



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 565**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/83 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96905439 .4**

86 Fecha de presentación : **07.02.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0815245**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.1998**

54 Título: **Proteínas de fusión bioactivas de IL-12.**

30 Prioridad: **08.02.1995 US 385335**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.07.2008

73 Titular/es: **WHITEHEAD INSTITUTE FOR
BIOMEDICAL RESEARCH
Nine Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US**

72 Inventor/es: **Lieschke, Graham, J. y
Mulligan, Richard, C.**

74 Agente: **Torner Lasalle, Elisabet**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión bioactivas de IL-12.

Esta solicitud se refiere a proteínas de fusión bioactivas y a su utilidad en el tratamiento de tumores.

La producción de proteínas terapéuticas, tales como aquéllas que son diméricas, es a menudo difícil, ineficaz y cara. La producción de un dímero puede requerir la expresión separada de los dos componentes, seguida de la unión de los componentes para formar un dímero funcional. Serían útiles métodos alternativos de producción de proteínas diméricas funcionales.

Eur. J. Immunol. (1995) 25:137-146, describe la expresión de las dos subunidades de genes de interleucina-12 (p35 y p40) a partir de un plásmido en el que p35 y p40 se fusionan mediante un sitio de entrada ribosómico interno, de modo que p35 y p40 no están unidas mediante aminoácidos tras la expresión.

J. Bio. Chem. vol. 268, 31, 23455-23459, 1993, da a conocer la construcción de un ADNc que codifica para una bomba de Na de "una única subunidad" en la que las subunidades α y β de la bomba se unen mediante un ligador de 17 aminoácidos.

En el presente documento se dan a conocer proteínas de fusión que comprenden al menos dos monómeros polipeptídicos (cadenas de aminoácidos) unidos a través de un ligador polipeptídico y que son bioactivas, así como su producción. En algunas partes de la descripción, las proteínas de fusión bioactivas comprenden dos o más polipéptidos que se encuentran como subunidades o monómeros en una proteína dimérica nativa bioactiva correspondiente y están unidos a través de residuos de aminoácido heterólogos (residuos de aminoácido que no están presentes entre dos subunidades en la proteína nativa). Tal como se encuentra en la naturaleza, la citocina IL-2 es un heterodímero compuesto por una subunidad (p40) de 40 kDa unida por un enlace disulfuro a una subunidad (p35) de 35 kDa. Gillesen. S. *et al.*, Eur. J. Immunology, 25:200-206 (1995); Ozmen *et al.*, J. Exp. Med., 180:907-915 (1995); Heinsel *et al.*, Inf. & Immun., 62(10):4244-4249 (1994). Por ejemplo, la proteína de fusión es una proteína de fusión interleucina-12 (IL-12) bioactiva que comprende dos subunidades, denominadas p35 y p40, unidas mediante un ligador polipeptídico. También se da a conocer una proteína de fusión que comprende las subunidades de otros factores de crecimiento hematopoyéticos diméricos unidos mediante un ligador polipeptídico, o las subunidades de otras proteínas citocinas diméricas unidas mediante un ligador polipeptídico. También se da a conocer una proteína de fusión bioactiva que comprende dos subunidades que son monómeros bioactivos (por ejemplo, interleucina-2, GMCSF) en su forma nativa y que se unen a través de un ligador polipeptídico para producir una proteína de fusión que es de naturaleza quimérica o híbrida porque comprende al menos dos componentes o subunidades que no se encuentran juntas en una proteína nativa (por ejemplo, una proteína de fusión de interleucina-2/GMCSF).

También se dan a conocer métodos de producción de tales proteínas de fusión, constructos útiles en su producción y células huésped que contienen los constructos a partir de los que se expresan las proteínas de fusión codificadas. Las proteínas de fusión se expresan en un sistema de expresión apropiado, tal como mediante un vector de retrovirus que contiene y expresa ADN que codifica para las subunidades o monómeros y el ligador polipeptídico de la proteína de fusión deseada en una célula huésped apropiada, tal como en células de mamífero. También se dan a conocer células que se han transducido para secretar proteínas de fusión de IL-12 de la presente invención, y particularmente células tumorales que se han transducido para secretar una proteína de fusión de IL-12. También se da a conocer el uso de las células tumorales transducidas, particularmente en el tratamiento de tumores.

Estas proteínas de fusión son útiles para los mismos fines (por ejemplo, usos terapéuticos o diagnósticos) que la proteína nativa correspondiente. Por ejemplo, pueden usarse las proteínas de fusión de IL-12 para potenciar la actividad lítica de los linfocitos T citotóxicos activados por NK/linfocina, para actuar como un factor de crecimiento para células NK y T humanas activadas y para estimular la producción de IFN- γ apoyándose en células mononucleares de sangre periférica (PBMC). La IL-12 es también útil para tratar una variedad de cánceres. Por ejemplo, la IL-12 es útil para el acrecentamiento de la inmunidad antitumoral y, tal como se describe en el presente documento, pueden usarse células tumorales que secretan o bien la IL-12 nativa o bien una proteína de fusión de IL-12 de la presente invención para tratar tumores establecidos, tal como para prevenir el desarrollo adicional de un tumor, hacer que remitan tumores establecidos, prolongar la supervivencia, o una combinación de los mismos. Las proteínas de fusión tienen ciertas ventajas con respecto a las proteínas nativas correspondientes porque pueden producirse de manera eficaz y reproducible mediante los métodos descritos en el presente documento. Además, estas proteínas de fusión pueden tener también ventajas con respecto a las proteínas nativas correspondientes en cuanto a una actividad modificada o potenciada, una biodisponibilidad más favorable y propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Según un primer aspecto, la invención proporciona ADN que comprende ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12, preferiblemente de origen humano o de ratón, que codifica para un ligador polipeptídico y ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12, preferiblemente de origen humano o de ratón, en el que el ADN que codifica para el ligador polipeptídico está situado entre el ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12 y el ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12 y en el que la expresión del ADN da como resultado la producción de una proteína de fusión IL-12 bioactiva que comprende la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 unidas mediante el ligador polipeptídico codificado.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una proteína IL-12 bioactiva que comprende la subunidad p35 de IL-12, preferiblemente de origen humano o de ratón, y la subunidad p40 de IL-12, preferiblemente de origen humano o de ratón, unidas mediante un ligador polipeptídico, que comprende preferiblemente de 7 a 16 residuos de aminoácido.

Se proporciona, según un tercer aspecto de esta invención, un método de producción de una proteína IL-12 bioactiva que comprende las etapas de:

- a) proporcionar un vector de expresión que comprende ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12, preferiblemente de origen humano o de ratón, ADN que codifica para un ligador polipeptídico, preferiblemente de 7 a 16 residuos de aminoácido, y ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12, preferiblemente de origen humano o de ratón, en el que el ADN que codifica para el ligador polipeptídico está situado entre el ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12 y el ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12;
- b) introducir el vector de expresión en una célula huésped apropiada;
- c) mantener la célula huésped que resulta de la etapa b) en condiciones apropiadas para la expresión del ADN presente en el vector de expresión, dando como resultado la producción de una proteína IL-12 bioactiva en la que las dos subunidades se unen mediante el ligador polipeptídico.

En el presente documento se dan a conocer células tumorales secretoras de IL-12, preferiblemente seleccionadas de células tumorales CMS-5 y células tumorales B16, para su uso en el tratamiento para tratar a un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por un tumor establecido, preferiblemente reduciendo el tamaño del tumor, más preferiblemente en un 50% o más, prolongando la supervivencia del sujeto en comparación con un sujeto no tratado, o ambos.

También se dan a conocer células tumorales que secretan una proteína IL-12 bioactiva que comprende la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 unidas mediante un ligador polipeptídico, para su uso en el tratamiento para tratar a un sujeto que tiene un trastorno caracterizado por un tumor establecido, o para prevenir el establecimiento de un tumor en un sujeto mediante la administración a dicho sujeto tras la iniciación del tumor y antes del establecimiento del tumor.

También se da a conocer la fabricación de un medicamento para tratar un tumor, un fibrosarcoma, un melanoma o un carcinoma de células renales establecidos, de células tumorales secretoras de IL-12, preferiblemente células CMS-5, células B16 o células de carcinoma de células renales.

En los dibujos adjuntos:

La figura 1 muestra las estructuras de constructos retrovirales a base de SFG para la producción de interleucina-12 (SD = donador de corte y empalme; IRES = sitio de entrada ribosómico interno; SA = aceptor de corte y empalme; LTR = repetición terminal larga).

La figura 2 muestra las secuencias de ácido nucleico que codifican para las secuencias de ligador en las proteínas de fusión de interleucina-12 de la presente invención y las secuencias de p35 de IL-12 y p40 de IL-12 flanqueantes (SEQ ID NO: 1 a 4 y 35), así como las secuencias de aminoácidos codificadas (SEQ ID NO: 5 a 7 y 36).

Las figuras 3A-3U muestran el mapa de restricción completo y la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 8 y 9) de pUC19-SFG.

Las figuras 4A-4C muestran la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 10 y 11) que codifica para la subunidad p35 de IL-12 murina y la secuencia de aminoácidos de la subunidad p35 de IL-12 murina (SEQ ID NO: 12).

Las figuras 5A-5D muestran la secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 13 y 14) que codifica para la subunidad p40 de IL-12 murina y la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de la subunidad p40 de IL-12 murina.

La figura 6 muestra una curva patrón generada usando IL-12 murina recombinante.

Las figuras 7A-7D muestran representaciones gráficas del efecto de la inmunoterapia de ratones que portan tumor CMS-5 con células CMS-5 secretoras de IL-12 y GM-CSF, de tipo natural. El tratamiento se empezó o bien en el día 7 (7A y 7B) o bien en el día 14 (7C y 7D) tras la inducción del tumor. Los criterios de valoración son o bien la supervivencia (7A y 7C) o bien la supervivencia libre de tumor (7B y 7D). Los tumores o bien no se trataron (a) o bien se trataron con células CMS-5 secretoras de GM-CSF (b), células CMS-5 secretoras de IL-12 (c) o células CMS-5 de tipo natural (d).

La figura 8 es una representación gráfica de la incidencia de la regresión de tumores CMS-5 establecidos mediante un tipo de inmunoterapia. Se trataron los tumores tal como sigue: la columna 1 no recibió inmunoterapia; la columna 2 se trató con células tumorales de tipo natural; la columna 3 se trató con células tumorales secretoras de GM-CSF; y la columna 4 se trató con células tumorales secretoras de IL-12.

ES 2 302 565 T3

La figura 9 es una representación gráfica de la regresión tumoral en ratones tratados con IL-12 sistémica. El cuadrado en blanco y sombreado, triángulo, círculo y diamante representan 5 ratones individuales tratados con IL-12 sistémica a 0,1 $\mu\text{g/d}$ administrada 5 días a la semana durante 4 semanas.

5 Las figuras 10A-10B muestran representaciones gráficas de la supervivencia superior que resulta de la inmunoterapia con células CMS-5 secretoras de IL-12 en comparación con la administración de IL-12 sistémica o ningún tratamiento (nil). La figura 10A representa los resultados usando un inóculo tumoral de 2×10^5 células. La figura 10B representa los resultados usando un inóculo tumoral de 4×10^5 células.

10 Las figuras 11A-11B muestran representaciones gráficas de la comparación de la eficacia (proporción de ratones que sobreviven) de las células CMS-5 que secretan diferentes formas de IL-12 como inmunoterapia para tumores CMS-5 establecidos. La figura 11A muestra los resultados usando tumores iniciados mediante 2×10^5 células CMS-5 empezando el tratamiento en el día 14 (20 ratones por grupo reunidos a partir de dos experimentos). La figura 11B muestra los resultados usando tumores iniciados mediante 4×10^5 células CMS-5 empezando el tratamiento en el día 14 (1 grupo de 10 ratones). Los tumores o bien no se trataron (a) o bien se trataron con células CMS-5 de tipo natural (b), células CMS-5 secretoras de GM-CSF (c), células CMS-5 secretoras de IL-12 nativa (d) o células CMS-5 secretoras de proteína de fusión de IL-12 (e).

20 Las figuras 12A-12C son ilustraciones gráficas de los resultados de la inmunoterapia de tumores B16 (melanoma) con células tumorales secretoras de citocinas. Para el modelo tumoral preexistente, se iniciaron tumores con 4×10^5 células B16 y se comenzó la inmunoterapia en el día 7 (figura 12A) o en el día 14 (figura 12B). Para el modelo de inducción (figura 12C), se administraron 5×10^5 células irradiadas como una vacuna 14 días antes de la inducción del tumor con 1×10^6 células B16. Los tumores o bien no se trataron (a) o bien se trataron con células B16 de tipo natural (b), células B16 secretoras de GM-CSF (c), células B16 secretoras de IL-12 nativa (d) o células B16 secretoras de proteína de fusión de IL-12 (e).

30 Las figuras 13A-13B son ilustraciones gráficas de los efectos sobre la inmunoterapia de la administración de IL-12 mediante diferentes tipos de células en ratones con tumores de carcinoma de células renales (RENCA) preexistentes. La figura 13A muestra los resultados cuando los tumores RENCA se trataron o bien con células tumorales CMS-5 de tipo natural irradiadas (C-wt) o bien con células tumorales CMS-5 transducidas para secretar o bien IL-12 nativa (C-nIL-12) o bien la proteína de fusión de IL-12 (C-scIL-12). La figura 13B muestra los resultados cuando los tumores RENCA se trataron o bien con una combinación de células CMS-5 y RENCA de tipo natural (C-wt + R-wt), una combinación de células RENCA secretoras de proteína de fusión de IL-12 y células CMS-5 de tipo natural (C-wt + R-IL-12) o bien con una combinación de células CMS-5 secretoras de proteína de fusión de IL-12 y células RENCA de tipo natural (C-IL-12 + R-wt).

40 Las figuras 14A-14B son una representación gráfica de los efectos sobre la inmunoterapia de tumores CMS-5 preexistentes con células tumorales RENCA secretoras de proteína de fusión de IL-12. La figura 14A muestra los resultados cuando los tumores CMS-5 se trataron o bien con células RENCA de tipo natural o bien con células RENCA transducidas para secretar la proteína de fusión de IL-12. La figura 14B muestra los resultados cuando los tumores CMS-5 se trataron o bien con una combinación de células RENCA de tipo natural y CMS-5 de tipo natural (C-wt + R-wt), una combinación de células RENCA secretoras de proteína de fusión de IL-12 y células CMS-5 de tipo natural (C-wt + R-IL-12) o bien con una combinación de células CMS-5 secretoras de proteína de fusión de IL-12 y células RENCA de tipo natural (C-IL-12 + R-wt).

50 En el presente documento se describen proteínas de fusión bioactivas que comprenden al menos dos subunidades ligadas o unidas mediante un ligador de aminoácidos intermedio, un método de producción de las proteínas de fusión bioactivas, constructos útiles para producir las proteínas de fusión que pueden expresarse en células huésped, y células huésped que contienen los constructos.

En una descripción, las proteínas de fusión bioactivas comprenden: 1) al menos dos monómeros o subunidades polipeptídicas que corresponden a las subunidades polipeptídicas presentes en una proteína dimérica nativa que tiene una bioactividad especificada y 2) al menos un ligador polipeptídico que une las subunidades de tal modo que la proteína de fusión resultante es bioactiva. Si la proteína de fusión resultante es dimérica (incluye dos subunidades o monómeros), los dos componentes pueden ser subunidades que se encuentran en la misma proteína dimérica nativa (por ejemplo, dos subunidades de IL-12); subunidades que se encuentran en dos proteínas diméricas nativas diferentes (por ejemplo, una subunidad de IL-12 y una subunidad de IL-3) o monómeros que son bioactivos de manera individual (por ejemplo, IL-12, GM-CSF). Las proteínas de fusión multiméricas que comprenden tres o más subunidades unidas mediante ligadores polipeptídicos pueden comprender, por ejemplo, tres o más de las subunidades que se encuentran en la misma proteína dimérica nativa (por ejemplo, tres o más subunidades de IL-12), tres o más subunidades que se encuentran en proteínas diméricas nativas diferentes (por ejemplo, dos subunidades de IL-12 y una subunidad de IL-3), tres o más monómeros bioactivos (por ejemplo, tres monómeros de IL-2, dos monómeros de IL-2 y un monómero de GM-CSF) o una combinación de subunidades de las proteínas diméricas nativas y monómeros bioactivos (por ejemplo, dos subunidades de IL-12 y un monómero de GM-CSF). En cada caso, un ligador polipeptídico está presente entre dos subunidades (por ejemplo, el orden es subunidad-ligador-subunidad-subunidad). Tal como se usa en el presente documento, los términos subunidad y monómero se usan de manera intercambiable para referirse a los componentes de una proteína dimérica o multimérica y al único componente de una proteína monomérica. El orden de las subunidades

en la proteína de fusión de la presente invención puede ser p35-ligador-p40 o p40-ligador-p35. En cualquier caso, el ligador polipeptídico está situado entre las dos subunidades. Una proteína de fusión bioactiva de la presente invención que incluye subunidades que se encuentran en la misma proteína dimérica nativa "imita" o es similar a lo que se denomina en el presente documento como una proteína dimérica nativa correspondiente en cuanto a su bioactividad, pero difiere de la proteína dimérica nativa correspondiente en que la proteína de fusión incluye residuos de aminoácido del ligador que no se encuentran en la proteína nativa correspondiente (residuos de aminoácido heterólogos) entre cada par de subunidades polipeptídicas. Una proteína nativa correspondiente es una que incluye las subunidades presentes en la proteína de fusión y que muestra la actividad biológica también mostrada por la proteína de fusión.

En la proteína de fusión de IL-12 bioactiva de la presente invención, las dos subunidades, denominadas p35 y p40, de una proteína IL-12 nativa de mamífero (por ejemplo, proteína IL-12 de ser humano, ratón, rata, perro, gato, mono, chimpancé o cerdo) están unidas a través de un ligador polipeptídico. En este caso, la proteína nativa correspondiente es la proteína IL-12 nativa de mamífero. De manera similar, en el caso de otra proteína de fusión bioactiva, tal como IL-3, la proteína nativa correspondiente es IL-3. Los residuos de aminoácido de las subunidades de la proteína de fusión bioactiva pueden ser iguales que los de las subunidades de la proteína nativa correspondiente o pueden ser diferentes, siempre que la proteína de fusión resultante muestre la bioactividad deseada. Por ejemplo, la(s) subunidad(es) puede(n) tener una secuencia de aminoácidos diferente de la de la subunidad correspondiente de una proteína nativa (es decir, la secuencia de la subunidad nativa puede diferir en que uno o más residuos de aminoácido se ha(n) deletado o sustituido por un residuo de aminoácido que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural, se han incorporado residuos de aminoácido adicionales, o se ha modificado un residuo de aminoácido). La bioactividad deseada es una actividad similar a la de la proteína nativa correspondiente (por ejemplo, produce una respuesta fisiológica que resulta también de la actividad de la proteína nativa correspondiente). La bioactividad de una proteína de fusión (por ejemplo, la duración de su efecto, la magnitud de la respuesta resultante) puede ser mayor o menor que la de la proteína nativa correspondiente.

El ligador polipeptídico presente en la proteína de fusión puede ser de cualquier longitud y composición apropiadas para unir las dos subunidades de tal manera que la proteína de fusión resultante tenga la actividad biológica deseada y conserve su integridad como dímero o multímero. La longitud y composición apropiadas de un ligador pueden determinarse empíricamente para la proteína de fusión específica que va a producirse. Generalmente, el ligador polipeptídico será de al menos 7 residuos de aminoácido, aunque puede ser más corto (por ejemplo, de 2 a 6 residuos de aminoácido). Normalmente el ligador será de menos de 30 residuos de aminoácido de longitud, tal como de 7 a 25 residuos de aminoácido o de 7 a 20 residuos de aminoácido de longitud. En una realización, el ligador polipeptídico es de 7 a 16 residuos de aminoácido y en realizaciones específicas es de 7, 11, 15 ó 16 residuos de aminoácido. Los ligadores específicos usados para producir proteínas de fusión de IL-12 bioactivas se representan en la figura 2 y se describen en el ejemplo 4. En realizaciones específicas, los ligadores polipeptídicos se muestran a modo de ejemplo mediante las secuencias (Gly₄Ser)₃; (Gly₄Ser)₃Ser; (Gly₄Ser)₂Ser y Gly₆Ser, y estos ligadores pueden usarse para unir las subunidades de la proteína de fusión de IL-12 de la presente invención. Alternativamente pueden usarse otros ligadores polipeptídicos para unir dos subunidades de IL-12 para producir una proteína de fusión de IL-12 bioactiva.

