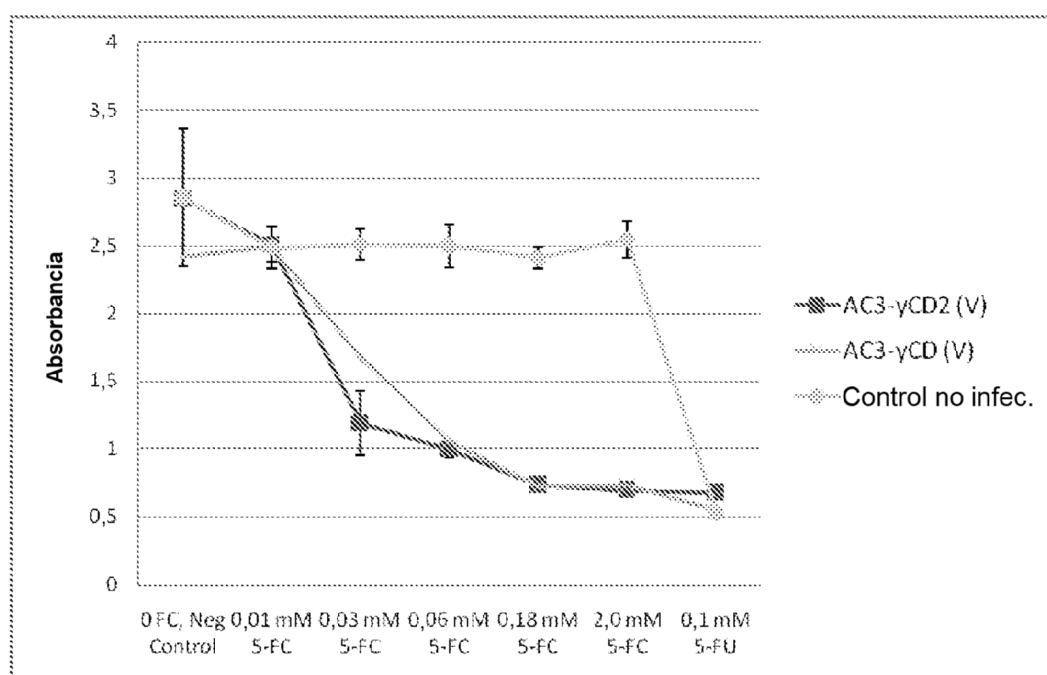


FIGURA 6A

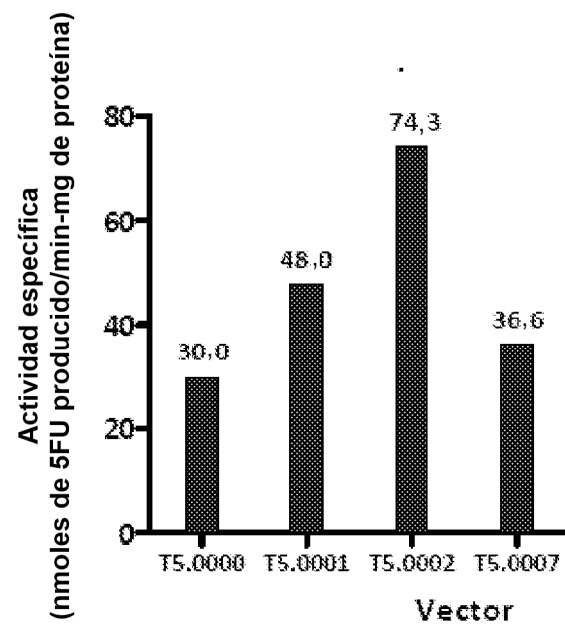


Figura 6B

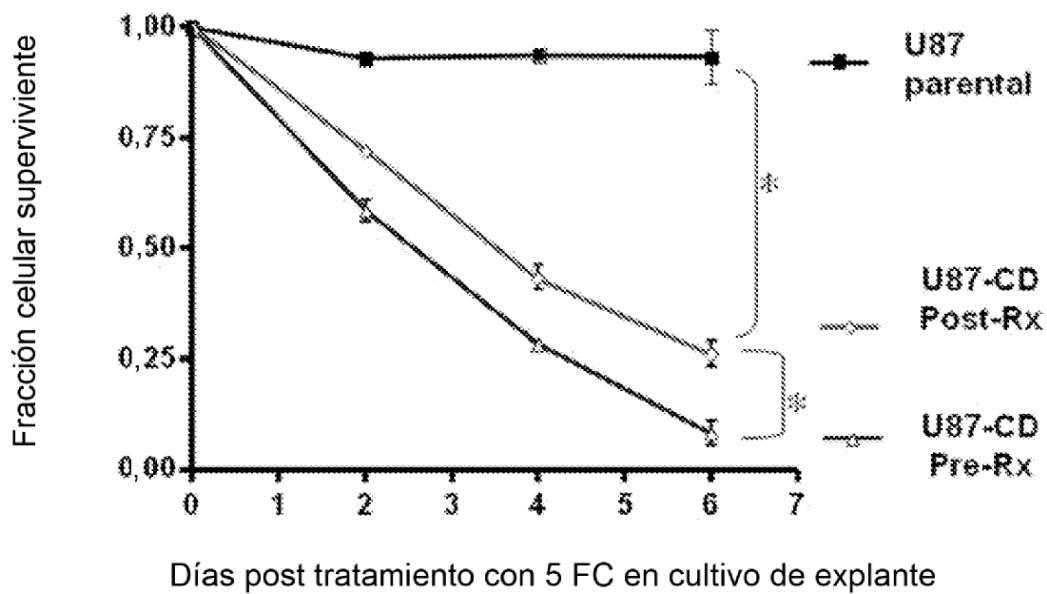


FIGURA 7

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

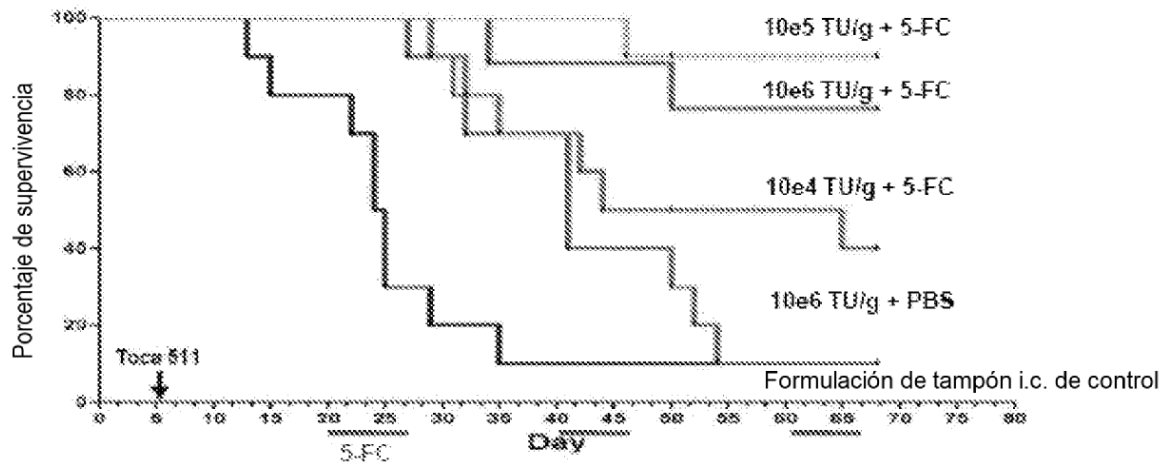


FIGURA 8

Modelo intracraneal singénico en BALB/c CT26 – 10 animales/grupo

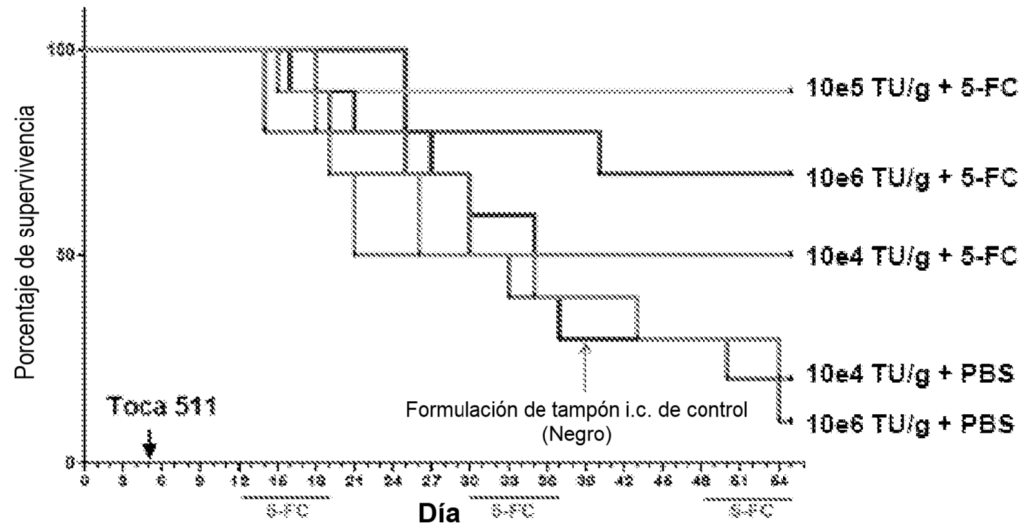
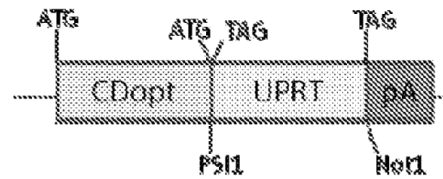


FIGURA 9

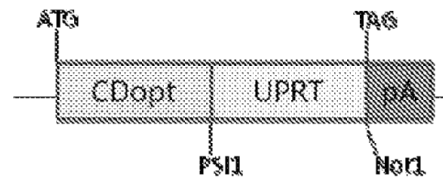
1. Síntesis separada de genes CDopt y UPRT con los sitios PSI1/Not1



2. Digestión con PSI1 y realización de la ligadura de extremo truncado



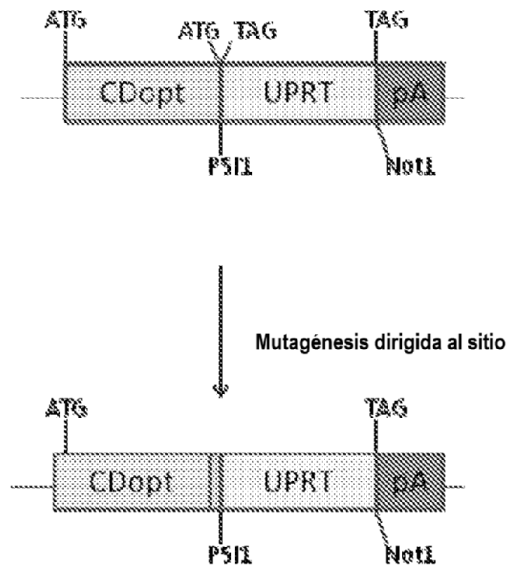
3. Eliminación del codón de PARADA del gen CDopt y de INICIO de UPRT por mutagénesis dirigida al sitio



3. Tamaño del gen CDopt-UPRT: 1,3 kb

FIGURA 10A

1. Síntesis de CDopt-ENLAZADOR-UPRT: Inserción del enlazador por mutagénesis dirigida al sitio



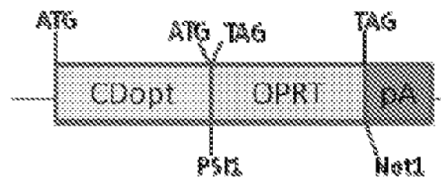
2. Tamaño del gen CDopt-Enlazador-UPRT: 1,36 kb

FIGURA 10B

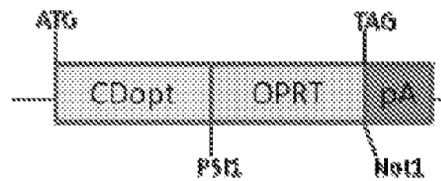
1. Síntesis separada del gen CDopt y el dominio OPRT con los sitios PS1/Not1



2. Digestión con PS1 y realización de la ligadura del extremo truncado



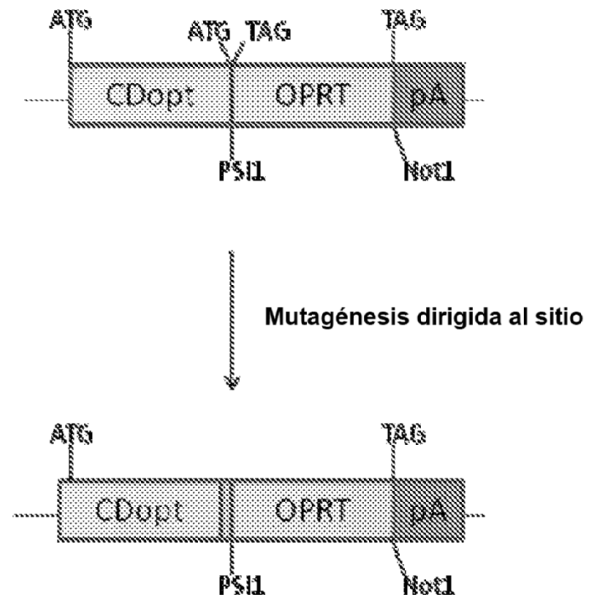
3. Eliminación del codón de PARADA del gen CDopt y de INICIO de OPTR por mutagénesis dirigida al sitio