El ADN que codifica para la proteína de fusión bioactiva puede ser ADNc o ADN genómico y puede provenir de una variedad de animales, particularmente mamíferos. Por ejemplo, el ADN puede ser ADN de ser humano, ratón, rata, perro, gato, mono, chimpancé, cerdo o hurón. El ADN puede codificar para una subunidad completa o entera (por ejemplo, una subunidad p35 completa de IL-12 y una subunidad p40 completa de IL-12) o para un fragmento o una parte de una(s) subunidad(es), siempre que la proteína de fusión codificada tenga la actividad biológica deseada cuando se expresa. Las secuencias de ácido nucleico de ADN que codifica para las subunidades p35 y p40 de IL-12 de ratón se representan en las figuras 4 y 5, respectivamente. Se han publicado las secuencias de ácido nucleico del ADN que codifica para las subunidades p35 y p40 de IL-12 humanas (Gubler *et al.* en Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 88:4143 (1991); Figura 4A-4C y 5A-5D). Puede usarse todo o una parte del ADN de IL-12 para producir la proteína de fusión de IL-12 objeto, siempre que la proteína de fusión codificada sea bioactiva (tenga actividad de IL-12).

Puede usarse cualquier sistema de expresión apropiado para expresar una proteína tal como un sistema de expresión en mamífero, bacteriano, en levadura o en insecto, para expresar las proteínas de fusión de la presente invención. Por ejemplo, tal como se describe en el presente documento, se ha usado un vector viral (por ejemplo, uno retroviral) que expresa el ADN (por ejemplo ADNc) que codifica para la proteína de fusión deseada en una célula huésped de mamífero. Tal como se describe también en el presente documento, se han construido retrovirus que contienen ADNc que codifica para las subunidades p35 y p40 de IL-12 y un ligador polipeptídico intermedio (una proteína de fusión de IL-12) y se han transfectados en células de empaquetamiento (por ejemplo, células de empaquetamiento BOSC23). Se infectaron células diana (por ejemplo, línea celular de fibrosarcoma CMS-5) con sobrenadantes que contenían virus y se cultivaron; se sometieron a ensayo los medios acondicionados por las células infectadas para determinar la actividad de IL-12 usando un bioensayo de proliferación de esplenocitos cebados con interleucina-2 y concanavalina-A. Pueden usarse líneas celulares productoras o de empaquetamiento distintas de BOSC23 para producir retrovirus infecciosos que contienen el ADN que codifica para la proteína de fusión. Además, pueden usarse células diana distintas de una línea celular de fibrosarcoma, tal como las líneas celulares de carcinoma de células renales o de melanoma B16, para producir la proteína de fusión. La bioactividad de IL-12 pudo demostrarse en las células infectadas con los retrovirus, tal como se describe en el ejemplo 4.

Se han construido retrovirus específicos para la expresión de una proteína de fusión de IL-12 (ejemplo 1 y figura 1) y se ha demostrado que las células infectadas con los retrovirus producen proteínas de fusión de IL-12 bioactivas (véase el ejemplo 4). Todos los retrovirus utilizados incluían la estructura principal retroviral de SFG cuya secuencia se muestra en la figura 3. Los vectores designados pSFG.IL-12.p35 y pSFG.IL-12.p40 incluyen, respectivamente, el ADNc para la subunidad p35 de IL-12 o el ADNc para la subunidad p40 de IL-12. El vector designado pSFG.IL-12.p35-IRES-p40 incluye el ADNc que codifica para la subunidad p35 de IL-12 y el ADNc que codifica para la subunidad p40 de IL-12, separados por una secuencia de sitio de entrada ribosómico interno. El vector designado pSFG.IL-12p40-IRES-p35 incluye los mismos componentes que el plásmido pSFG.IL-12p35-IRES-p40, pero los dímeros están en el orden inverso, tal como se indica. Los vectores designados pSFG.IL-12.p35-ligador-p40 y pSFG.IL-12.p40-ligador-p35 incluyen los ADNc que codifican para cada subunidad de IL-12 ligada mediante el ligador (Gly₄Ser)₂Ser y (Gly₄Ser)₃Ser respectivamente. Los vectores designados pSFG.IL-12.p35-ligador-Δp40 y pSFG.IL-12.p40-ligador-Δp35 incluyen los ADNc ligados en los que se delecionaron del segundo ADNc las secuencias que codifican para una supuesta secuencia líder de 22 aminoácidos. El vector designado pSFG.hIL-12.p40.ligador.Δp35 es una forma humana de la proteína de fusión de IL-12 y es análogo a la forma murina de pSFG.IL-12.p40.ligador.Δp35 excepto en que el ligador es más corto debido a una delección que se produjo durante la clonación (véase la figura 2, constructo E). Tal como se describe en el ejemplo 4, se mostró la bioactividad de IL-12 en el medio acondicionado de células infectadas con los retrovirus.

También se dan a conocer células huésped procariotas y eucariotas transfectadas mediante los vectores descritos. Por ejemplo, las células que pueden transfectarse con los vectores de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células bacterianas tales como células de *E. coli*, de insecto (baculovirus), células de levadura o de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO). Las células tumorales que se transducen para secretar las proteína de fusión de IL-12 de la presente invención son particularmente útiles.

Por tanto, los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden usarse para transformar, transfectar o transducir células huésped, o bien eucariotas (de levadura, aves, de insecto o de mamífero) o bien procariotas (células bacterianas), usando procedimientos convencionales usados para producir otras proteínas bien conocidas. Pueden emplearse procedimientos similares, o modificaciones de los mismos, para preparar proteínas recombinantes según la presente invención por medios microbianos o tecnología de cultivo de tejidos. Por ejemplo, pueden transducirse células 3T3 derivadas de fibroblastos con los vectores de la presente invención para expresar y secretar las proteínas de fusión de IL-12 de la presente invención. Las células tumorales y células 3T3 son útiles en el contexto de la presente invención, ya que las células transducidas para secretar IL-12 o proteínas de fusión de IL-12 de la presente invención son una fuente útil de la proteína o proteína de fusión (por ejemplo, para purificación). Las células tumorales transducidas para secretar IL-12 o proteínas de fusión de IL-12 también tienen una utilidad particular como agentes antitumorales tal como se describe en el presente documento.

Las células tumorales que van a transducirse pueden seleccionarse del individuo que va a tratarse o de otro individuo; además, las células tumorales que van a transducirse pueden ser del mismo tipo que las células tumorales del tumor que va a tratarse o las células tumorales pueden ser de un tipo diferente del tumor que va a tratarse. Por ejemplo, un tumor CMS-5 puede tratarse con células tumorales CMS-5, células tumorales de carcinoma de células renales (RENCA), o células tumorales B16 que secretan IL-12 o una proteína de fusión de IL-12 de la presente invención. Alternativamente, el tumor puede tratarse con una combinación de células secretoras de IL-12, secretoras de proteína de fusión de IL-12 y de tipo natural del mismo o diferente tipo celular. Por ejemplo, un tumor RENCA puede tratarse con una combinación de células RENCA de tipo natural y células CMS-5 secretoras de proteína de fusión de IL-12 o con una combinación de células CMS-5 secretoras de IL-12 nativa y células tumorales RENCA secretoras de proteína de fusión de IL-12.

En el presente documento se dan a conocer células tumorales transducidas que expresan IL-12 nativa o proteínas de fusión de IL-12 de la presente invención y su uso para tratar tumores. Es decir, las células tumorales transducidas que expresan y secretan IL-12 o proteínas de fusión de IL-12 son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer o para tratar tumores establecidos y proporcionan un medio para invertir tumores (reducir su tamaño o provocar su regresión completa) o prevenir el crecimiento adicional de un tumor establecido. Tal como se describe en el presente documento, las células tumorales transducidas que expresan IL-12 o proteínas de fusión de IL-12 de la presente invención provocan la regresión de tumores establecidos, previenen el establecimiento de tumores, prolongan la supervivencia o una combinación de los mismos en animales a los que se les administran en una dosis terapéuticamente apropiada.

Por ejemplo, las células tumorales que secretan IL-12 o la proteína de fusión de IL-12 de la presente invención pueden formularse con un medio fisiológicamente aceptable para preparar una composición farmacéutica. El medio fisiológico particular puede incluir, pero no se limita a, agua, solución salina tamponada, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido) y disoluciones de dextrosa. La concentración óptima del/de los principio(s) activo(s) en el medio elegido puede determinarse empíricamente, según procedimientos bien conocidos por los químicos médicos, y dependerá de la formulación farmacéutica final deseada. Los métodos de introducción de las células tumorales secretoras de IL-12 o secretoras de proteína de fusión de IL-12 incluyen, pero no se limitan a, intradérmico, intramuscular, intraperitoneal, intravenoso, subcutáneo, oral e intranasal. Las células tumorales que secretan IL-12 nativa o una proteína de fusión de IL-12 pueden administrarse en o cerca del sitio de un tumor que va a tratarse o en cualquier otro sitio del cuerpo, siempre que la IL-12 o la proteína de fusión de IL-12 produzca el efecto terapéutico deseado (regresión de tumores establecidos, prevención del establecimiento de tumores o supervivencia prolongada).

Tal como se describe en el presente documento, la proximidad del sitio del tumor y el sitio de administración no es necesaria para la eficacia del tratamiento. Otros métodos de introducción adecuados pueden incluir también dispositivos recargables o biodegradables y dispositivos poliméricos de liberación lenta. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden administrarse como parte de una terapia de combinación con otros agentes. Los regímenes de tratamiento dependerán de la dosis, la vía de administración, la frecuencia con la que se administra la composición, el tipo, el tamaño y la fase del tumor que va a tratarse, y la edad, salud y otras características físicas del individuo que va a tratarse.

Por ejemplo, se administra una cantidad (dosis) terapéuticamente eficaz de las células tumorales transducidas (opcionalmente formuladas con un medio fisiológicamente apropiado) a un individuo que tiene un tumor que ha de tratarse (por ejemplo, disminuir su tamaño o prevenir que aumente de tamaño). Las células tumorales transducidas también pueden administrarse en una dosis terapéuticamente apropiada a un individuo para prevenir el establecimiento de un tumor. Por ejemplo, las células tumorales transducidas pueden administrarse a un individuo que necesita tratamiento antineoplásico (por ejemplo, un individuo con un tumor establecido o un individuo en el que ha de prevenirse el establecimiento de un tumor). Alternativamente, la proteína de fusión de IL-12 de la presente invención puede administrarse directamente al individuo en una dosis terapéuticamente eficaz; la proteína de fusión de IL-12 puede combinarse opcionalmente con un medio fisiológicamente aceptable tal como se describió anteriormente.

Tal como se describe en el presente documento, se evaluó la eficacia de las células tumorales secretoras de IL-12 como inmunoterapia antitumoral en ratones con cargas tumorales establecidas. Se usaron los tumores CMS-5 inmunógenos (fibrosarcoma) y B16 no inmunógenos (melanoma); también se utilizaron tumores RENCA tal como se describe en el presente documento.

Tal como se muestra en los ejemplos 6-8, el trabajo descrito en el presente documento demuestra que para el tratamiento inmunoterápico de tumores CMS-5 palpables establecidos de 14 días, la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 y secretoras de proteína de fusión de IL-12 prolongaba la supervivencia induciendo la regresión de los tumores. Además, la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 inducía la regresión incluso cuando la carga tumoral palpable tenía un promedio de más del 5% de masa corporal. Aunque IL-12 tiene una actividad antitumoral frente a los tumores CMS-5 cuando se administra por vía sistémica, para ratones con cargas tumorales más grandes en el comienzo del tratamiento había una ventaja en la supervivencia significativa de la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 con respecto al tratamiento con IL-12 sistémica. Esto muestra que existe una ventaja administrando la IL-12 mediante células tumorales transducidas en lugar de sólo como tratamiento con citoquinas sistémicas. Los datos a partir de las células tumorales transducidas para expresar una proteína de fusión de IL-12 (SFG-IL-12.p40.ligador. Δ p35) indican que las formas humana y murina de la proteína de fusión tienen una actividad específica al menos igual a la de la molécula nativa en un bioensayo *in vitro*.

Los resultados descritos en el presente documento muestran que la vacunación con células B16 secretoras de IL-12 alteraban la historia natural del crecimiento de tumores B16 establecidos posteriormente y parece que éstos también pueden potenciar los mecanismos inmunológicos que pueden modular el crecimiento tumoral. Las células B16 secretoras de IL-12 son útiles como inmunoterapia para tumores B16 establecidos, ya que prolongan de manera eficaz la supervivencia. Estos resultados muestran que existen mecanismos innatos inducibles que pueden modular la historia natural de tumores establecidos en el ratón, y que las células secretoras de IL-12 son más potentes para inducirlos que las células secretoras de GM-CSF. Estos resultados, que se describen de manera más completa en los ejemplos a continuación, muestran que las células tumorales secretoras de IL-12 tienen eficacia como inmunoterapia para tumores establecidos.

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de ningún modo.

Ejemplo 1

Construcción de plásmidos

En la figura 1 se muestra esquemáticamente la estructura general de los plásmidos utilizados en estos estudios. En la figura 2 se facilitan las secuencias confirmadas de los ligadores en cada una de las proteínas de fusión.

Fuente de plásmidos

Los plásmidos que contenían los ADNc para las subunidades p35 y p40 de IL-12 murinas (pBS-IL-12.p35 y pBS-IL-12.p40) se proporcionaron por Hoffmann-La Roche (Nutley, NJ). La numeración de pares de bases en este documento corresponde a los mapas de los insertos de estos dos plásmidos (figuras 4 y 5). El plásmido que contenía la estructura principal retroviral de SFG se proporcionó por el Dr. Dan Ory (Whitehead Institute, Cambridge, MA) como pSFG-TPA, un plásmido pUC que contenía la estructura retroviral de SFG entre los sitios HindIII y EcoRI con un ADNc activador de plasminógenos de tejido entre los sitios NcoI y BamHI únicos en el retrovirus SFG. En la figura 3 se muestra un mapa de secuencias de nucleótidos de la estructura principal retroviral de SFG.

ES 2 302 565 T3

Plásmido pSFG.IL-12.p35

Se proporcionó el ADNc de IL-12p35 en pBluescript con las secuencias que rodean la ATG de iniciación de la traducción optimizado para dar ACCATGG según las reglas de Kozak. Se escindió el fragmento de ADNc de IL-12p35 como un fragmento NcoI-EcoR1, habiéndose rellenado la proyección de EcoR1 usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa 1 de *E. coli*. Se ligó este fragmento usando la ADN ligasa de T4 en los sitios NcoI-BamHI de pSFG, habiéndose rellenado la proyección de BamHI usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa 1 de *E. coli*. El plásmido resultante se designa pSFG.IL-12.p35.

Plásmido pSFG.IL-12.p40

Se proporcionó el ADNc de IL-12p40 en pBluescript. Se escindió el fragmento NcoI-BamHI que contenía el ADNc de IL-12p40 y se ligó en los sitios NcoI-BamHI de pSFG para producir pSFG.IL-12.p40.

Estrategia general para la construcción de vectores a base de SFG

La estrategia general para construir los vectores retrovirales a base de SFG para la expresión de proteína de fusión de IL-12 es tal como sigue: se sintetizaron dos oligonucleótidos que codifican para la cadena sentido y antisentido de un fragmento de ligador (Gly₄Ser)₃ y secuencias de ADNc de IL-12 contiguas que van a unirse (con secuencias terminales para la creación de proyecciones cohesivas que pueden ligarse) usando un sintetizador de ADN "PCR-mate" 391 (Applied Biosystems, Foster City, CA). La secuencia del ligador (Gly₄Ser)₃ era la de Huston *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883 (1988)).

Para las dos proteínas de fusión que usan los ADNc de IL-12 completos, se diseñaron los oligonucleótidos que van a clonarse en un único sitio de enzima de restricción en el extremo 3' del primer ADNc, reconstruyendo el extremo 3' del primer ADNc y permitiendo que un fragmento NcoI-NcoI que engloba la secuencia de ligador y ADNc completo se clone en el sitio NcoI del plásmido SFG que contiene el otro ADNc.

La estrategia de clonación fue similar para las dos proteínas de fusión con una delección de 66 pb que codifican para los primeros 22 aminoácidos del segundo ADNc. Se diseñaron los oligonucleótidos del ligador que van a clonarse en los únicos sitios de enzimas de restricción que se encuentran en 3' de 66 pb de las bases traducidas del segundo ADNc en el constructo de proteína de fusión. Esto permitió que se escindiera un fragmento para la clonación que reconstruía el extremo 3' del primer ADNc unido al ligador y contenía el ligador unido al codón 23 del segundo ADNc.

Se determinó la secuencia del ligador y las regiones de ADNc contiguas en los plásmidos usando un kit "Sequenase" (Amersham, Cleveland, OH).

Plásmido pSFG.IL-12.p35-ligador-p40

Los oligonucleótidos eran: sentido, 5'-CCGCC.GGT.GGC.GGT.GGC.TCG.GGC.GGT.GGT.GGG.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.TCCATGGAGCT-3' (SEQ ID NO: 16); y antisentido, 5'-CCATGGA.AGA.TCC.GCC.GCC.ACC.CGA.CCC.ACC.ACC.GCC.CGA.GCC.ACC.GCC.ACC.GGCGGAGCT-3' (SEQ ID NO: 17).

Se aparearon estos dos oligonucleótidos, se fosforilaron usando la polinucleótido cinasa de T4, y se ligaron en el sitio SacI de pBS.IL-12.p35 que se había desfosforilado usando fosfatasa intestinal de ternero. Se escindió el fragmento NcoI-NcoI del plásmido resultante que contenía el ADNc de IL-12p35 y el ligador orientado correctamente y se ligó en el sitio NcoI desfosforilado de pSFG.IL-12p40 para crear pSFG.IL-12.p35-ligador.p40 (la orientación correcta de este fragmento ligado se demuestra mediante un digesto de SacI).

Se secuenció este plásmido usando los dos cebadores siguientes: 5'-CAGAGTGAAAATGAAGCT-3' (SEQ ID NO: 18) y 5'-GAAGCTCTGCATCCTGCT-3' (SEQ ID NO: 19), correspondientes a los pb 601-618 y 613-630 del ADNc de IL-12p35. La secuenciación demostró que se había producido una delección durante la clonación dando como resultado una pérdida de 15 pb de las secuencias de ligador, pero manteniendo un marco de lectura intacto. La secuencia del ligador en este plásmido se facilita en la figura 2.

Plásmido pSFG.IL-12.p40.ligador.p35

Los oligonucleótidos eran: sentido, 5'-GGGTCCGATCC.GGT.GGC.GGT.GGC.TCG.GGC.GGT.GGT.GGG.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.TCCATG-3' (SEQ ID NO: 20); y antisentido, 5'-GATCCATGGA.AGA.TCC.GCC.GCC.ACC.CGA.CCC.ACC.ACC.GCC.CGA.GCC.ACC.GCC.ACC-GGATCGGACCCTGCA-3' (SEQ ID NO: 21).

Se aparearon estos dos oligonucleótidos y se ligaron en los sitios Sse83871 y BamHI de pBS.IL-12.p40. Se escindió el fragmento NcoI-NcoI del plásmido resultante que contiene el ADNc de IL-12p40 y el ligador orientado correctamente y se ligó en el sitio NcoI desfosforilado de pSFG.IL-12p35 para crear pSFG.IL-12.p40.ligador.p35 (la orientación correcta de este fragmento ligado se demostró mediante un digesto de XcmI).

ES 2 302 565 T3

Se secuenció este plásmido usando los dos cebadores siguientes: 5'-CTATTACAATTCCTCATG-3' (SEQ ID NO: 22) y 5'-GAGGGCAAGGGTGGCCAA-3' (SEQ ID NO: 23), correspondiente a los pares de bases 997-1014 del ADNc de IL-12p40 y los pares de bases 91-74 del ADNc de IL-12p35 (un cebador antisentido). La secuenciación confirmó que la secuencia del ligador y las secuencias de ADNc de IL-12 contiguas eran tal como se esperaba.

El posterior mapeo con enzimas de restricción de pSFG.IL-12.p40.ligador.p35 tras completar los estudios de transfección y expresión reveló que contenía probablemente un concatémico de fragmentos NcoI-NcoI de la etapa final de clonación.

Plásmido pSFG.IL-12.p35.ligador.Δp40

Los oligonucleótidos eran: sentido, 5'-T.TGC.TGG.AGC.TCC.GCC.GGT.GGC.GGT.GGC.TCG.GGC.GGT.GGT.GGC.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.ATG.TGG-3' (SEQ ID NO: 24) y antisentido, 5'-CACAT.AGA.TCC.GCC.GCC.ACC.CGA.CCC.ACC.ACC.GCC.CGA.GCC.ACC.GCC.ACC.GGCGGAGCTCCAGCAA-3' (SEQ ID NO: 25).