4. Tamaño del gen CDopt-OPRT: 1,3 kb

FIGURA 10C

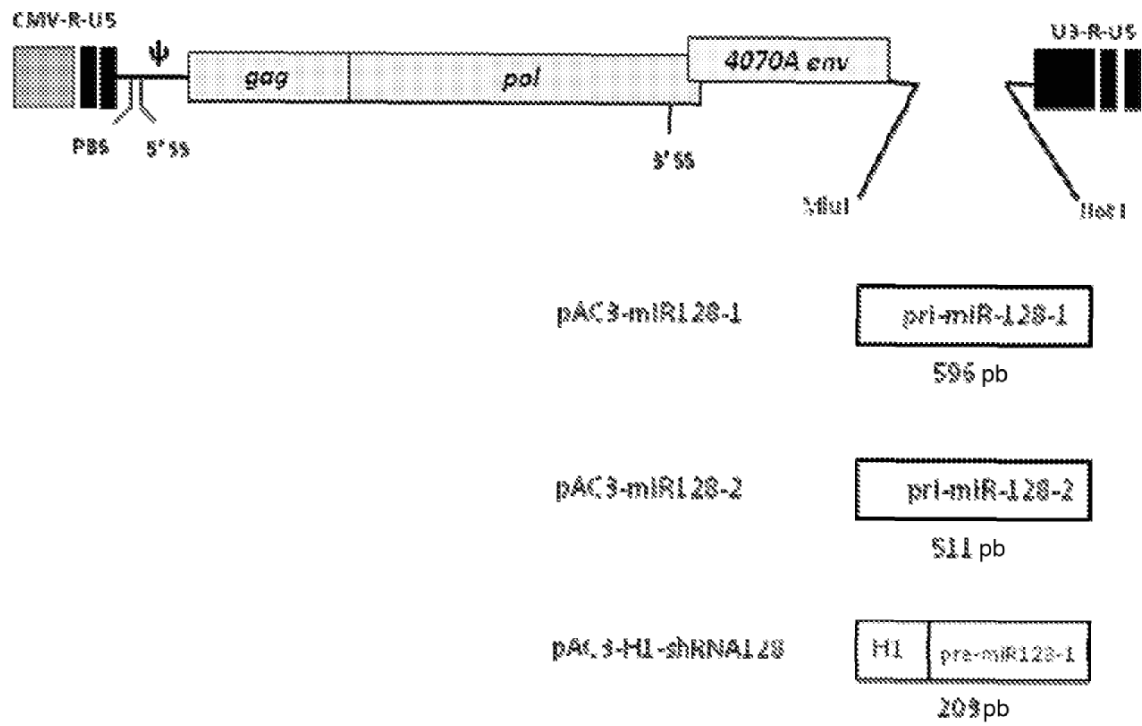
1. Síntesis de CDopt-ENLAZADOR-OPRT: Inserción del enlazador por mutagénesis dirigida al sitio



2. Tamaño del gen CD-OPRT: 1,33 kb

FIGURA 10D

A



B

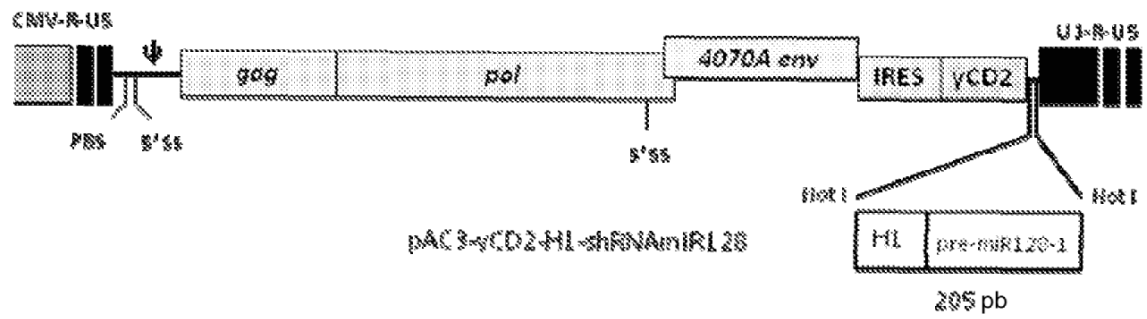
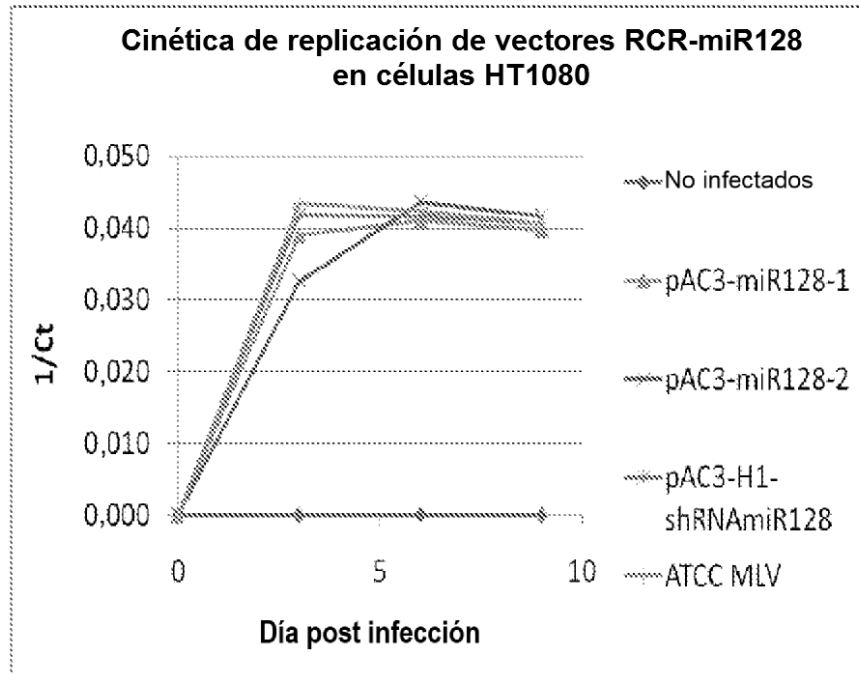