Se aparearon estos dos oligonucleótidos, se fosforilaron usando la polinucleótido cinasa de T4, y se ligaron en pBS.IL-12.p40 a partir del que se había escindido el fragmento Xcm1-Xcm1 en 5' de 30 pares de bases. Se escindió el fragmento Sac1-Sac1 del plásmido resultante y se ligó en el sitio Sac1 de pBS.IL-12.p35 que se había desfosforilado usando fosfatasa intestinal de ternero (la orientación correcta del fragmento ligado se demostró mediante un digesto de NcoI-EcoR1). Se escindió el fragmento NcoI-EcoR1 del vector resultante, habiéndose rellenado la proyección de EcoR1 usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa 1 de *E. coli*, y se ligó en los sitios BamHI relleno con Klenow y NcoI de pSFG para crear pSFG.IL-12.p35.ligador.Δp40.

Se secuenció este plásmido usando los siguientes cebadores: 5'-CAGAGTGAAAATGAAGCT-3' (SEQ ID NO: 18) y 5'-GAAGCTCTGCATCCTGCT-3' (SEQ ID NO: 19), correspondientes a los pares de bases 601-618 y 613-630 del ADNc de IL-12p35; y 5'-GTCATCTTCTTCAGGCGT-3' (SEQ ID NO: 34), un cebador antisentido correspondiente a los pares de bases 217-200 del ADNc de IL-12p40. La secuenciación confirmó que la secuencia del ligador y las secuencias de ADNc de IL-12 contiguas eran tal como se esperaba.

Plásmido pSFG.IL-12.p40.ligador.Δp35

Los oligonucleótidos eran: sentido, 5'-CTG.GCC.TGC.AGG.GTC.CGA.TCC-GGT.GGC.GGT.GGC.TCG.GGC.GGT.GGT.GGC.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT-AGG.GTC.ATT.CCA.GTC.T-3' (SEQ ID NO: 26) y antisentido, 5'-CTGGAATGACCCT.AGA.TCC.GCC.GCC.ACC.CGA.CCC.ACC.ACC.GCC.CGA.GCC.ACC.GCC.ACC.GGA.TCGGACCCTGCAGGCCAGAGA-3' (SEQ ID NO: 27).

Se aparearon estos dos oligonucleótidos, se fosforilaron usando la polinucleótido cinasa de T4 y se ligaron en el sitio PflM1 en pBS.IL-12.p35 que se había desfosforilado usando fosfatasa intestinal de ternero. La orientación de este fragmento ligado se confirmó mediante un digesto de Sse8387I/EcoR1. Se escindió el fragmento Sse8387I-EcoR1 del plásmido resultante, habiéndose rellenado la proyección de EcoR1 usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa 1 de *E. coli*, y se ligó en sitios Sse8387I y BamHI relleno con Klenow de pSFG.IL-12.p40 para crear pSFG.IL-12.p40.ligador.Δp35.

Se secuenció este plásmido usando el cebador 5'-GCAAAGGCGGGAATGTCT-3' (SEQ ID NO: 28), correspondiente a los pares de bases 960-977 del ADNc de IL-12.p40. La secuencia del segundo codón de ligador era difícil de leer, pero se determinó su secuencia secuenciando el ligador clonado en el plásmido intermedio usando los cebadores antisentido 5'-AGGAATAATGTTTCAGTT-3' (SEQ ID NO: 29) y 5'-CAGCAGTGCAGGAATAAT-3' (SEQ ID NO: 30) correspondientes a los pares de bases 224-207 y 233-216 del ADNc de IL-12p35 respectivamente. La secuenciación confirmó que la secuencia del ligador y las secuencias de ADNc de IL-12 contiguas eran tal como se esperaba.

Plásmidos pSFG.IL-12.p35.IRES.p40 y pSFG.IL-12.p40.IRES.p35

Se proporcionó el fragmento del sitio de entrada ribosómico interno (IRES) del virus de la encefalomiocarditis (VECM) por el Dr. Michael Sadelain (Whitehead Institute, Cambridge, MA), y era tal como se describió previamente (Ghattas *et al.*, Mol. Cell. Biol., 11:5848-5859 (1991)).

Ejemplo 2

Células y cultivo de tejidos

Se obtuvieron células de empaquetamiento BOSC23 (Pear *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:8382-8396 (1993)) del Dr. Dirk Lindemann (Whitehead Institute, Cambridge, MA). Se les realizó un pase en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternero al 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomycin 50 µg/ml.

ES 2 302 565 T3

Se obtuvieron células tumorales CMS-5 (DeLeo *et al.*, J. Exit. Med., 146:720-734 (1977)) de Jason Salter (Whitehead Institute, Cambridge, MA). Se les realizó un pase en DMEM complementado con suero de ternero fetal al 10%, penicilina 50 U/ml y estreptomicina 50 µg/ml. Se usó el mismo medio para la recogida del medio acondicionado con CMS-5.

Se obtuvieron esplenocitos C57BL/6 para los ensayos de IL-12 moliendo un bazo a través de un tamiz (Falcon 2350, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) y recogiendo las células en medio de IL-12 (tal como se detalla en Schoenhaut *et al.* (J. Immunol., 148:3433-3440 (1992)) complementado con suero de ternero fetal al 2%.

Ejemplo 3

Generación de células productoras derivadas de BOSC23 y recogida de los medios acondicionados

Se cultivaron en placa células BOSC23 2 x 10⁶ células por placa de cultivo de tejidos de 6 cm y se transfectaron mediante transfección de CaPO₄ con los diversos constructos tal como se describió previamente (Pear *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:8382-8396 (1993)). Veinticuatro horas tras la transfección, se sustituyó el medio por 5 ml de medio reciente. Se recogieron los sobrenadantes que contenían virus 24 horas más tarde, se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm y se añadió polibreno hasta una concentración final de 8 µg/ml. Se usaron 2,5 ml de sobrenadante que contenía virus para infectar células CMS-5 inmediatamente durante 4 horas (en la preparación para esta infección se habían cultivado en placa células CMS-5 a 5 x 10⁴ células/placa de cultivo de tejidos de 6 cm el día anterior) y se congelaron los 2,5 ml restantes a -70°C. Al día siguiente, se descongelaron los 2,5 ml congelados de sobrenadante que contenía virus y se usaron para una segunda infección de 4 horas de las células CMS-5. Para recoger el medio acondicionado que contenía IL-12 se sustituyó el medio al día siguiente por 5 ml de medio reciente que se recogió 24 horas más tarde. Se filtraron estos medios acondicionados a través de un filtro de 0,2 µm y se congelaron a -70°C para someterlos a ensayo más tarde para determinar la bioactividad de IL-12. Se añadieron 5 ml de medio reciente a las células CMS-5 y se recogió un segundo conjunto de medios acondicionados 24 horas más tarde que también se filtraron y congelaron para someterlos a ensayo más tarde. Entonces se lisaron las células CMS-5 infectadas y se preparó el ADN genómico para el análisis posterior.

Ejemplo 4

Bioensayo para la interleucina-12 murina

Se determinaron los niveles de interleucina-12 bioactiva usando un ensayo de proliferación de esplenocitos cebados con concanavalina-A e interleucina-2, tal como se describe en Schoenhaut *et al.* (J. Immunol., 148:3433-3440 (1992)). La concanavalina A se obtuvo comercialmente de Boehringer (Mannheim, Alemania) y la interleucina-2 humana recombinante comercialmente de Chiron Therapeutics (Emeryville, CA). Para recoger las células para la medición de la incorporación de [³H]timidina en el ADN celular, se usaron un colector de células Skatron (Sterling, VA) y filtros Filtermats (nº 7031). Para someter a ensayo la actividad inhibidora en los medios acondicionados, el volumen de muestra de 50 µl comprendía 25 µl de 1000 pg/ml de IL-12 murina recombinante y 25 µl de la muestra de prueba. Se sometieron a prueba las muestras de los medios acondicionados por duplicado a diversas diluciones en el intervalo de 1:1 a 1:1000. Se construyó una curva patrón para cada bioensayo usando IL-12 murina recombinante en el intervalo de 20-10.000 pg/ml. Se obtuvo la IL-12 murina recombinante de Hoffmann-La Roche (Nutley, NJ). Para calcular la concentración de IL-12 bioactiva en las muestras de prueba en pg/ml, se aproximó la parte lineal de la curva patrón usando la función de ajuste de curva del software "KaleidaGraph 2.1.1" y se usó la fórmula resultante para los cálculos. Se verificó que los medios acondicionados tenían inmunorreactividad de hIL-12 mediante el ensayo ELISA de hIL12 (kit comercial, R & D Systems).

Se evaluó la capacidad de los siguientes constructos (figura 1) para expresar una proteína de fusión de IL-12 bioactiva:

- A. pSFG.IL-12.p35.ligador.p40;
- B. pSFG.IL-12.p40.ligador.p35;
- C. pSFG.IL12-p35.ligador.Δp40;
- D. pSFG.IL12-p40.ligador.Δp35; y
- E. pSFG.hIL-12.p40.ligador.p35.

Las secuencias para los ligadores en cada constructo fueron tal como sigue, según se confirma mediante la secuenciación (se facilitan algunas secuencias de IL-12 confirmadas adyacentes para orientación):

- 5 A. 5'->>>IL-12p35.AGC.TCC.GCC-GGT.GGT.GGT.GGG.TCG.GGT.GGC.GGC.
GGA.TCT.TCC.ATG.GGT.CCT.CAG.>>>IL-12p40-3' (SEQ ID NO: 1);
- 10 B. 5'->>>IL-12p40.CCC.TGC.AGG.GTC.CGA.TCC-GGT.GGC.GGT.GGC.TCG.GGC.
GGT.GGT.GGG.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.TCC.ATG.GGT.CAA.>>>IL-12p35-3' (SEQ
ID NO: 31);
- 15 C. 5'->>>IL-12p35.5'-TAT.CTG.AGC.TCC.GCC-GGT.GGC.GGT.GGC.TCG.GGC.
GGT.GGT.GGG.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.ATG.TGG.GAG.CTG.GAG.AAA.>>>IL-
20 12p40-3' (SEQ ID NO: 32);
- D. 5'->>>IL-12p40.TGT.GTT.CCC.TGC.AGG.GTC.CGA.TCC-GGT.GGC.GGT.GGC.
TCG.GGC.GGT.GGT.GGG.TCG.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.AGG.GTC.ATT.CCA.GTC.TCT.
25 GGA.CCT.GGC.>>>IL-12p35-3' (SEQ ID NO: 33); y
- E. 5'->>>hIL-12p40.TGC.AGT.GGT.GGC.GGT.GGC.GGC.GGA.TCT.AGA.AAC.
>>>hIL-12p35-3 (SEQ ID NO: 35).
- 30

No era detectable ninguna actividad biológica de IL-12 en los medios acondicionados mediante células CMS-5 transfectadas de manera simulada, y células CMS-5 infectadas con el retrovirus SFG solo, o mediante un retrovirus (MFG) relacionado que porta el gen *lac-z*. Sin embargo, los medios acondicionados mediante estas células contenían una actividad inhibidora significativa a diluciones de 1:2 y 1:10, inhibiendo hasta el 95% de la actividad biológica de 500 pg/ml de rmIL-12 (tabla 1, y otros datos no mostrados). A pesar de estos antecedentes de actividad inhibidora en los medios acondicionados, la producción de IL-12 bioactiva demostró ser todavía demostrable.

Los constructos para la expresión de las subunidades individuales de la proteína IL-12 (pSFG.IL-12.p35 y pSFG.IL-12.p40) no dieron como resultado ninguna bioactividad detectable por sí mismos. Sin embargo, la co-transfección de células BOSC23 con estos constructos juntos dio como resultado la secreción de IL-12 bioactiva por las células CMS-5 infectadas. De manera similar las células CMS-5 infectadas con el retrovirus SFG.IL-12.p35 y 24 horas más tarde con el retrovirus SFG.IL-12.p40 también produjeron IL-12 bioactiva (tabla 1).

Los constructos dicistrónicos diseñados para expresar las dos subunidades de IL-12 usando la secuencia de IRES dieron como resultado niveles similares de producción de IL-12 bioactiva (a pesar de un nivel indetectable de infección viral tal como se determina mediante análisis de hibridación de tipo Southern (véase a continuación)) (tabla 1). La capacidad de los retrovirus que contienen IRES para dar como resultado la producción de IL-12 bioactiva se ha confirmado generando retrovirus clonales estables que producen líneas celulares que usan estos dos constructos.

Todos los constructos de proteína de fusión de IL-12 dieron como resultado la producción significativa de IL-12 bioactiva por células CMS-5 infectadas. De particular interés era el constructo SFG.IL-12.p40.ligador. Δ p35, para el que la bioactividad de IL-12 era demostrable en medio acondicionado no diluido (a pesar de los antecedentes de actividad inhibidora sustancial) y para el que una dilución de 1:1000 de medio acondicionado contenía una bioactividad equivalente a 301 pg/ml de rmIL-12 (tabla 1). Todos los constructos dieron como resultado una bioactividad de IL-12 valorable a pesar de una actividad inhibidora no específica significativa en los medios acondicionados también. La actividad biológica de hIL-12 se confirmó en Hoffman-LaRoche (Nutley, NJ, laboratorio del Dr. M. Gately), y se determinó que la actividad específica de la proteína de fusión de hIL-12 era aproximadamente equivalente a la actividad específica de la IL-12 humana nativa recombinante.

TABLA 1

Constructo	Ensayo de agonista			Ensayo de antagonista		
	(Bioactividad de IL-12, pg/ml)			(% de inhibición de 500 pg/ml de IL-12 en el ensayo)		
	Dilución del MA en el ensayo			Dilución del MA en el ensayo		
	1:1	1:100	1:1000	1:2	1:10	1:1000
Sin ADN	<50	<50	<50	56	62	8,6
Sin SFG	<50	<50	<50	12	47	-91
MFG-lac-z	<50	<50	<50	66	56	64
SFG.IL-12p35	<50	<50	<50	65	76	45
SFG.IL-12p40	<50	<50	<50	94	84	38
2X infección ^a	199,7	234,2	137,2	1	1	-84
2X transfección ^b	244,7	118,8	<50	12	-3	-2
A	86,5	<50	<50	44	60	46
B	253,8	<50	<50	41	12	-14
C	189,2	57,0	<50	43	42	47
D	297,8	600,1	301,2	-48	-143	-93

Estos datos son de uno de tres ensayos separados.

a. Células diana infectadas secuencialmente con virus pSFG.IL-12.p35 y luego pSFG.IL-12.p40 (conteniendo cada uno sólo el ADNc respectivo entre los sitios NcoI y BamHI)

b. Las células BOSC23 se transfectaron con una mezcla de constructos pSFG.IL-12.p35 y pSFG.IL-12.p40

Estos datos indican que la actividad de agonista de IL-12 estaba presente en los medios acondicionados mediante células infectadas con los constructos retrovirales de proteína de fusión. Se supone que esto resulta de la bioactividad de las proteínas de fusión respectivas secretadas.

Se demostró que las proteínas de fusión estaban presentes usando inmunotransferencia de tipo Western. Se recogieron los MA libres de suero de células CMS-5 de tipo natural o células CMS-5 que expresan IL-12 nativa o la proteína de fusión de IL-12 (SFG.IL-12.p35.IRES.p40 o SFG.IL-12.p40.ligador.Δp35), se filtraron (0,2 μm) y se almacenaron a -70°C. Se concentraron los MA 20-30 veces, e hicieron correr 20 μg de muestra de proteína total sobre geles de poliacrilamida al 10% con o sin β-mercaptoetanol al 10%. El anticuerpo primario era un anticuerpo anti-rmIL-12 de cabra policlonal (obsequio de D. Presky, Hoffman-La Roche, NJ). Se usó el sistema de detección "Renaissance" (NEN Dupont). Un análisis preliminar indicó que resultaba una señal 4 veces mayor del MA que contenía la proteína de fusión de IL-12 de una sola cadena (SFG.IL-12.p40.ligador.Δp35), y por tanto se cargaron 5 μg de muestra de proteína total de este MA. Los carriles control fueron MA de células de tipo natural sin o con adición de 50 ng de rmIL-12.

Ejemplo 5

Análisis de hibridación de tipo Southern del ADN genómico de células CMS-5 infectadas

Se realizó el análisis de hibridación de tipo Southern del ADN genómico de las poblaciones de células CMS-5 infectadas para demostrar la presencia de una banda de hibridación de acuerdo con la infección de estas células por retrovirus de la estructura esperada, y para determinar la eficacia de la infección viral (mediante la determinación del número de copias retrovirales por genoma).

A partir de estos digestos de NheI del ADN genómico, se predijo una banda de hibridación derivada de retrovirus de 985 pb más el tamaño del inserto clonado en los sitios NcoI-BamHI de SFG (véase la figura 1). El tamaño de los diversos fragmentos clonados fue: ADNc de IL-12.p35, 0,6 kb; ADNc de IL-12.p40, 1,0 kb; IRES, 0,7 kb; ligador, 0,05 kb; la supuesta secuencia líder deletcionada en dos constructos fue de 0,066 pb.

Los sobrenadantes de células BOSC23 dieron como resultado números de copias virales de entre 0,1 y 1,4 copias/genoma (principalmente 0,1-0,3 copias/genoma) para todos los constructos excepto para los constructos que contenían IRES, en los que no se observó ninguna banda de hibridación del tamaño esperado (3,2 kb) (tabla 2).

De interés particular son los resultados comparativos para los constructos de retrovirus de proteínas de fusión de IL-12 en estas poblaciones de células infectadas. Aunque el retrovirus pSFG.IL-12.p35.ligador.p40 estaba presente a 1,4 copias/genoma, esto se correspondía con un nivel relativamente bajo de producción de IL-12 bioactiva (tabla 2). Sin embargo, el retrovirus SFG.IL-12.p40.ligador.Δp35 dio como resultado un nivel relativamente alto de bioactividad de IL-12, aunque estaba presente a 0,2 copias/genoma.

TABLA 2

Número de copias de retrovirus en células CMS-5 infectadas por retrovirus SFG-IL-12

Constructo SFG.IL-12 que contiene:	Número ^a de copias de retrovirus
Nil	0
IL-12.p35	0,1
IL-12.p40	0,3
Infección secuencial (p35/p40)	0,3/0,3
Co-transfección (p35/p40)	0,1/0,1
IL-12.p35-IRES-p40	<<0,1 ^b
IL-12.p40-IRES-p35	<<0,1 ^b
IL-12.p35.ligador.p40	1,4 ^b
IL-12.p40.ligador.p35	0,1 ^b
IL-12.p35.ligador.Δp40	0,4 ^b
IL-12.p40.ligador.Δp35	0,2 ^b
Control de 1 copia	1,0 ^b
Control de 0,1 copia	0,1 ^b

^a Con respecto a un control de números de copias de plásmido de 13,5 pg de pSFG.IL-12.p35.ligador.p40, calculado para ser equimolar con respecto a 1 copia/genoma para 10 μg de ADN genómico.

^b Media de los resultados de una transferencia de tipo Southern sondeada en primer lugar con una sonda radiomarcada con p35 y luego con una marcada con p40. Se cuantificó la intensidad relativa de las señales usando un generador de imágenes de fósforo BAS-II de Fuji.

Ejemplo 6

Comparación de la inmunoterapia de tumores CMS-5 inmunógenos establecidos con las células tumorales secretoras de GM-CSF y secretoras de IL-12

Células tumorales secretoras de citocinas

Se usaron retrovirus SFG generados mediante líneas celulares de empaquetamiento con CRE o CRIP para la transducción de células tumorales. La cantidad de citocina secretada *in vitro* por las células tumorales usadas en estos estudios fue (en ng/ml/48 h/10⁶ células irradiadas [todas recogidas en 10 ml]): células infectadas con SFG.GM-CSF empaquetado con CRIP, B16>250, CMS-5>250; células infectadas con SFG.p35.IRES.p40.IL-12 empaquetado con CRE, B16 1-3, CMS-5 60-400; células infectadas con SFG.IL-12.p40.ligador.Δp35 empaquetado con CRE, CMS-5 490-950; células infectadas con SFG.IL-12.p35.IRES.p40 empaquetado con CRIP, B16 90; y células infectadas con SFG.IL-12.p40.ligador.Δp35 empaquetado con CRIP, B16 170 y RENCA 45. Se irradiaron las células tumorales para evitar la formación de tumores adicionales a partir de las mismas tras la inyección en ratones, y se caracterizó la secreción de citocinas para las mismas células irradiadas. Se determinaron las concentraciones de GM-CSF de los medios acondicionados (MA) mediante ELISA (Endogen, Cambridge) y los niveles de IL-12 mediante un bioensayo basado en la proliferación de los esplenocitos cebados con concanavalina-A e interleucina-2 (Schoenhaut *et al.* J. Immunol 148:3433 (1992)).