FIGURA 11

A



B

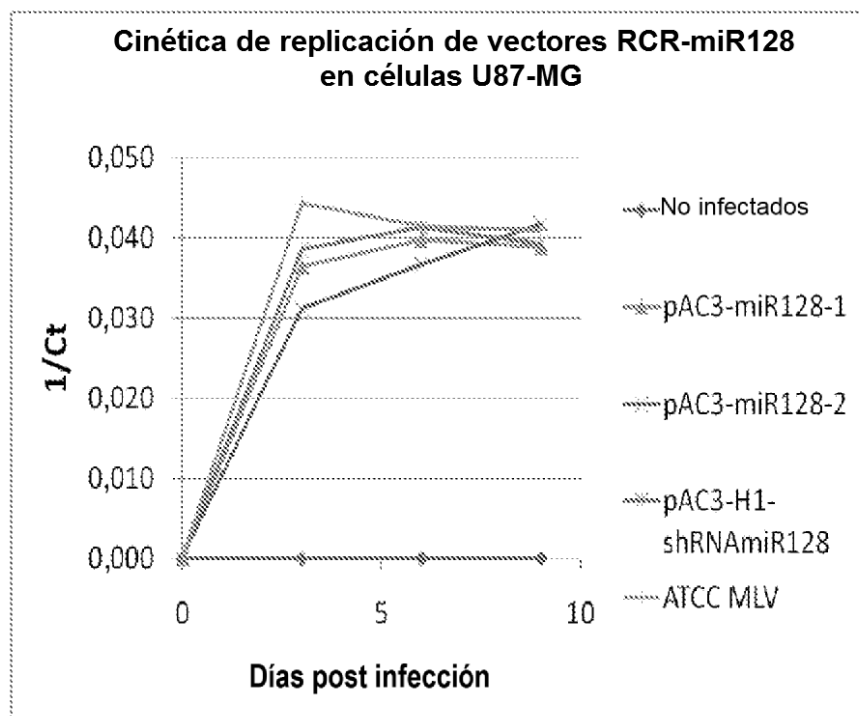


FIGURA 12

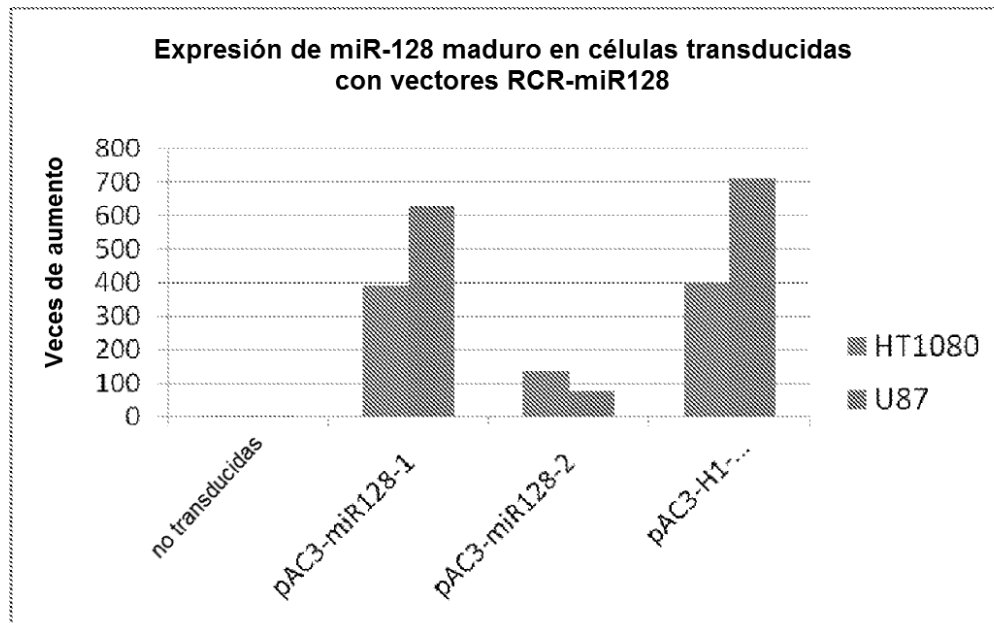


FIGURA 13

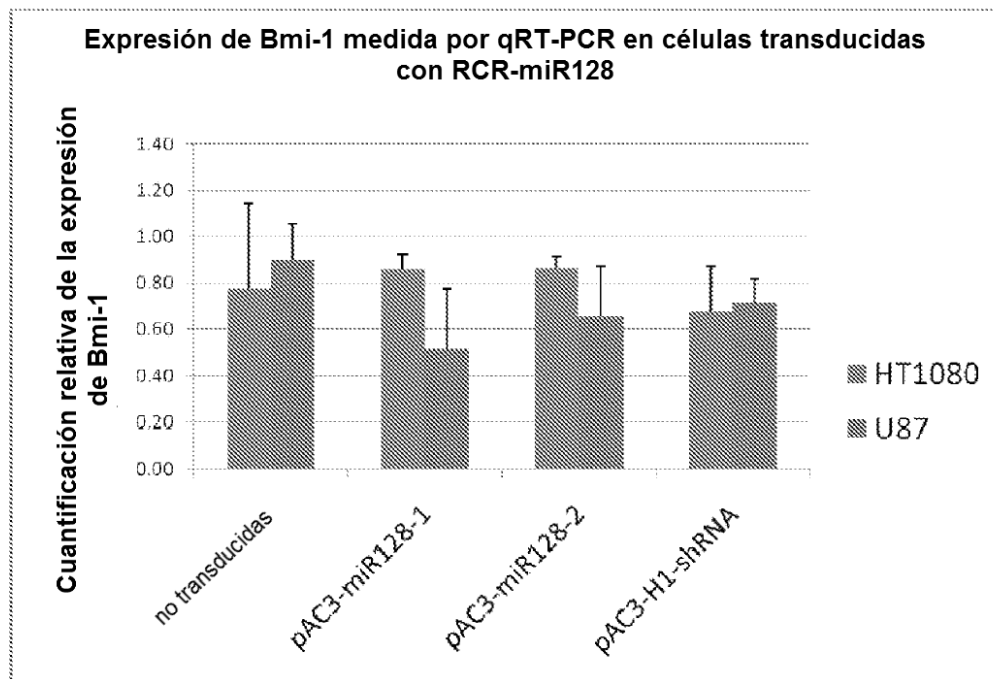


FIGURA 14

pAC3-*emc*-142-3pT Vectors

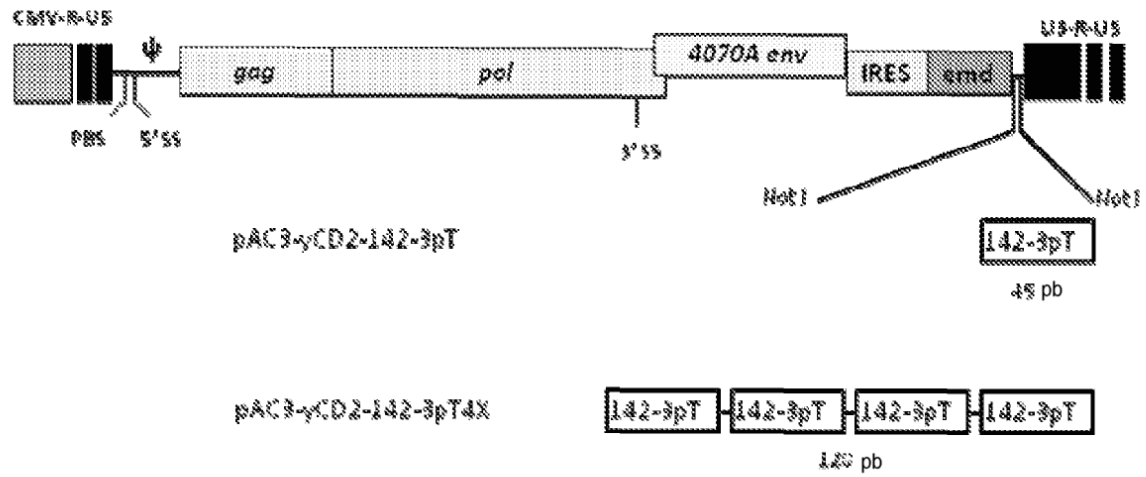


FIGURA 15

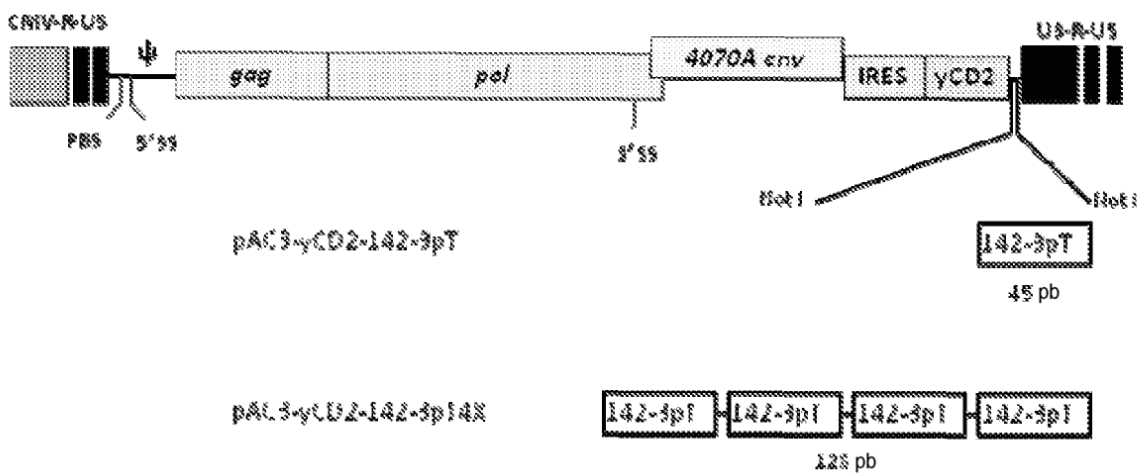


FIGURA 16

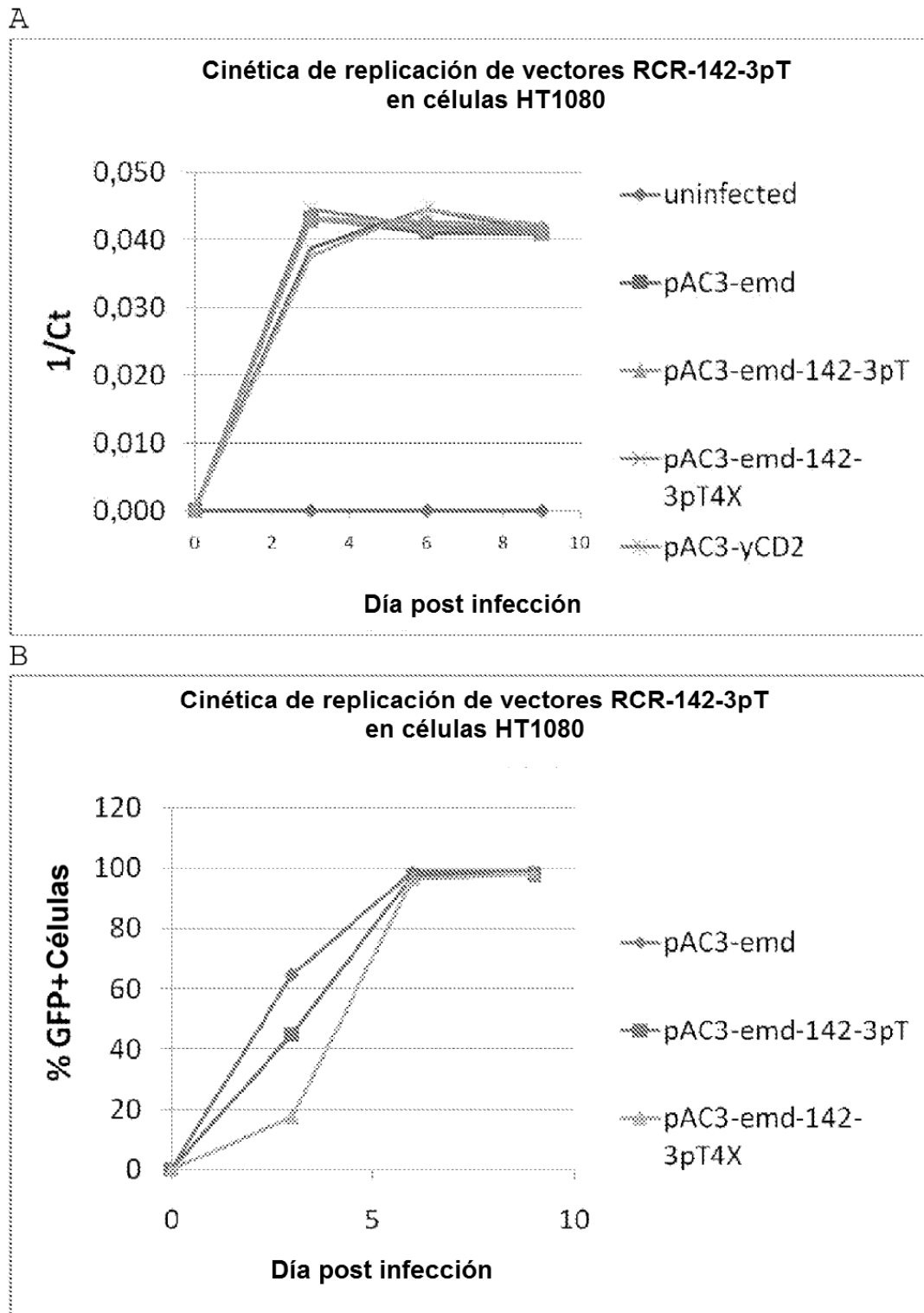


FIGURA 17

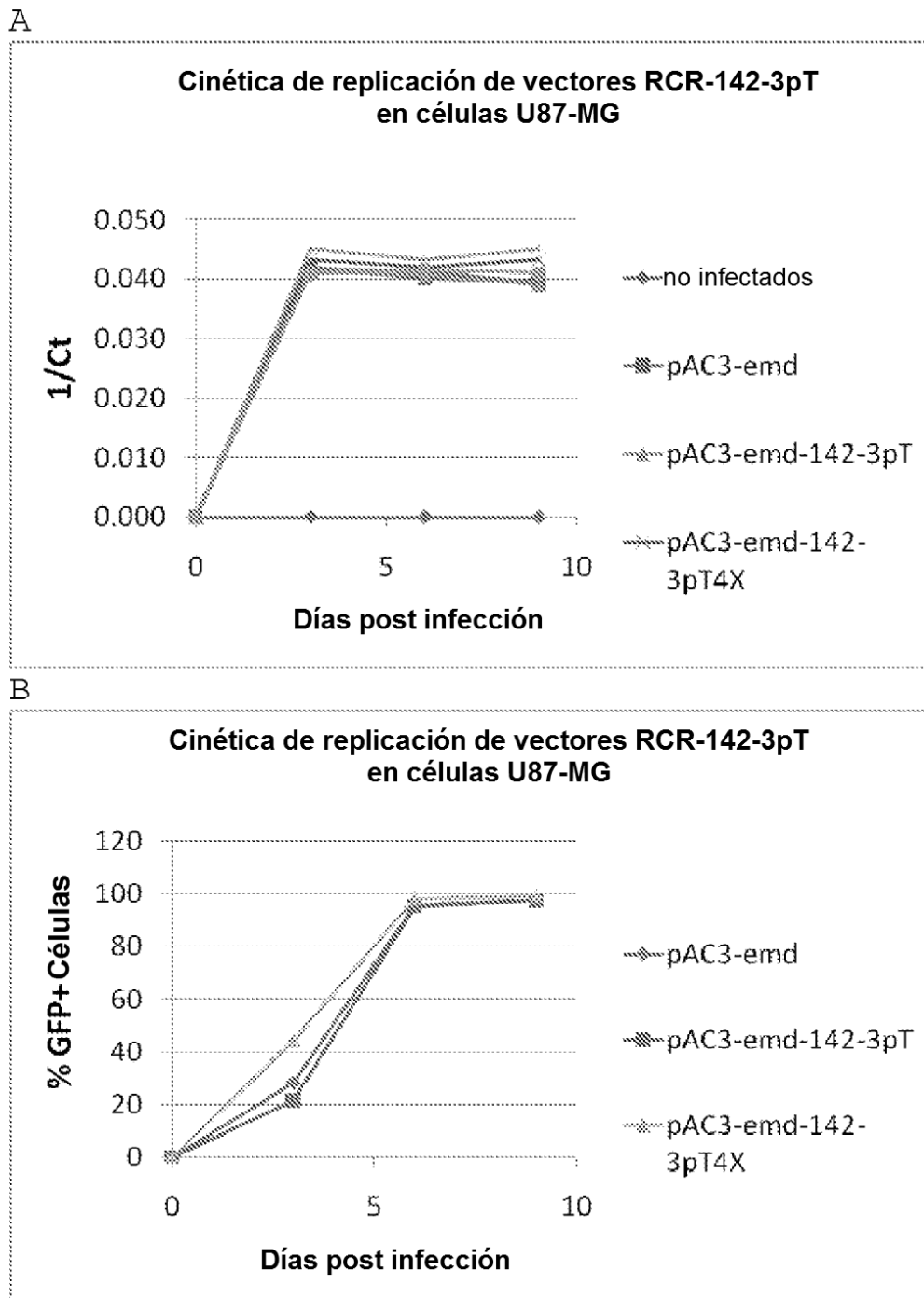


FIGURA 18