En un procedimiento inicial se iniciaron los tumores de fibrosarcoma con 2 x 10⁵ células tumorales CMS-5 inyectadas por vía subcutánea en el lomo de ratones BALB/C singénicos, y se comenzó la inmunoterapia (células tumorales secretoras de IL-12 o secretoras de GM-CSF, de tipo natural irradiadas) o bien 7 o bien 14 días más tarde. En este experimento, se dividieron los ratones en múltiples grupos de 5 a 10 ratones que recibieron o bien 1, 2 o bien 3 dosis semanales de inmunoterapia a o bien 1 x 10⁶ o bien 5 x 10⁶ células/dosis. Sin embargo, el análisis primario se dividió sólo por el tipo de células utilizadas como inmunoterapia y el día en el que empezó el tratamiento, independientemente de otras variables del programa.

Los ratones tratados con células tumorales secretoras de IL-12 irradiadas mostraron una supervivencia libre de tumores a largo plazo significativamente mejor en comparación con los ratones no tratados o los ratones tratados con células tumorales secretoras de GM-CSF o de tipo natural, para programas de tratamiento que empiezan o bien 7 o bien 14 días tras la exposición al tumor (figuras 7A y 7B, p<0,05 para todas las comparaciones con la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12). Cuando se comenzaba la inmunoterapia 7 días tras el trasplante tumoral, gran parte de las ventajas de supervivencia de los ratones tratados con células tumorales secretoras de IL-12 se debía a la prevención del desarrollo de tumores tardíos (figura 7C, p<0,05 para todas las comparaciones mediante la prueba del rango logarítmico). Cuando la inmunoterapia se comenzaba 14 días tras el trasplante tumoral, gran parte de las ventajas de supervivencia se debía a la regresión de tumores establecidos (figuras 7C, 7D y 8, p<0,005 en comparación con ratones que recibían inmunoterapia de células tumorales secretoras de GM-CSF o de tipo natural). El tamaño de los tumores palpables que remitieron en ratones que recibieron inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 oscilaba desde 1 hasta 8,5 mm de diámetro promedio, y llegaron a no ser palpables 20-43 días (30 días de media) tras el trasplante tumoral. El número de animales por grupo era respectivamente: 7A y 7B, 137, 40, 40, 38; y 7C y 7D, 18, 39, 40, 40. Los valores de p facilitados son para la diferencia mínima significativa entre el tratamiento con células secretoras de IL-12 y otros grupos. Para determinar el efecto global, se reunieron los datos de otros grupos que recibieron células de inmunoterapia similar mediante varios programas.

Los análisis de subgrupos de tratamientos que comenzaron en el día 14 sugerían que la supervivencia superior de la inmunoterapia con células tumorales que secretaban IL-12 resultaba de programas con más de una dosis semanal de inmunoterapia (p = 0,1), dosis de 5 x 10⁶ en lugar de 1 x 10⁶ células secretoras de IL-12 (p<0,02). Por eso, en todos los experimentos posteriores que utilizan células tumorales transducidas, los regímenes de inmunoterapia comprendían la dosis celular más alta administrada semanalmente durante 4 semanas.

Análisis estadísticos

Se realizaron todos los análisis basándose en la invención para tratar en el momento de la distribución aleatoria de los ratones en grupos. Se calcularon los datos estadísticos descriptivos para los principales criterios de valoración. Excepto cuando se indique lo contrario, las diferencias en el criterio de valoración de la supervivencia se evaluaron mediante la prueba de suma de rangos de Wilcoxon. Para los análisis de supervivencia, las muertes ocasionales inmediatamente tras la anestesia y el tratamiento se trataron como acontecimientos censurados. Se usó la prueba de chi cuadrado para medir la asociación de variables categóricas. Cuando los valores de p resumen las comparaciones entre múltiples grupos, sólo se facilita el valor de p más grande. Se realizaron los análisis usando software de JMP en un ordenador Power Macintosh 6100/60.

Ejemplo 7

Estudio de los mecanismos de regresión tumoral inducida por IL-12 y supervivencia mejorada

Con el fin de determinar si la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 era eficaz contra cargas tumorales más grandes, se establecieron tumores con 4 x 10⁵ células tumorales, que, en comparación con 2 x 10⁵

células, daban como resultado una incidencia tumoral mayor (tasas de palpabilidad en el día 14 de 98/100 frente a 83/100 respectivamente), un tamaño tumoral medio más grande ($6,7 \pm 3,0$ frente a $3,7 \pm 2,4$ mm de diámetro en el día 14, respectivamente) y una supervivencia media más corta sin tratamiento (31 frente a 37 días). Tras el establecimiento de estos tumores más grandes, el 70% (7/10) de los ratones que portaban tumor tratados con inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 a partir del día 14 sobrevivieron con una regresión tumoral completa, en comparación con los 0/10 ratones tratados con células tumorales de tipo natural ($p \leq 0,001$).

La administración sistémica de IL-12 (por vía intraperitoneal) a los ratones que portaban tumores iniciados mediante 2×10^5 células CMS-5 también daba como resultado la regresión de los tumores establecidos (figura 9) y mejoraba la supervivencia (4/5 a los 90 días para ratones tratados con $0,1 \mu\text{g/d}$, en comparación con 0/5 para ratones tratados con placebo). Para los ratones con tumores establecidos a partir de 2×10^5 células, una dosis de IL-12 de $0,1 \mu\text{g/d}$ (supervivencia de 4/5) era superior a 1 (supervivencia de 3/5), $0,01$ (supervivencia de 1/5) y $0,001 \mu\text{g/d}$, para regímenes que empezaban o bien 7 o bien 14 días tras el trasplante tumoral.

Por tanto era posible que la regresión de los tumores en ratones que recibieron inmunoterapia con células secretoras de IL-12 no dependiera de la liberación local de IL-12 en el sitio de las células tumorales irradiadas administradas como inmunoterapia, sino más bien de un efecto sistémico de la IL-12. Esto se evaluó comparando diferentes programas que empezaban el día 14 que combinaban inmunoterapia de células tumorales o bien secretoras de IL-12 o bien de tipo natural y terapia sistémica o bien con IL-12, placebo o bien nada. En los ratones con tumores iniciados mediante 2×10^5 células CMS-5, había una tendencia por una supervivencia global y media a ser mejor para la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 que para la terapia sistémica con IL-12 (figura 10A). Esta tendencia era estadísticamente significativa para ratones con tumores iniciados mediante 4×10^5 células (figura 10B, $p = 0,006$ comparando grupos que recibieron IL-12 sistémica (o bien sola o bien en combinación con células de tipo natural) frente a ratones que recibieron inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 (o bien sola o bien con terapia sistémica con diluyente)). Las comparaciones de grupos más pequeños, tratados de manera uniforme ($n = 10/\text{grupo}$, tumores iniciados mediante 4×10^5 células) indicaban que combinar la administración de células de tipo natural con IL-12 sistémica no era diferente a la terapia sistémica con IL-12 sola ($p = 0,85$) y parecía inferior a la vacunación con células tumorales secretoras de IL-12 solas ($p = 0,04$) o administrada con terapia sistémica con placebo ($p = 0,19$).

Ejemplo 8

Efecto antitumoral de la proteína de fusión de IL-12

En el modelo tumoral CMS-5 preexistente, la inmunoterapia con células tumorales CMS-5 que expresaban la proteína de fusión de IL-12 SFG.IL-12.p40.ligador. $\Delta p35$ era tan eficaz como el tratamiento con células tumorales que producen IL-12 nativa (figuras 11A y 11B). Para los ratones con tumores iniciados mediante o bien 2×10^5 o bien 4×10^5 CMS-5, la supervivencia era superior al 90% para los grupos de ratones tratados con células CMS-5 que secretan cualquier forma de IL-12 en comparación con menos del 40% para los ratones que no recibieron ningún tratamiento, o tratamiento con células secretoras de GM-CSF o de tipo natural ($p \leq 0,02$).

Ejemplo 9

Comparación de la inmunoterapia de tumores B16 no inmunógenos establecidos con células tumorales secretoras de GM-CSF y secretoras de IL-12

Con el fin de evaluar la eficacia de la inmunoterapia con células tumorales secretoras de IL-12 en otro modelo tumoral, se estudió el melanoma B16 no inmunógeno. Se transdujeron células tumorales B16 para producir la IL-12 nativa a $90 \text{ ng/ml/}48 \text{ h/}10^6$ células irradiadas o la IL-12 de una sola cadena (SFG.IL-12.p40.ligador. $\Delta p35$) a $170 \text{ ng/ml/}48 \text{ h/}10^6$ células irradiadas. Se iniciaron tumores B16 con 4×10^5 células y se comenzó la inmunoterapia de tumores establecidos o bien en el día 7 (palpabilidad tumoral del 25%) o bien el día 14 (palpabilidad tumoral del 93%, diámetro tumoral medio $5,74 \pm 3,23$, $n = 56$). Se analizó este procedimiento tras 31 días de seguimiento, cuando sólo sobrevivieron 1/60 (2%) de los ratones que se trataron con células de tipo natural, células secretoras de GM-CSF o nada como inmunoterapia. Aunque los ratones tratados con células secretoras de IL-12 tenían de manera análoga una mala supervivencia global, su supervivencia media se prolongó significativamente en comparación con la de los ratones control tratados con células de tipo natural cuando el tratamiento comenzaba en el día 7 (figura 12A, 24 frente a 18 días, $p = 0,01$) y el día 14 (figura 12B, 28 frente a 18 días, $p = 0,0005$). De manera similar, la supervivencia media se prolongó con el tratamiento con células tumorales secretoras de proteína de fusión de IL-12 cuando se comenzaba el tratamiento en el día 7 (21 frente a 18 días, $p = 0,08$) y el día 14 (24 frente a 18 días, $p = 0,006$). En 3/4 ocasiones, las células tumorales secretoras de IL-12 fueron superiores a las células secretoras de GM-CSF (con respecto a los valores de p 0,01, 0,14, 0,003, 0,02).

Dado el potente efecto de las células B16 secretoras de GM-CSF para inducir inmunidad antitumoral cuando se usan como vacuna antes de la exposición tumoral, pero su falta de efecto sobre el crecimiento tumoral cuando se administran tras el establecimiento tumoral, se compararon los efectos de las células B16 secretoras de GM-CSF y secretoras de IL-12 como vacunas en un modelo de exposición a tumor B16. Las células B16 secretoras de IL-12 utilizadas en estudios iniciales secretaban IL-12 nativa a $1-3 \text{ ng/ml/}48 \text{ h/}10^6$ células irradiadas. Las células B16 secretoras de GM-CSF inducían inmunidad antitumoral cuando se usaban como vacunas antes del trasplante tumoral (figura 12C, supervivencia del 80% en el día 100).

Ejemplo 10

Efecto inmunoterapéutico del suministro de IL-12 por las células tumorales de diferente origen del tumor que va a tratarse

Se evaluó el efecto sobre la supervivencia del suministro de IL-12 por las células tumorales de diferente origen del tumor que va a tratarse en tumores de carcinoma de células renales (RENCA). Se iniciaron tumores RENCA con 4×10^5 células, y se comenzó la inmunoterapia de los tumores establecidos en el día 14. En un procedimiento, se trataron los grupos de ratones o bien con células tumorales CMS-5 o bien con células CMS-5 de tipo natural irradiadas transducidas para secretar o bien la IL-12 nativa o bien la proteína de fusión SFG.IL-12.p40.ligador. Δ p35 (figura 13A). En otro procedimiento, se trataron grupos adicionales de ratones con una combinación de células de tipo natural RENCA y CMS-5 irradiadas, una combinación de células tumorales RENCA secretoras de IL-12 y CMS-5 de tipo natural irradiadas o una combinación de células tumorales CMS-5 secretoras de IL-12 y células tumorales RENCA de tipo natural irradiadas (figura 13B).

En el primer procedimiento, la inmunoterapia tanto con células tumorales CMS-5 que secretan la IL-12 nativa como con proteína de fusión de IL-12 prolongaba la supervivencia media (valores de p de $p = 0,02$ y $p = 0,06$, respectivamente). En el segundo procedimiento, los ratones tratados con una combinación de células tumorales RENCA irradiadas y células tumorales CMS-5 secretoras de IL-12 mostraban una tendencia hacia una supervivencia aumentada.

Adicionalmente, se iniciaron tumores CMS-5 con 4×10^5 células, y se comenzó la inmunoterapia de los tumores establecidos en el día 14. En un procedimiento, se trataron los tumores CMS-5 establecidos o bien con células tumorales RENCA de tipo natural irradiadas o bien con células tumorales RENCA transducidas para secretar o bien la IL-12 nativa o bien la proteína de fusión de IL-12 SFG.IL-12.p40.ligador. Δ p35 (figura 14A). En otro procedimiento, se trataron grupos adicionales de ratones con una combinación de células de tipo natural RENCA y CMS-5 irradiadas, una combinación de células tumorales RENCA secretoras de IL-12 y CMS-5 de tipo natural irradiadas o una combinación de células tumorales RENCA de tipo natural irradiadas y células tumorales CMS-5 secretoras de IL-12 (figura 14B).

En el primer procedimiento, la inmunoterapia con células RENCA que secretan la proteína de fusión de IL-12 prolongaba moderadamente la supervivencia de los ratones en comparación con los ratones tratados con células RENCA de tipo natural; el efecto concordaba con la dosis inferior de IL-12 suministrada por las células RENCA transducidas. En el segundo procedimiento, tanto los ratones tratados con una combinación de células CMS-5 secretoras de IL-12 y células RENCA de tipo natural como los ratones tratados con una combinación de células CMS-5 secretoras de IL-12 y células RENCA de tipo natural mostraron una supervivencia significativamente prolongada (valores de p de $p = 0,004$ y $0,04$) en comparación con los ratones tratados con células RENCA de tipo natural y CMS-5 de tipo natural.

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando nada más que la experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento. Las siguientes reivindicaciones pretenden abarcar tales equivalentes.

REIVINDICACIONES

1. ADN que comprende ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12, ADN que codifica para un ligador polipeptídico y ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12, en el que el ADN que codifica para el ligador polipeptídico está situado entre el ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12 y el ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12 y en el que la expresión del ADN da como resultado la producción de una proteína de fusión de IL-12 bioactiva que comprende la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 unidas mediante el ligador polipeptídico codificado.
2. ADN según la reivindicación 1, en el que la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 son de origen humano o de ratón y el ligador polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 5-7.
3. ADN según la reivindicación 1, que codifica para una proteína IL-12 bioactiva, en el que la proteína IL-12 bioactiva comprende la subunidad p35 de IL-12 nativa y la subunidad p40 de IL-12 nativa unidas mediante un ligador polipeptídico.
4. ADN según la reivindicación 3, en el que el ligador polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 5-7.
5. Proteína IL-12 bioactiva que comprende la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 unidas mediante un ligador polipeptídico.
6. Proteína de fusión de IL-12 bioactiva según la reivindicación 5 y codificada por el ADN según la reivindicación 1, 2 ó 3.
7. Proteína IL-12 bioactiva según la reivindicación 5, en la que la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 son de origen humano o de ratón y el ligador polipeptídico es de 7 a 16 residuos de aminoácido.
8. Proteína IL-12 bioactiva según la reivindicación 7, en la que el ligador polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 5-7.
9. Vector de expresión que comprende el ADN según la reivindicación 1.
10. Vector de expresión según la reivindicación 9, que es un vector retroviral.
11. Vector de expresión según la reivindicación 10, que comprende la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, tal como se expone en la figura 3.
12. Vector de expresión según la reivindicación 11, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes polipéptidos: la subunidad p35 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₂Ser; y la subunidad p40 de IL-12.
13. Vector de expresión según la reivindicación 11, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes polipéptidos: la subunidad p40 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₃; y la subunidad p35 de IL-12.
14. Vector de expresión según la reivindicación 11, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes polipéptidos: la subunidad p35 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₃; y la subunidad p40 de IL-12 con los primeros 22 aminoácidos delecionados.
15. Vector de expresión según la reivindicación 11, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes péptidos: la subunidad p40 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₃; y la subunidad p35 de IL-12 con los primeros 22 aminoácidos delecionados.
16. Método de producción de una proteína IL-12 bioactiva que comprende las etapas de:
 - a) proporcionar un vector de expresión que comprende ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12, ADN que codifica para un ligador polipeptídico y ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12, en el que el ADN que codifica para el ligador polipeptídico está situado entre el ADN que codifica para la subunidad p35 de IL-12 nativa y el ADN que codifica para la subunidad p40 de IL-12 nativa;
 - b) introducir el vector de expresión en una célula huésped apropiada; y

ES 2 302 565 T3

c) mantener la célula huésped que resulta de la etapa (b) en condiciones apropiadas para la expresión del ADN presente en el vector de expresión, dando como resultado la producción de una proteína IL-12 bioactiva en la que las dos subunidades están unidas mediante el ligador polipeptídico.

17. Método según la reivindicación 16, en el que la subunidad p35 de IL-12 y la subunidad p40 de IL-12 son de origen humano o de ratón y el ligador polipeptídico es de 7 a 16 residuos de aminoácido.

18. Método según la reivindicación 17, en el que el ligador polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: las SEQ ID NO: 5-7.

19. Método según la reivindicación 16, en el que el vector de expresión es un vector retroviral.

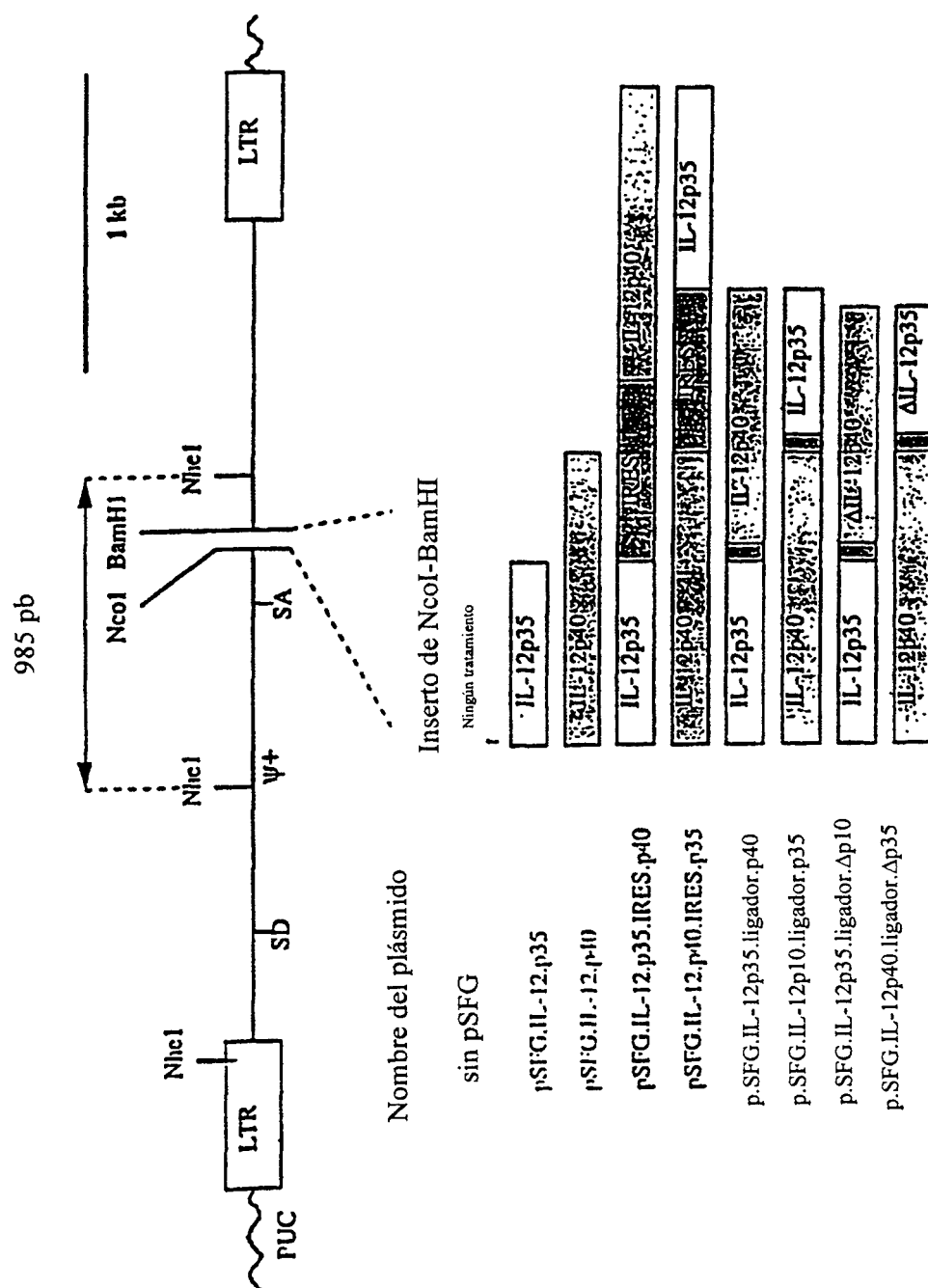
20. Método según la reivindicación 19, en el que el vector de expresión comprende la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, tal como se expone en la figura 3.