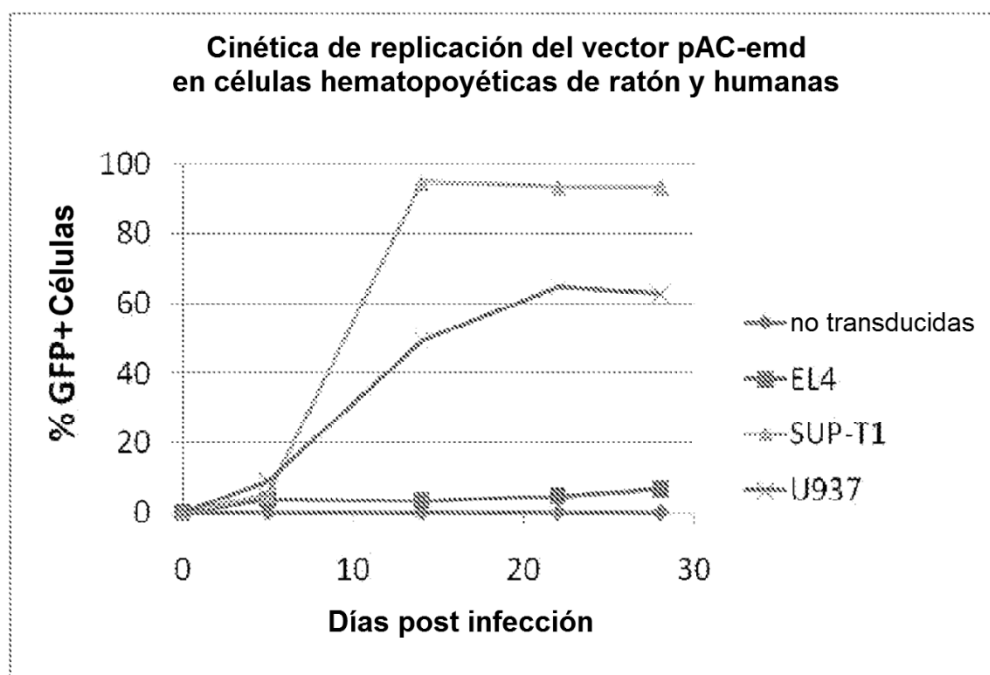
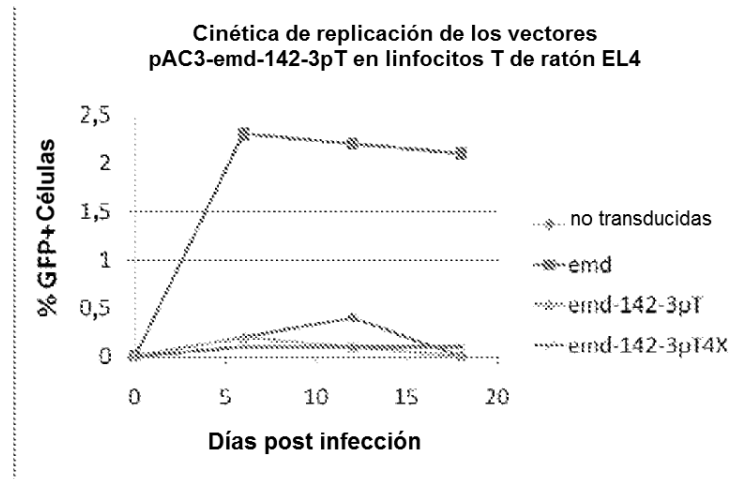
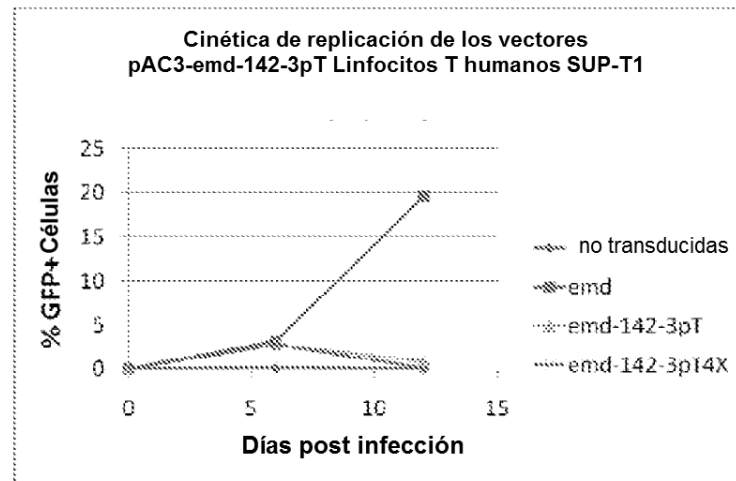


FIGURA 19

A



B



C

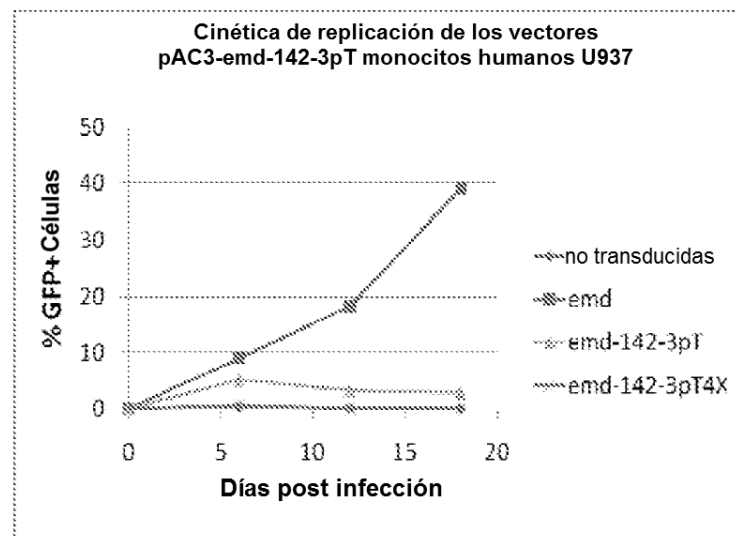
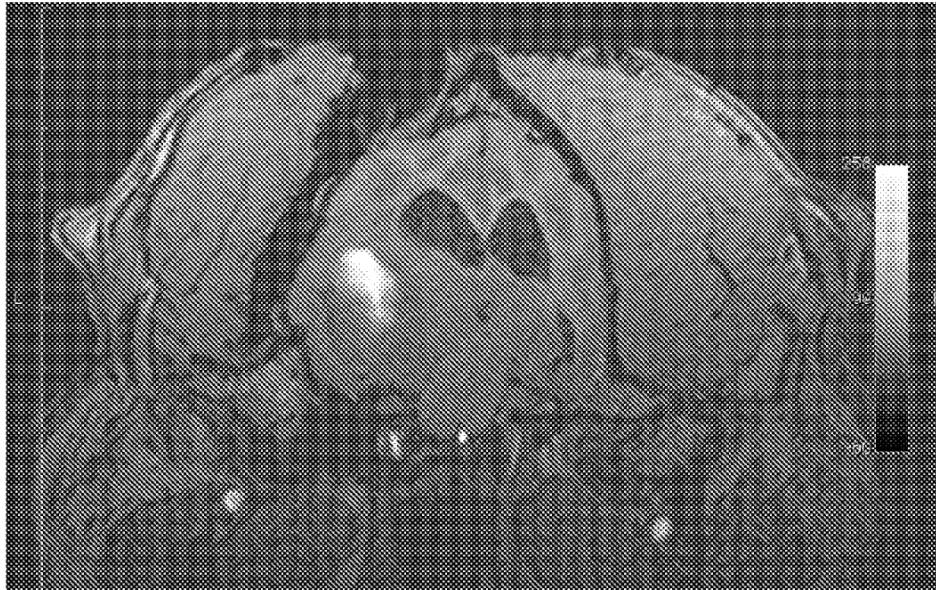


FIGURA 20

A



B

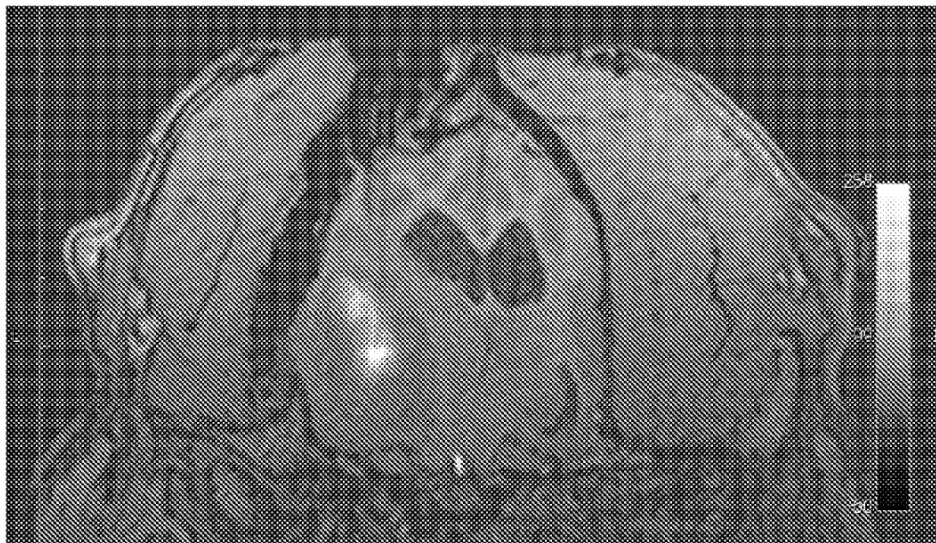


FIGURA 21

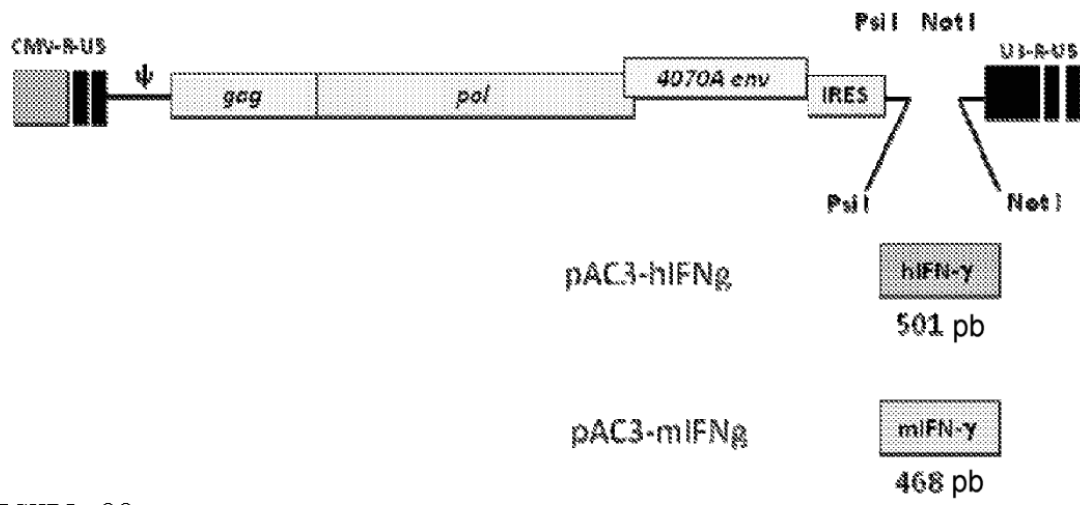


FIGURA 22

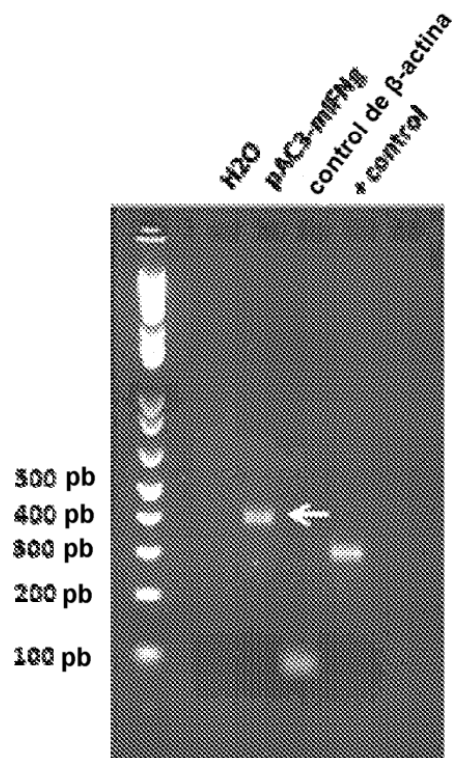


FIGURA 23

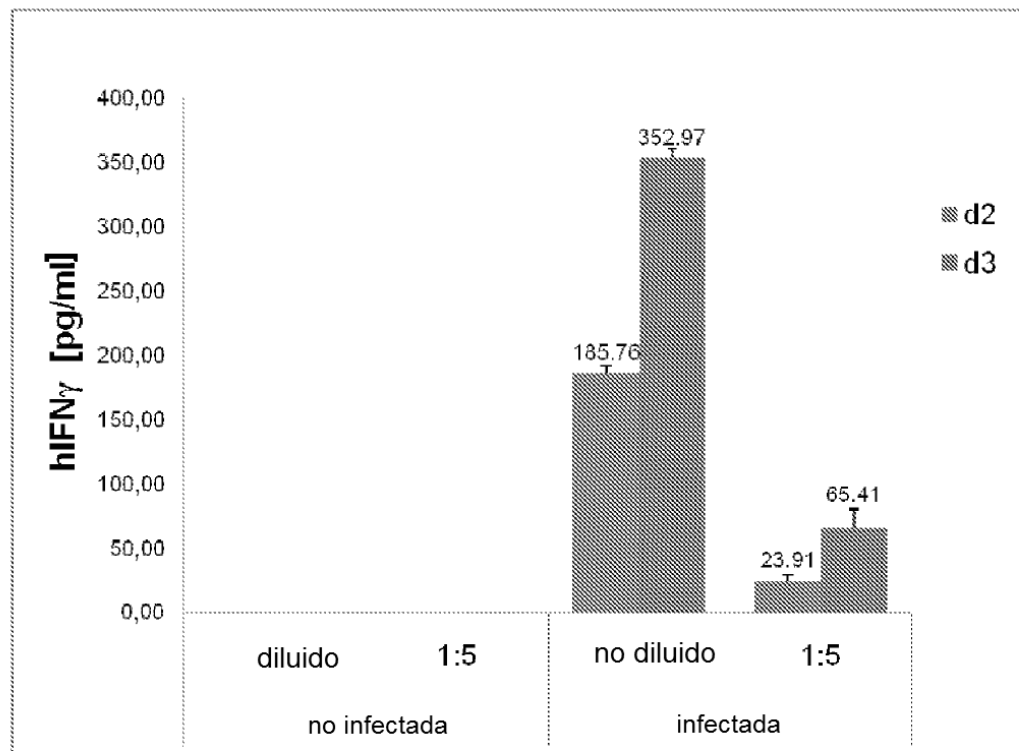