21. Método según la reivindicación 20 que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes polipéptidos: la subunidad p35 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₂Ser; y la subunidad p40 de IL-12.

22. Método según la reivindicación 20, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes polipéptidos: la subunidad p40 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₃; y la subunidad p35 de IL-12.

23. Método según la reivindicación 20, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes polipéptidos: la subunidad p35 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₃; y la subunidad p40 de IL-12 con los primeros 22 aminoácidos delecionados.

24. Método según la reivindicación 20, que comprende un inserto, entre los sitios de enzimas de restricción NcoI y BamHI de la estructura principal retroviral de pUC19-SFG, que codifica para los siguientes péptidos: la subunidad p40 de IL-12; un ligador (Gly₄Ser)₃; y la subunidad p35 de IL-12 con los primeros 22 aminoácidos delecionados.



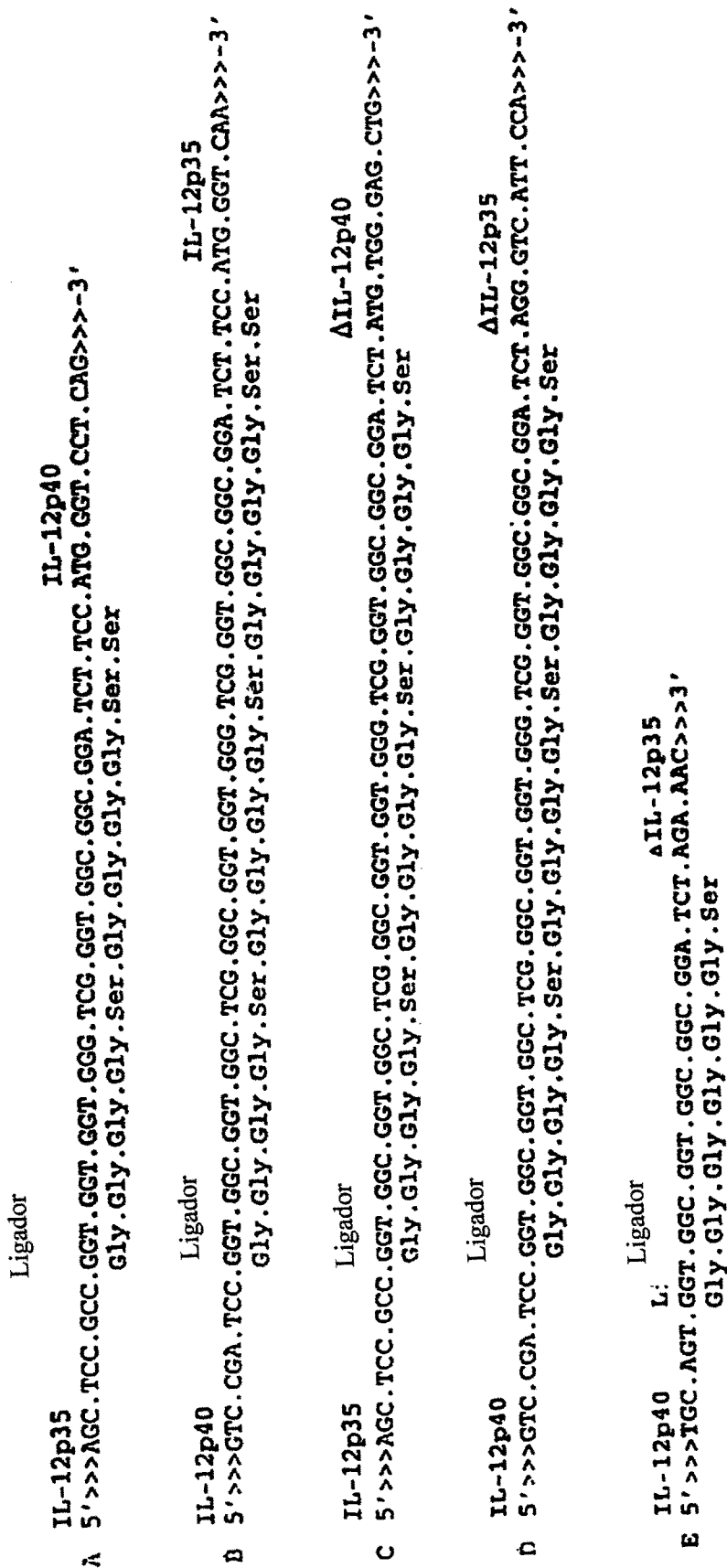


FIGURA 2

Posiciones de los sitios de endonucleasas de restricción (sitios únicos subrayados)

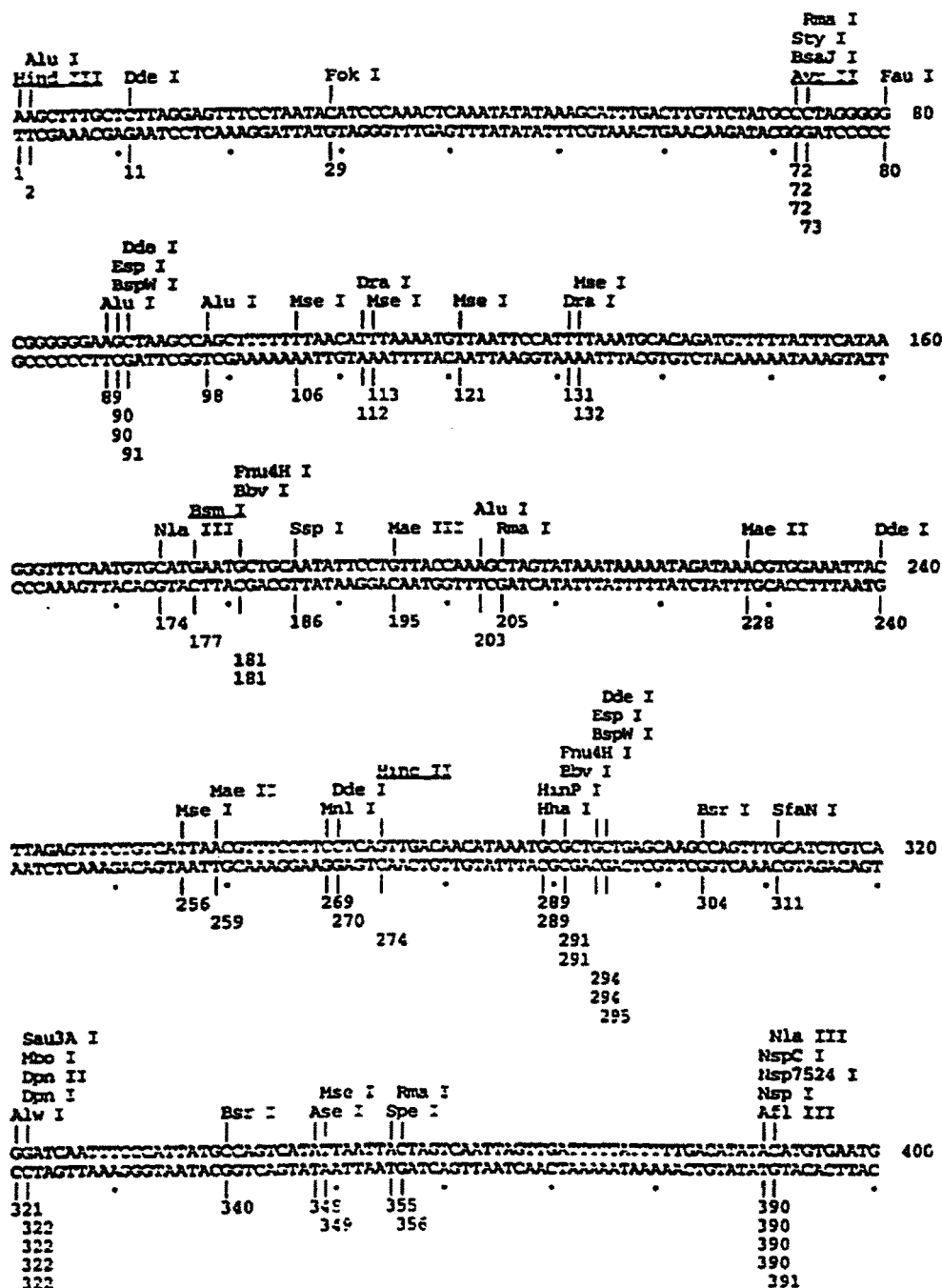


FIGURA 3A



ES 2 302 565 T3

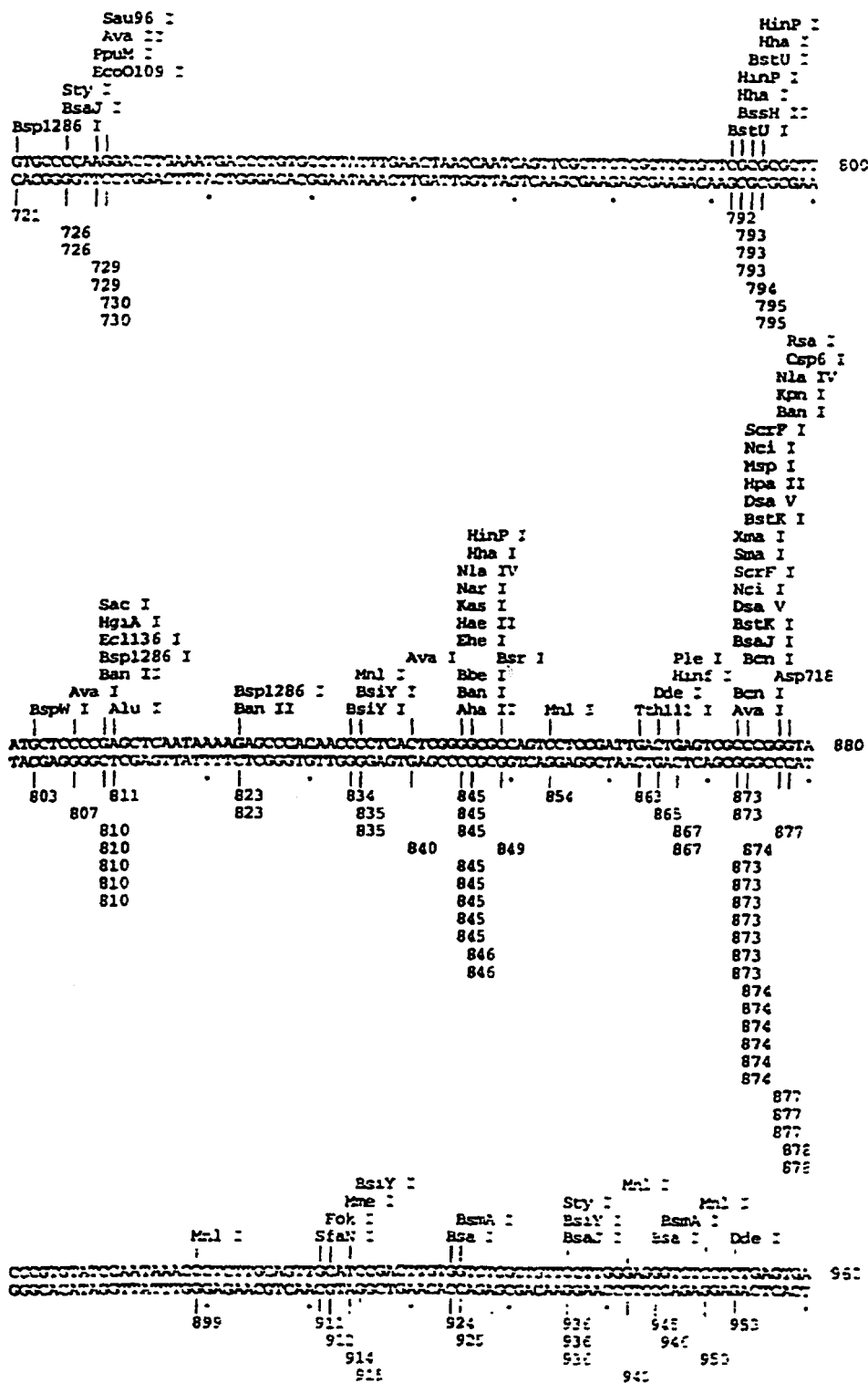


FIGURA 3C



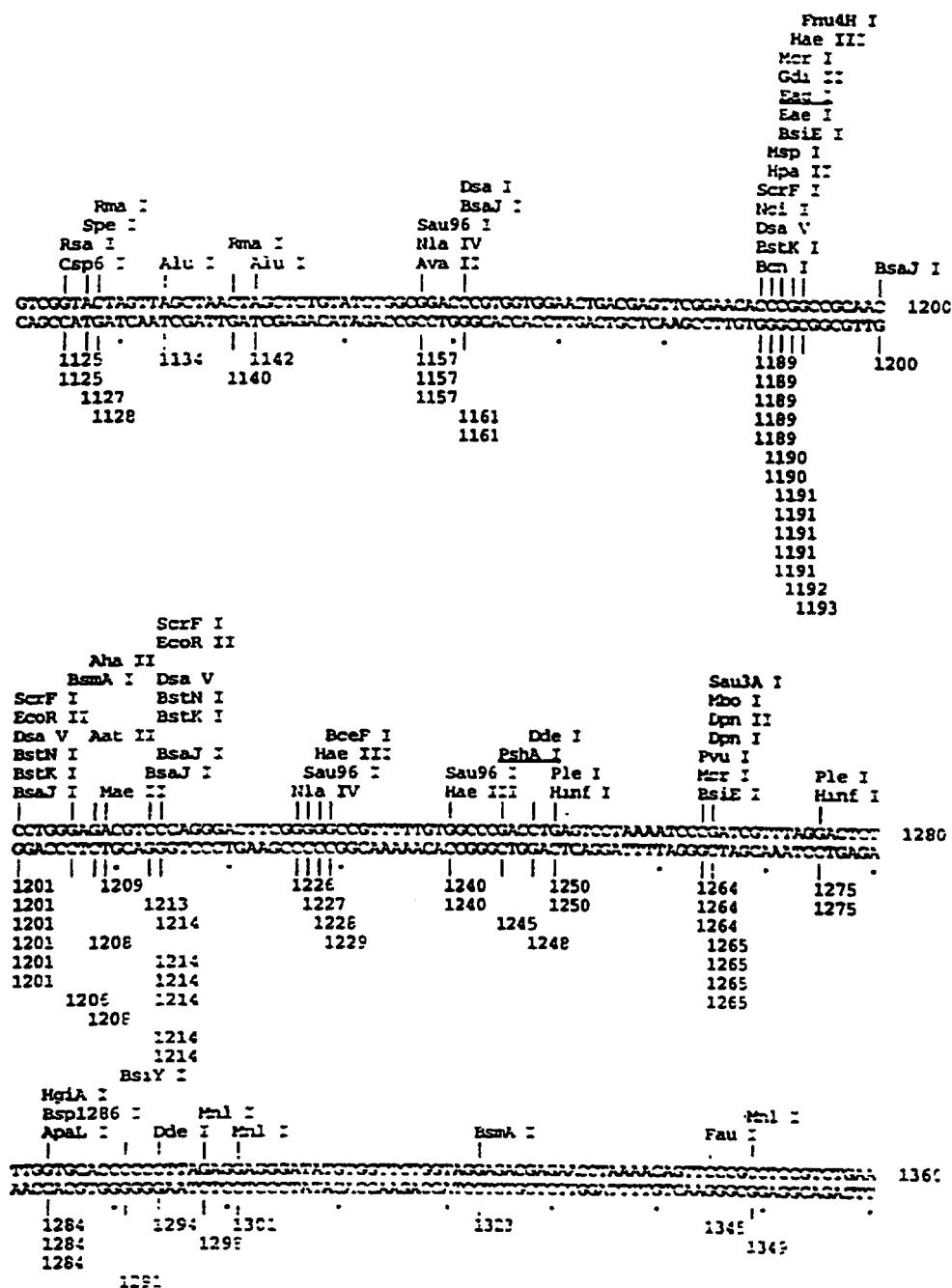


FIGURA 3E

ES 2 302 565 T3

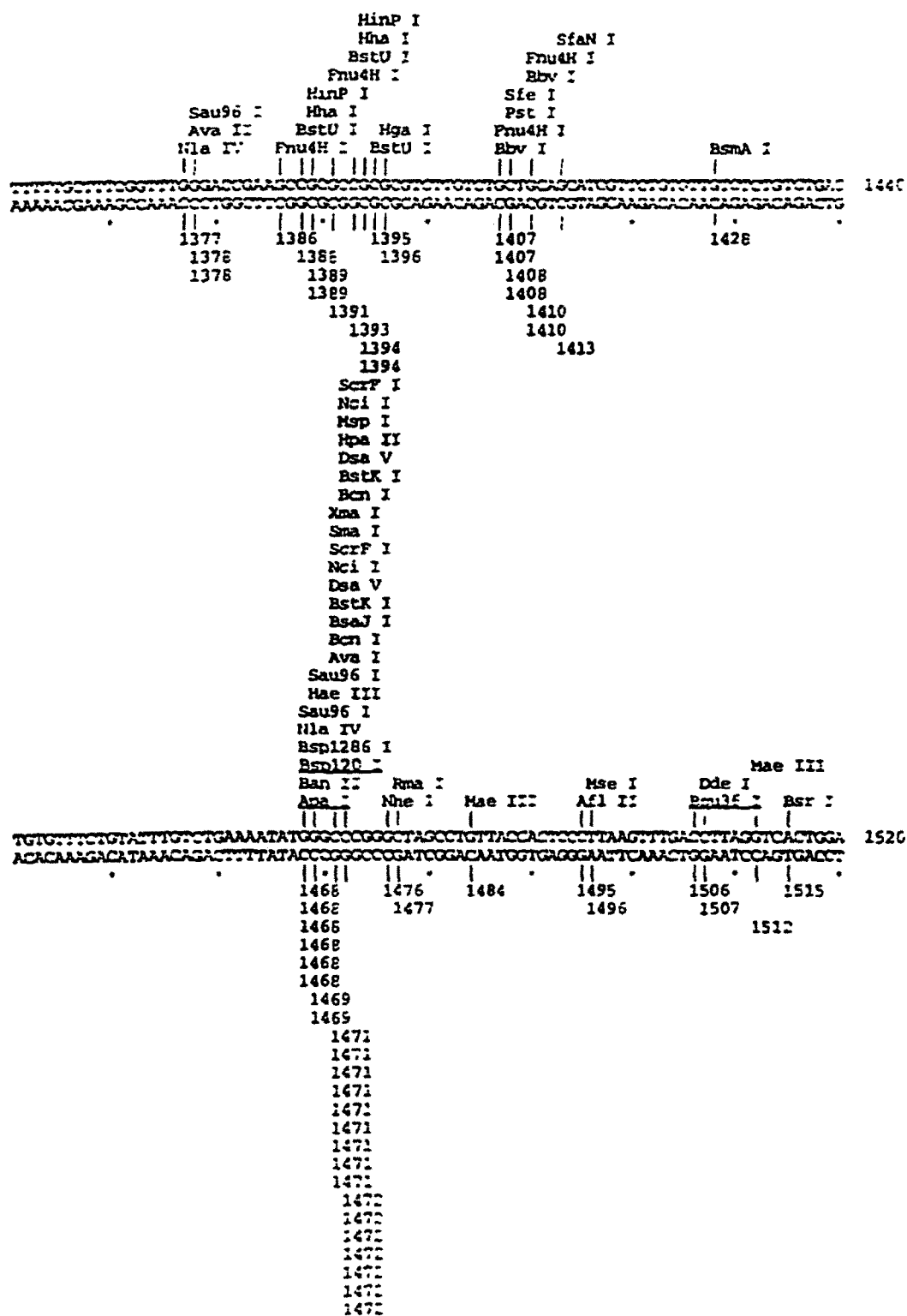


FIGURA 3F

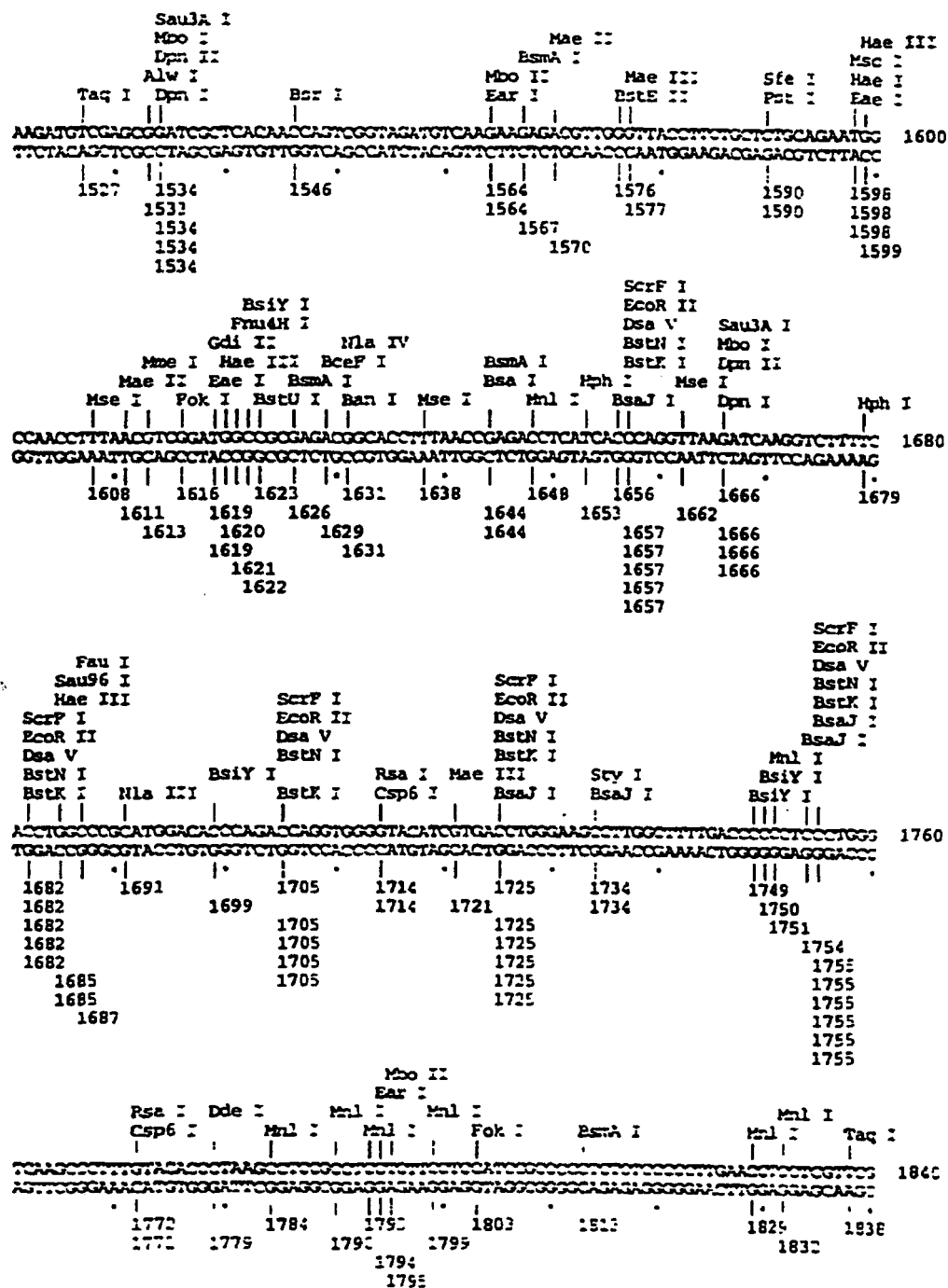


FIGURA 3G

28

ES 2 302 565 T3





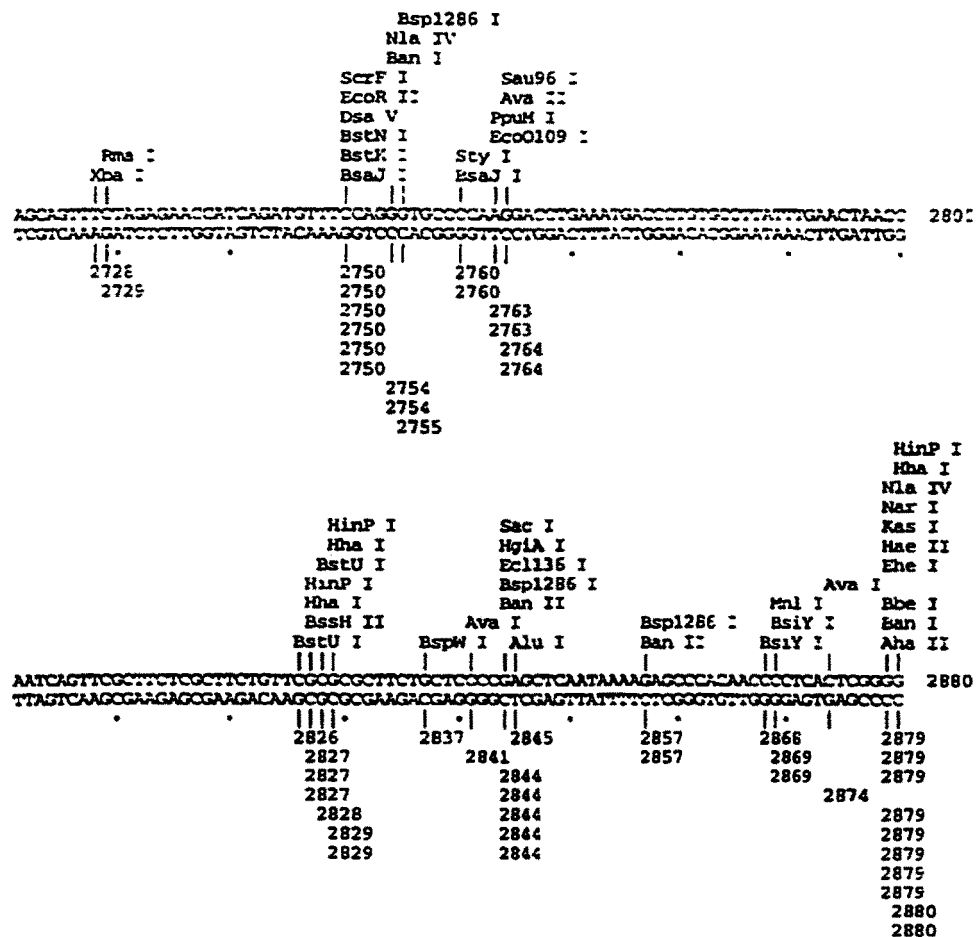


FIGURA 3K

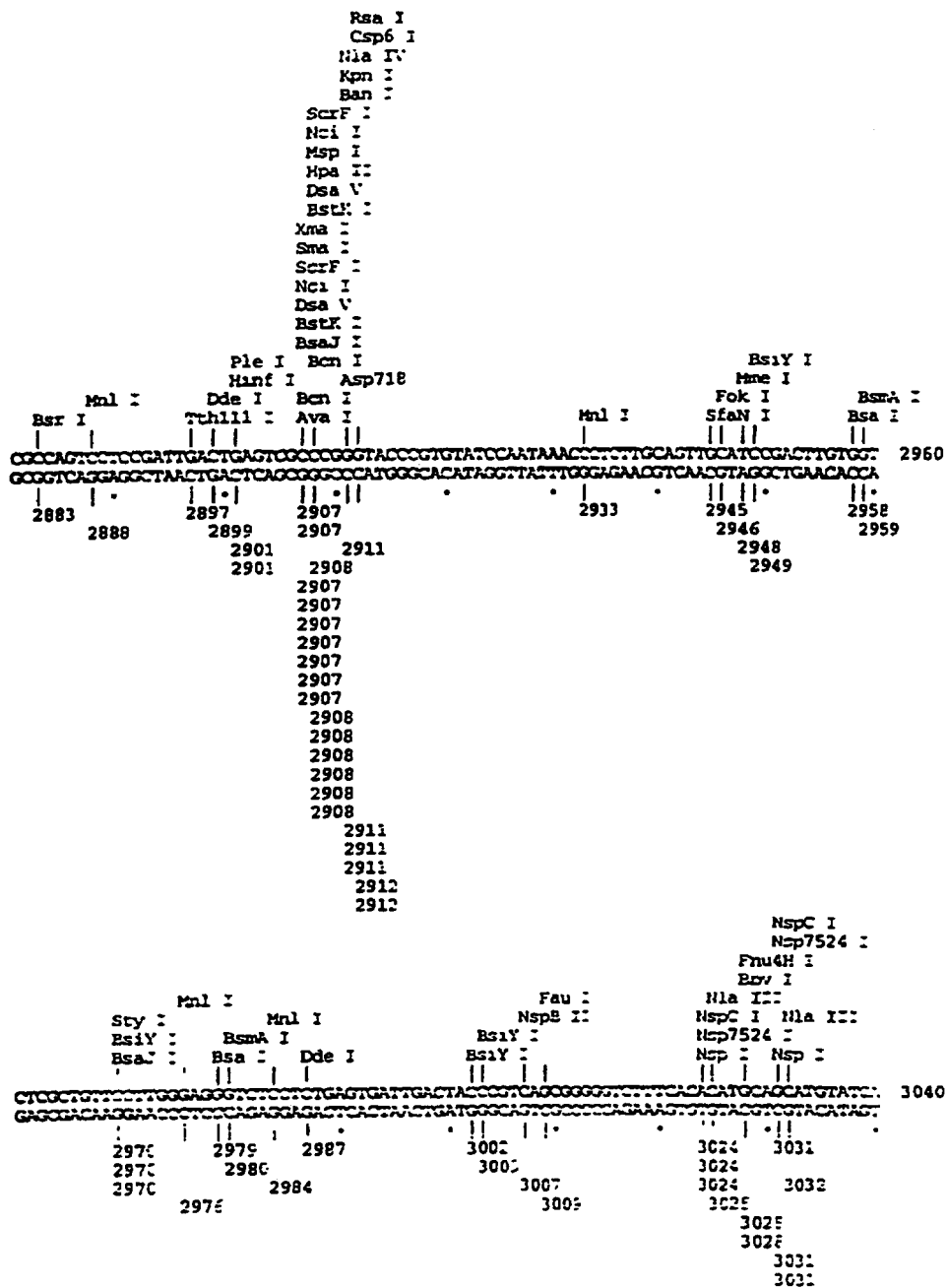


FIGURA 3L

ES 2 302 565 T3

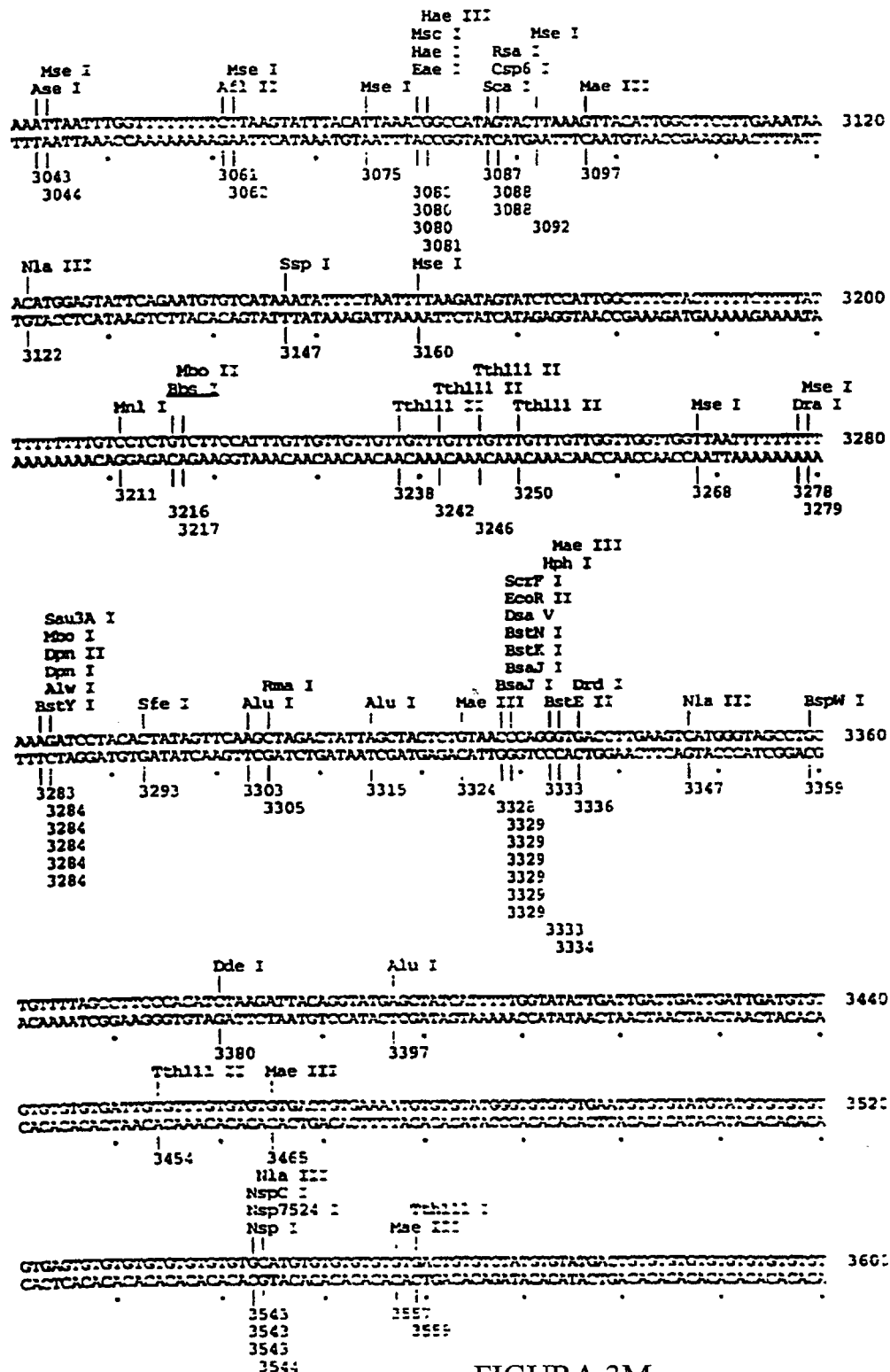


FIGURA 3M

ES 2 302 565 T3



35

ES 2 302 565 T3

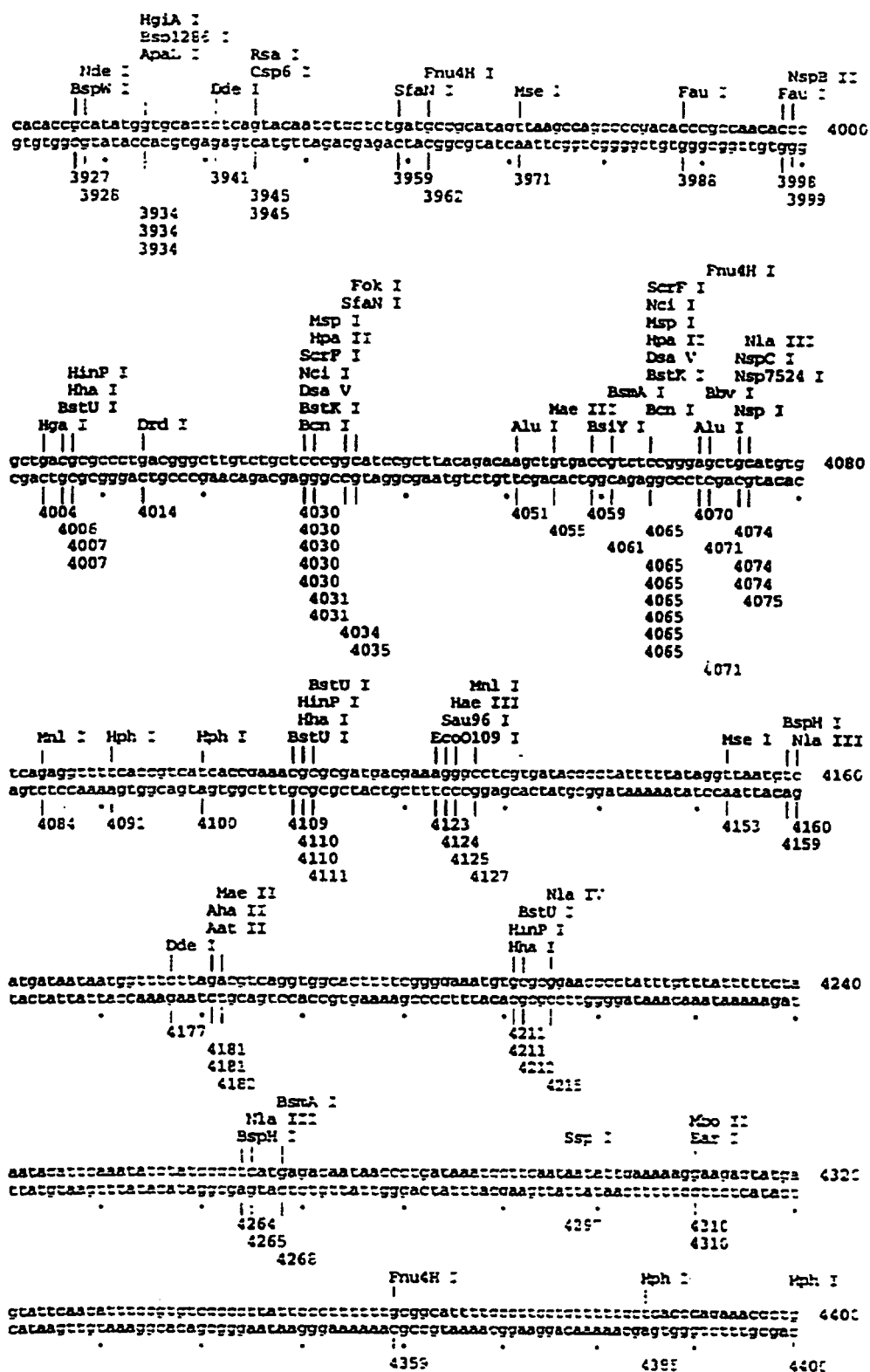


FIGURA 30

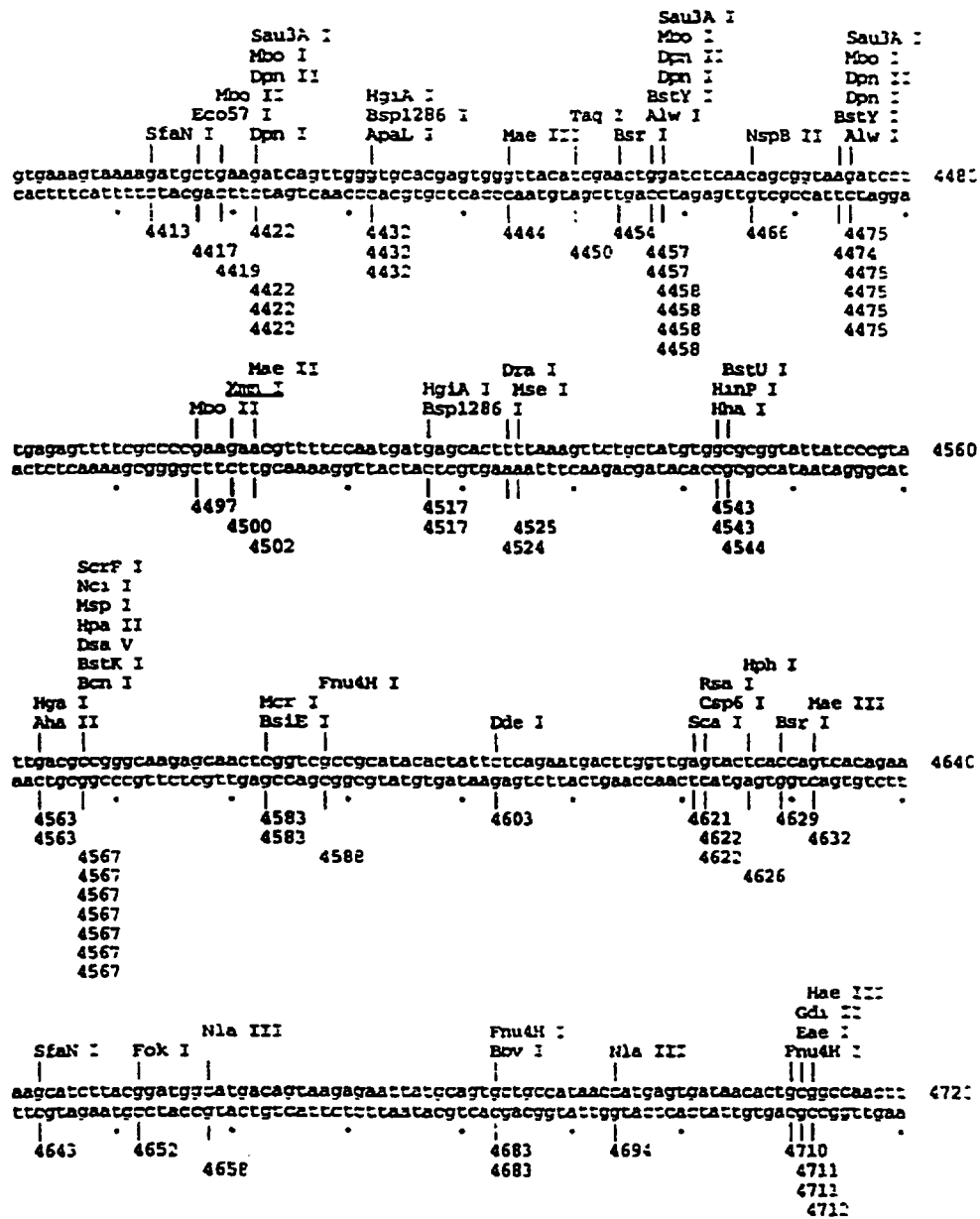


FIGURA 3P

ES 2 302 565 T3

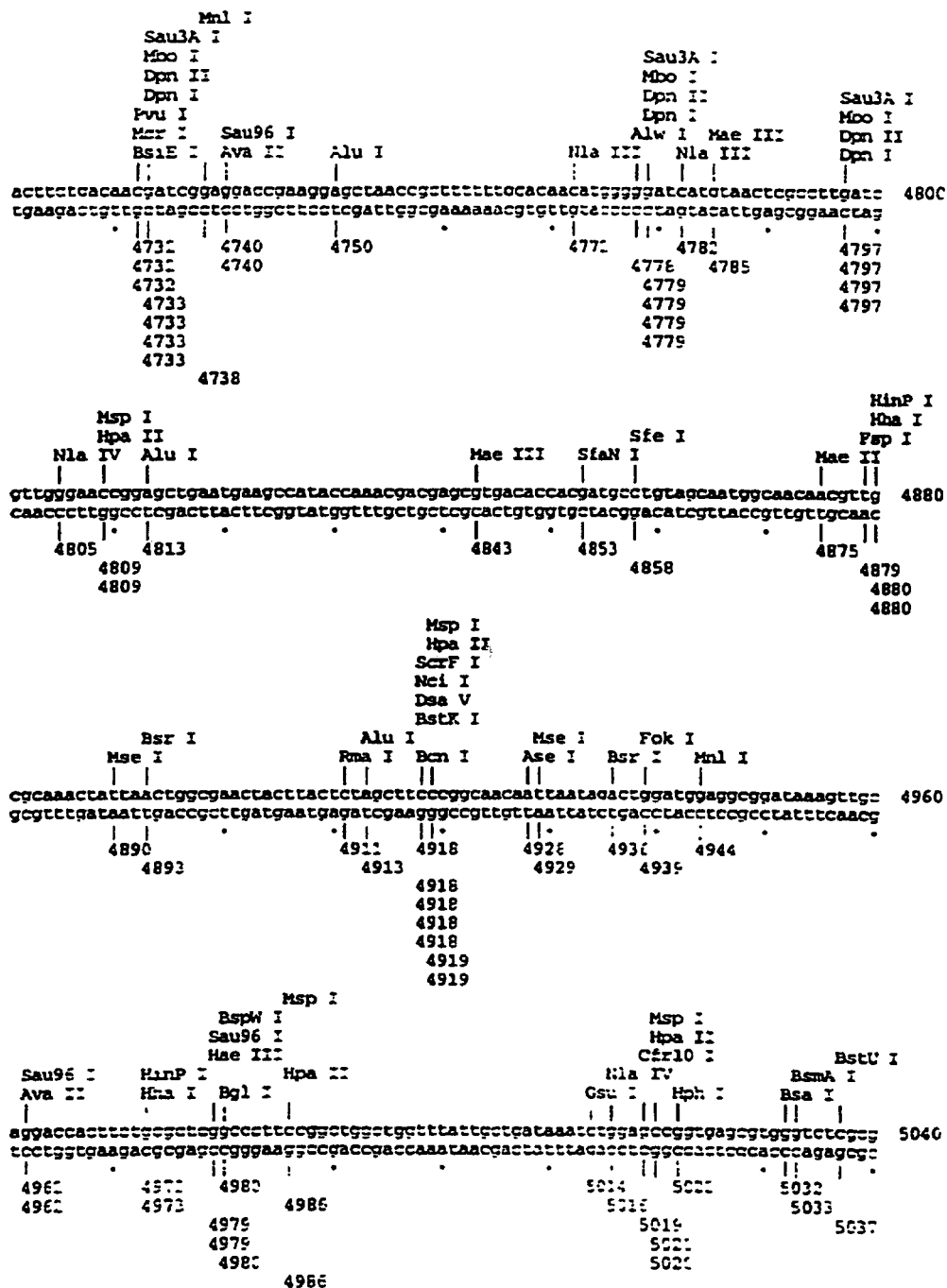


FIGURA 3Q

```

1  aagcttgggctgcaggctcgatcgactctagaggatcgatccccaccATGgGTCAATCAGG
   -----
   ttcgaaccgacgtccagctagctgagatctcctagctaggggtggTACCcAGTTAGTGC
                                     MetGlyGlnSerArg -

61  CTACCTCCTCTTTTGGCCACCCTTGGCCCTCCTAAACCACCTCAGTTTGGCCAGGGTCAT
   -----
   GATGGAGGAGAAAAACCGGTGGGAACGGGAGGATTGGTGGAGTCAAACCGGTCCCAGTA
b:  TyrLeuLeuPheLeuAlaThrLeuAlaLeuLeuAsnHisLeuSerLeuAlaArgValIle -

121  TCCAGTCTCTGGACCTGCCAGGTGTCTTAGCCAGTCCGAAACCTGCTGAAGACCACAGA
   -----
   AGGTCAGAGACCTGGACGGTCCACAGAATCGGTCCGGGCTTTGGACGACTTCTGGTGTCT
b:  ProValSerGlyProAlaArgCysLeuSerGlnSerArgAsnLeuLeuLysThrThrAsp -

181  /      ///
   TGACATGGTGAAGACGGCCAGAGAAAACTGAACCACTATTCCTGCCACTGCTGAAGACAT
   -----
   ACTGTACCACTTCTGCCGGTCTCTTTTGGACTTTGTAATAAGGACGTGACGACTTCTGTA
b:  AspMetValLysThrAlaArgGluLysLeuLysHisTyrSerCysThrAlaGluAspIle -

```

FIGURA 4A

ES 2 302 565 T3

```

241  CGATCATGAAGACATCACACGGGACCAACCAGCACATTGAAGACCTGTTTACCACTGGA
-----
GCTAGTACTTCTGTAGTGTGCCCTGGTTGGTCGTGTAACCTCTGGACAAATGGTGACCT 300
      |
b:   AspHisGluAspIleThrArgAspGlnThrSerThrLeuLysThrCysLeuProLeuGlu -

      /
301  ACTACACAAGAACGAGAGTTGCCTGGCTACTAGAGAGACTTCTTCCACAACAGAGGGAG
-----
TGATGTGTTCTTGCTCTCAACGGACCGATGATCTCTCTGAAGAAGGTGTTGTTCTCCCTC 360
      |
d:   LeuHisLysAsnGluSerCysLeuAlaThrArgGluThrSerSerThrThrArgGlySer -

      //      //      /
361  CTGCCTGCCCCACAGAAGACGTCTTTGATGATGACCTGTGCCTTGGTAGCATCTATGA
-----
GACGGACGGGGGTGCTTCTGCAGAACTACTACTGGGACACGGAACCATCGTAGATACT 420
      |
      CysLeuProProGlnLysThrSerLeuMetMetThrLeuCysLeuGlySerIleTyrGlu -

      //      //      /
421  GGACTTGAAGATGTACCAGACAGAGTCCAGGCCATCAACGCAGCACTTCAGAATCACAA
-----
CCTGAACTTCTACATGGTCTGTCTCAAGSTCCGGTAGTTGCGTCGTGAAGTCTTAGTGT 480
      |
      AspLeuLysMetTyrGlnThrGluPheGlnAlaIleAsnAlaAlaLeuGlnAsnHisAsn -

      //      //      /
481  CCATCAGCAGATCATTCTAGACAAGGGCATGCTGGTGGCCATCGATGAGCTGATGCAGTC
-----
GGTAGTCGTCTAGTAAGATCTGTTCCCGTACGACCCCGTAGCTACTCGACTACGTCAG 540
      |
      HisGlnGlnIleIleLeuAspLysGlyMetLeuValAlaIleAspGluLeuMetGlnSer -

```

FIGURA 4B

b: LeuAsnHisAsnGlyGluThrLeuArgGlnLysProProValGlyGluAlaAspProTyr -

ArcValLysMetLysLeuCysIleLeuLeuHisAlaPheSerThrArcValValThrIle -