FIGURA 24

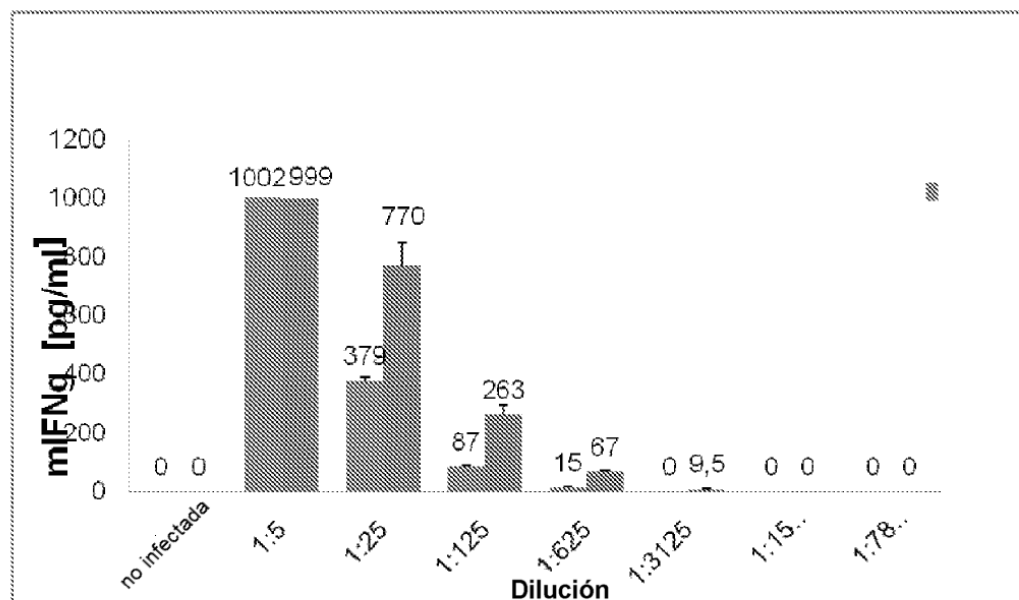


FIGURA 25

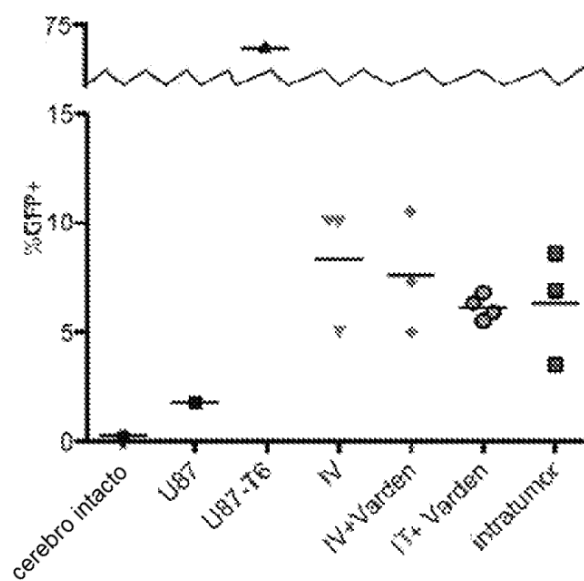


FIGURA 26

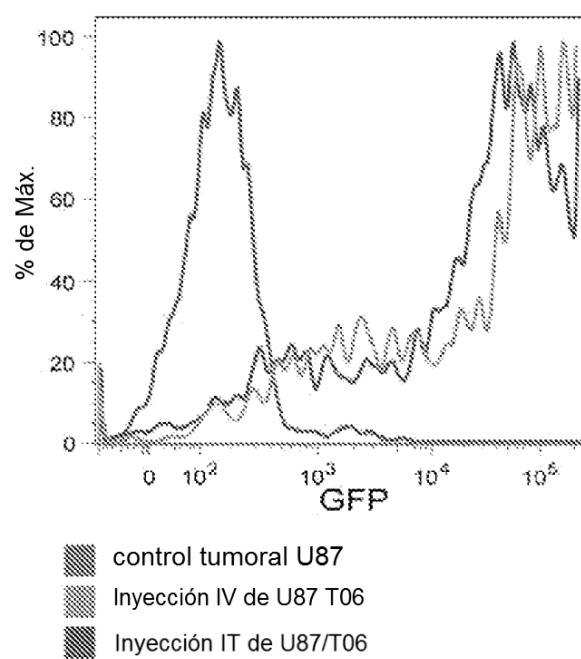


FIGURA 27

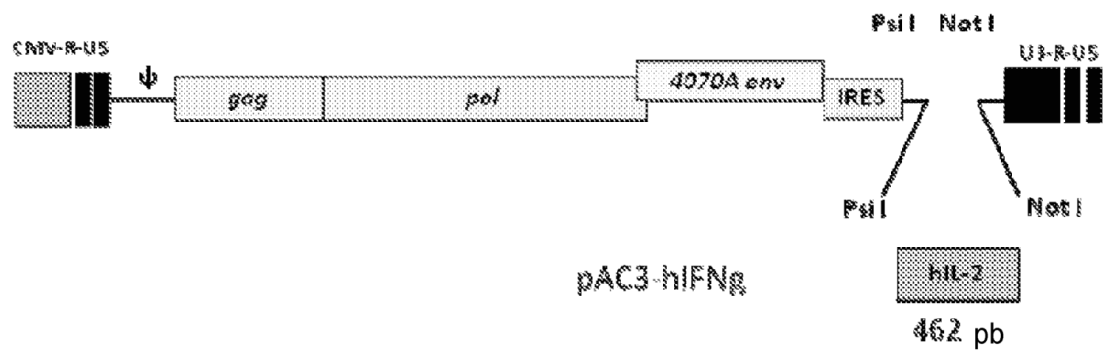


FIGURA 28