661 GTTGTCCCTACCCGATAGACTCGAGGCGGACTcttaagtaactaggtgatc 713

$\times$ PBS $\textcircled{T_3}$

FIGURA 4C

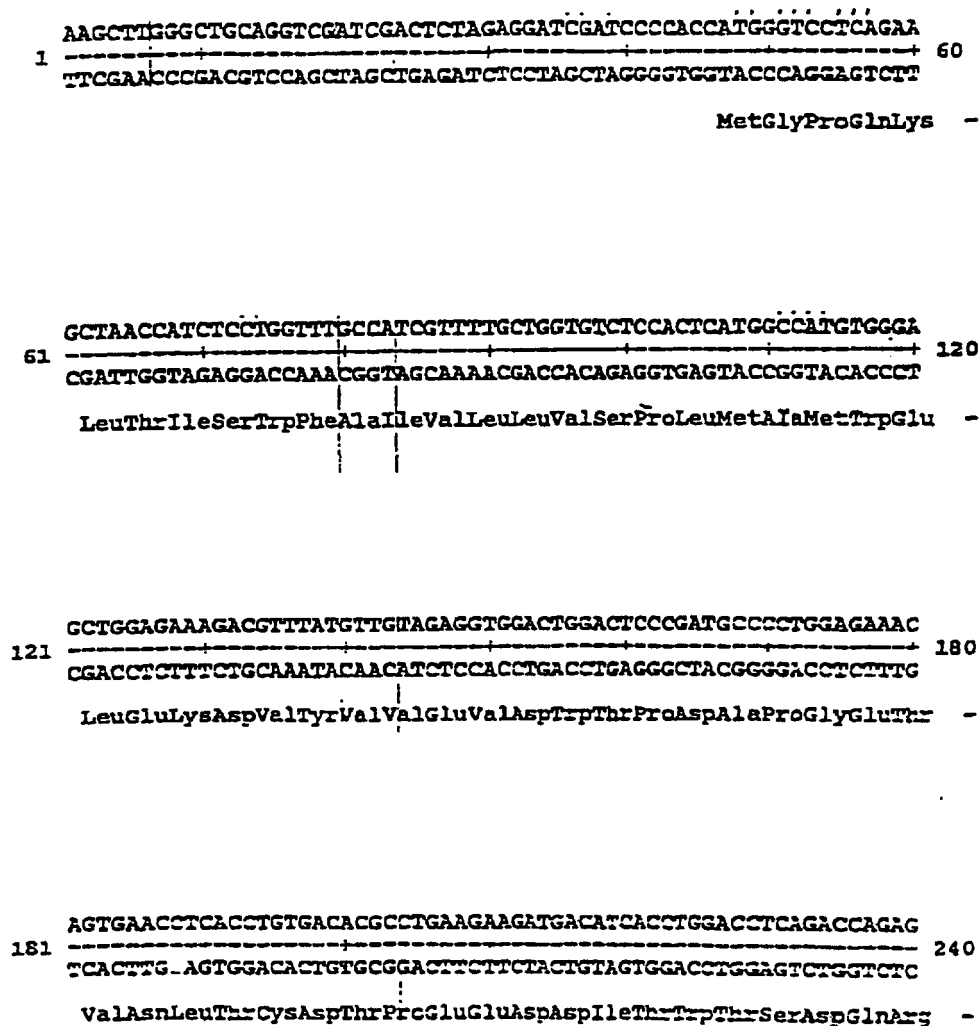


FIGURA 5A

```

ACATGGAGTCATAGGCTCTGGAAAGACCCTGACCATCACTGTCAAAGAGTTTCTAGATGC
241 ----- 300
TGTACCTCAGTATCCGAGACCTTTCTGGGACTGCTAGTGACAGTTTCTCAAAGATCTACG
HisGlyValIleGlySerGlyLysThrLeuThrIleThrValLysGluPheLeuAspAla -

TGGCCAGTACACCTGCCACAAAGGAGGCGAGACTCTGAGCCACTCACATCTGCTGCTCCA
301 ----- 360
ACCGGTCATGTGGACGGTGTTCCTCCGCTCTGAGACTCGGTGAGTGTAGACGACGAGGT
GlyGlnTyrThrCysHisLysGlyGlyGluThrLeuSerHisSerHisLeuLeuLeuHis -

CAAGAAGGAAAATGGAATTGGTCCACTGAAATTTAAAAAATTTCAAAAACAAGACTTT
361 ----- 420
GTTCTTCCTTTTACCTTAACACAGGTGACTTTAAAAATTTTAAAGTTTTTGTTCGAAA
LysLysGluAsnGlyIleTrpSerThrGluIleLeuLysAsnPheLysAsnLysThrPhe --

CCTGAAGTGTGAAGCACCAAATTAATCCGACGTTTCAAGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG
421 ----- 480
GGACTTCACACTTCGTGGTTTAATGAGGCGTCCAAAGTGCACGAGTACCGACCAAGTTTC
LeuLysCysGluAlaProAsnTyrSerGlyArgPheThrCysSerTrpLeuValGlnArg -

```

FIGURA 5B

481 AAACATGGACTTGAAATCAACATCAAGAGCAGTAGCAGTTCCCGA.TCTCGGGCAGT
 TTTGTACCTGAACTTCAAGTTGTAGTTCTCGTCATCGTCAAGGGGACTGAGAGCCCGTCA 540
 AsnMetAspLeuLysPheAsnIleLysSerSerSerSerSerProAspSerArgAlaVal -

541 GACATGTGGAATGGCGTCTCTGTCTGCAGAGAAGGTCACACTGGACCAAGGGACTATGA
 CTGTACACCTTACCGCAGAGACAGAGCTCTCTCCAGTGTGACCTGGTTTCCCTGATACT 600
 ThrCysGlyMetAlaSerLeuSerAlaGluLysValThrLeuAspGlnArgAspTyrGlu -

601 GAAGTATTCAAGTGTCTGCGCAGGAGGATGTCACCTGCCCACTGCCGAGGAGACCTGCC
 CTTTATAAGTCACAGGACGGTCTCTCTACAGTGGACGGGTGACGGCTCCTCTGGGACGG 660
 LysTyrSerValSerCysGlnGluAspValThrCysProThrAlaGluGluThrLeuPro -

661 CATTGAACTGGCGTTGGAAGCACGGCAGCAGATAAATATGAGAACTACAGCACCAGCTT
 GTAACTTGACCGCAACCTTCGTGCGTCTCTTATTATACTCTTGATGTCTGGTTCGAA 720
 IleGluLeuAlaLeuGluAlaArgGlnGlnAsnLysTyrGluAsnTyrSerThrSerPhe -

721 CTTCTCAGGGACATCATCAACCAGACCCGCCCAAGAACTTGACGATGAAGCCTTTGAA
 GAAGTAGTCCCTGTAGTAGTTTGGTCTGGGCGGGTTCTTGAACGTCTACTTCGGAAACTT 780
 PheIleArgAspIleIleLysProAspProProLysAsnLeuGlnMetLysProLeuLys -

— FIGURA 5C

```

781  GAACTCACAGGTGGAGGTCAGCTGGGAGTACCCTGACTCCTGGAGCACTCCCCATTCCTA
      CTTGAGTGTCCACCTCCAGTCGACCCCTCATGGGACTGAGGACCTCGTGAGGGGTAGGAT
      AsnSerGlnValGluValSerTrpGluTyrProAspSerTrpSerThrProHisSerTyr -
841  CTTCTCCCTCAAGTTCCTTGTTGGAATCCAGCGCAAGAAAGAAAAGATGAAGGAGACAGA
      GAAGAGGGAGTTCAAGAAACAAGCTTAGGTCCGCTTCTTTCTTTTCTACTTCCTCTCTCT
      PheSerLeuLysPhePheValArgIleGlnArgLysLysGluLysMetLysGluThrGlu -
901  GGAGGGGTGTAACCAGAAAGGTGCGTTCCTCGTAGAGAAGACATCTACCGAAGTCCAATC
      CCTCCCCACATTGGTCTTTCCACGCAAGGAGCATCTCTCTGTAGATGGCTTCAGGTTAC
      GluGlyCysAsnGlnLysGlyAlaPheLeuValGluLysThrSerThrGluValGlnCys -
961  CAAAGGCGGGAATGTCTGCGTGCAAGCTCAGSATCGCTATTACAATTCTCATGCAGCAA
      GTTTCGGCCCTTACAGACGGACGTTCCGAGTCTTAGCGATAATGTTAAGGAGTACGTCGTT
      LysGlyGlyAsnValCysValGlnAlaGlnAspArgTyrTyrAsnSerSerCysSerLys -
1021 GTGGGCATGTGTTCCCTGCAGGGTCCGATCCTAGGAAATTC
      CACCCSTACACAAGGGACGTCCTCCAGGCTAGGATCTTAAGG
      TrpAlaCysValProCysArgValArgSerEnd

```

FIGURA 5D

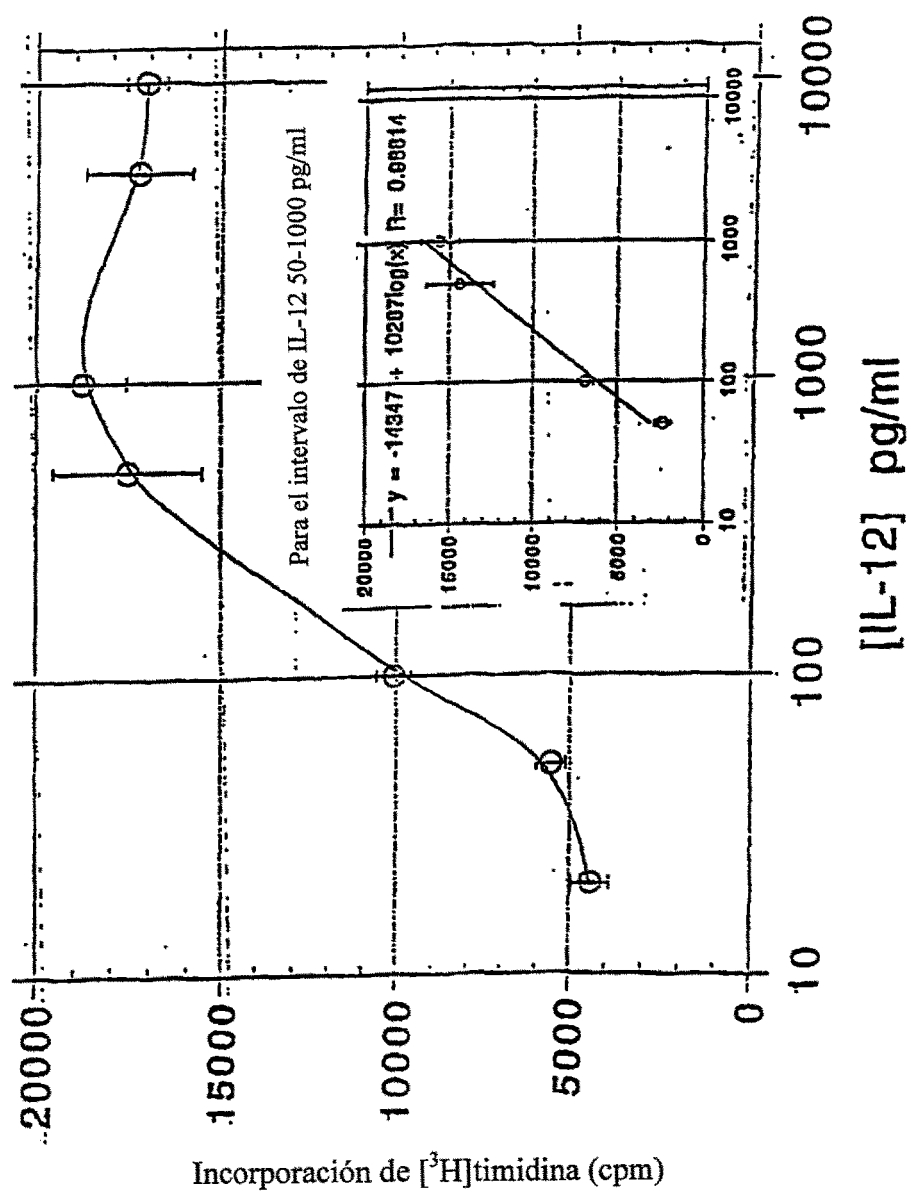


FIGURA 6

FIGURA 7A

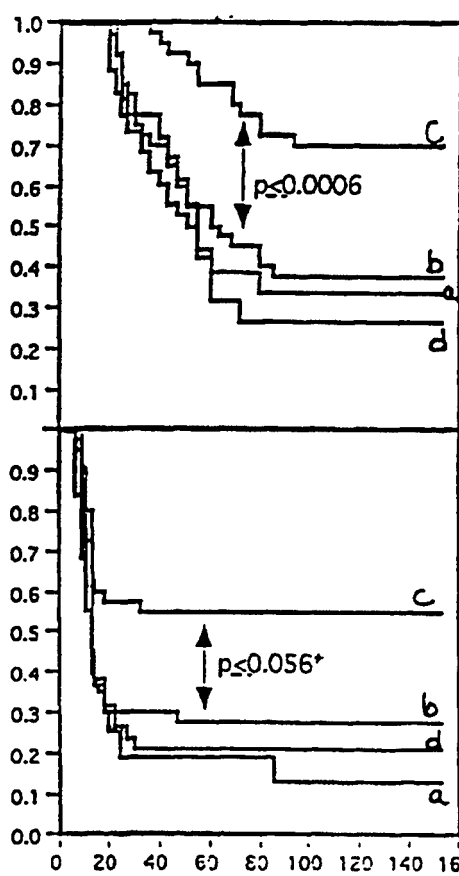


FIGURA 7B

FIGURA 7C

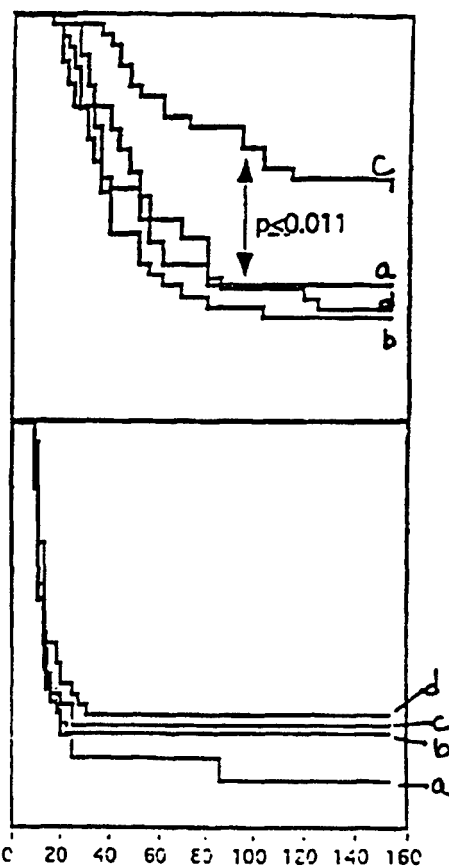


FIGURA 7D

Día del estudio

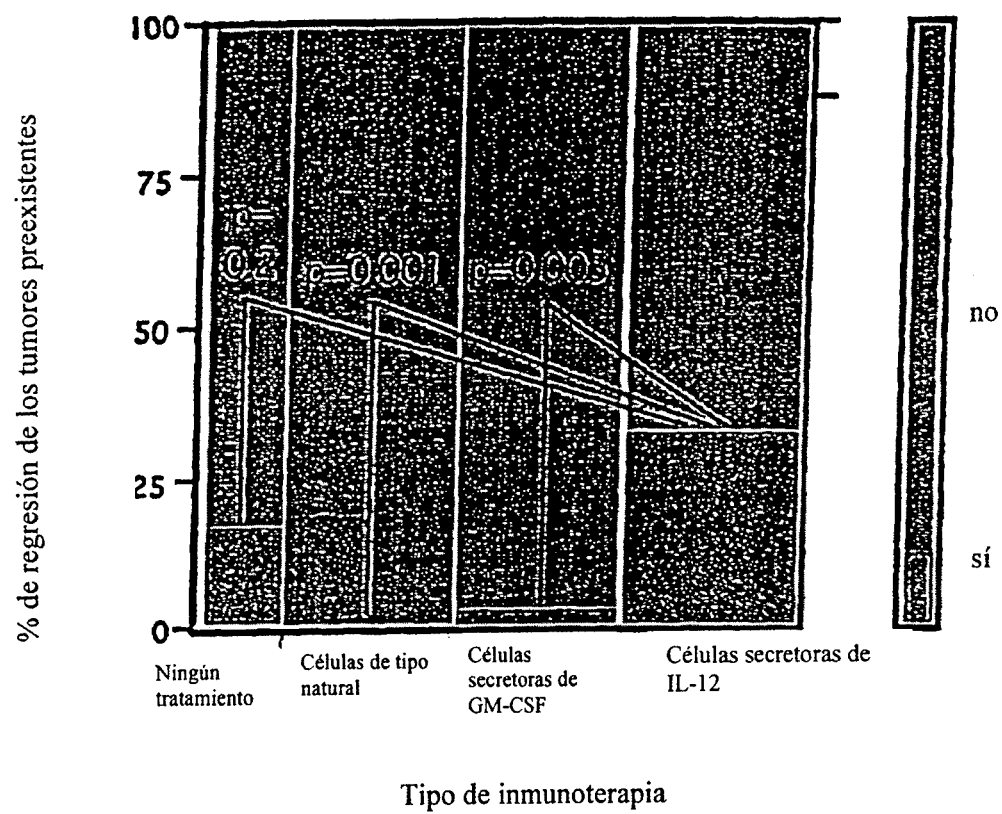


FIGURA 8

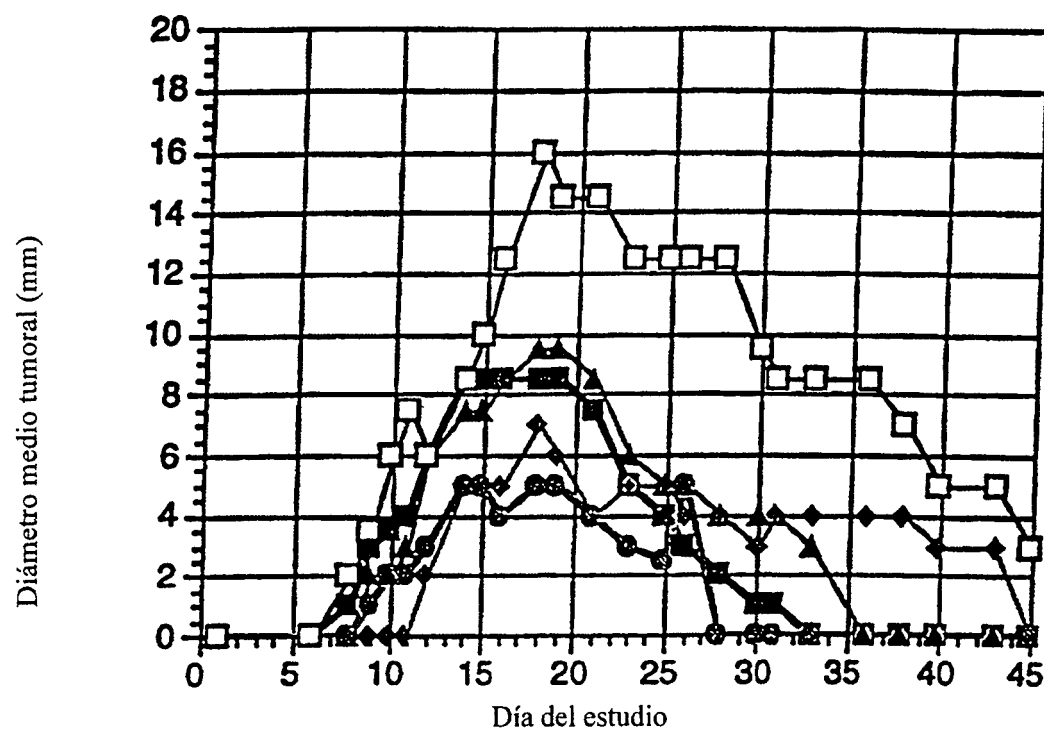


FIGURA 9

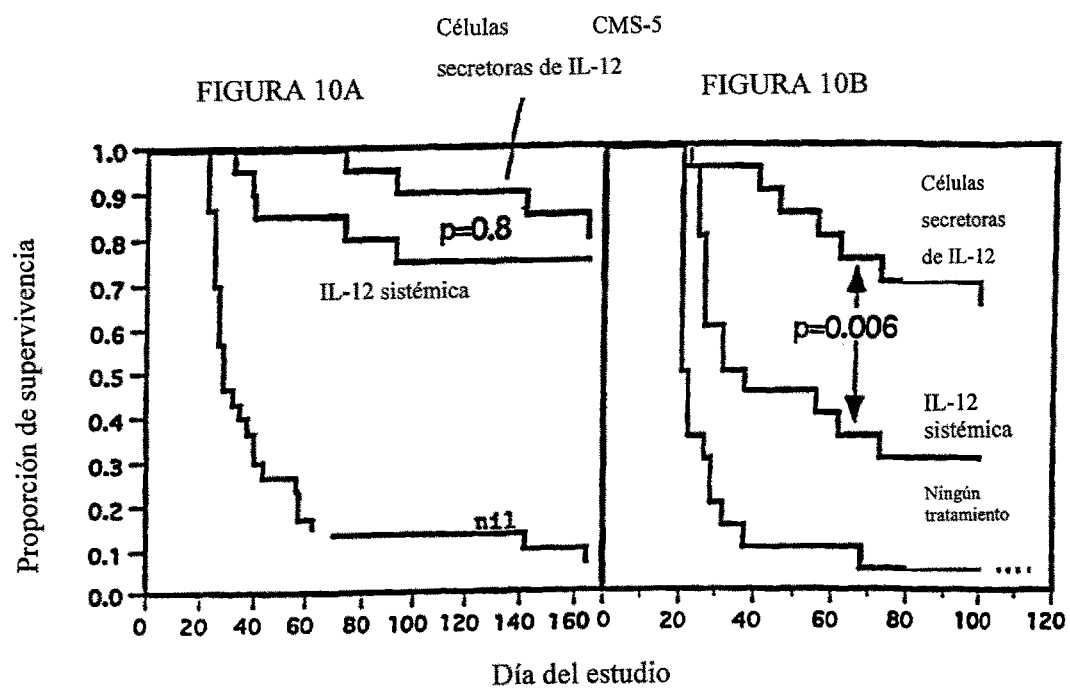


FIGURA 11A

FIGURA 11B

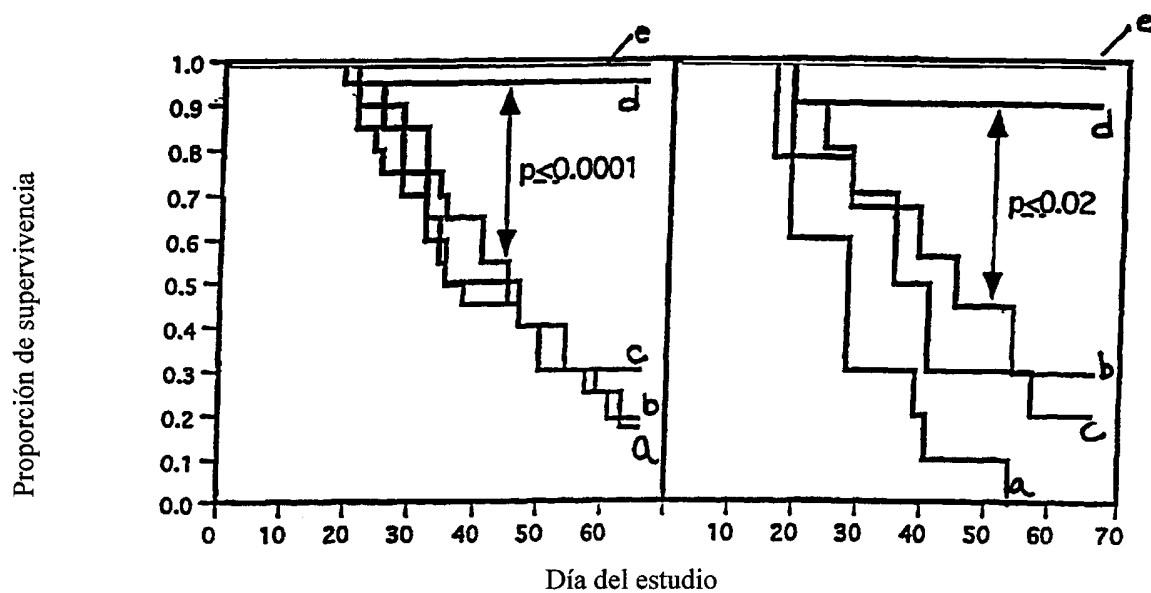


FIGURA 12A

FIGURA 12B

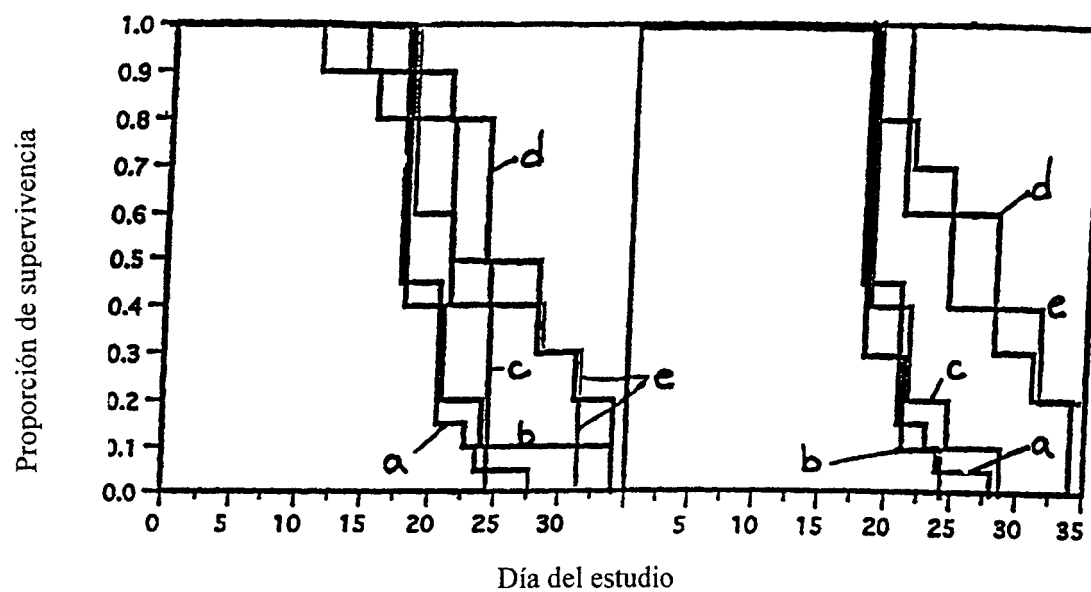


FIGURA 12C

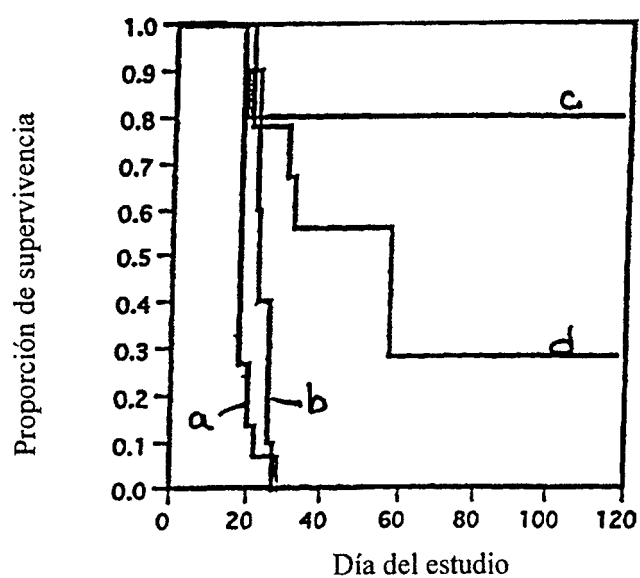


FIGURA 13A

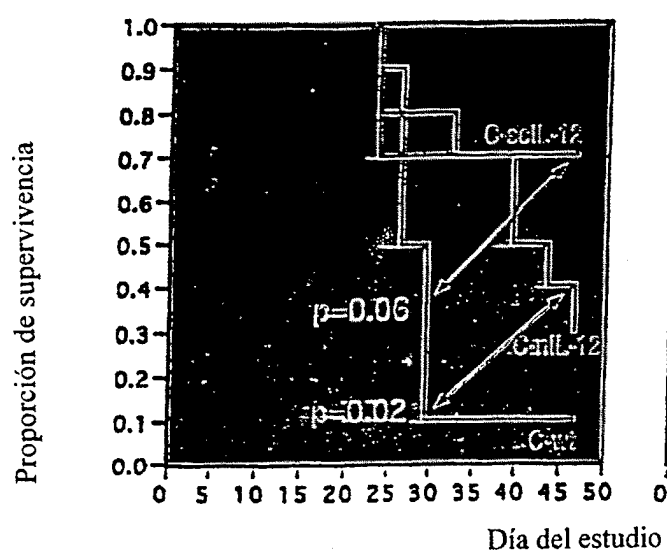


FIGURA 13B

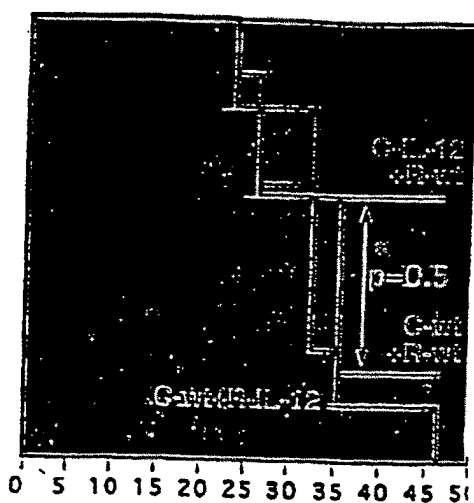
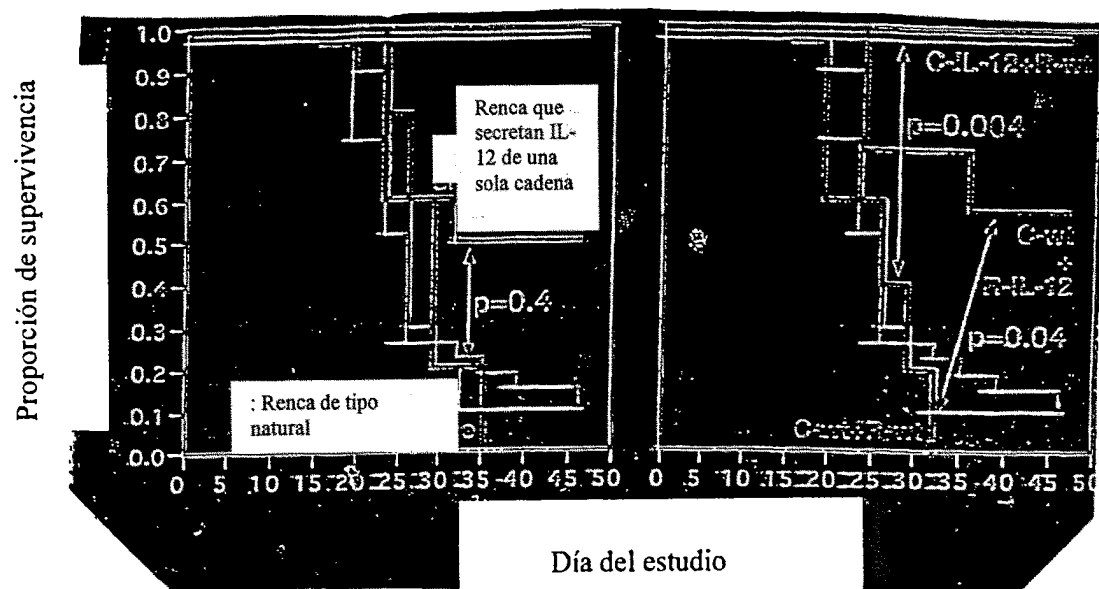


FIGURA 14A

FIGURA 14B



ES 2 302 565 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: Whitehead Institute for Biomedical Research
 - (B) CALLE: 9 Cambridge Center
 - 10 (C) CIUDAD: Cambridge
 - (D) ESTADO/PROVINCIA: MA
 - (E) PAÍS: EEUU
 - (F) CÓDIGO POSTAL/ZIP: 02142
 - 15 (G) TELÉFONO: 617-258-5104
 - (I) FAX: 617-256-S294
- (i) SOLICITANTE/INVENTOR:
- 20 (A) NOMBRE: Graham J. Lieschke
 - (B) CALLE: 5 Rollins Court
 - (C) CIUDAD: Cambridge
 - 25 (D) ESTADO/PROVINCIA: MA
 - (E) PAÍS: EEUU
 - (F) CÓDIGO POSTAL/ZIP: 02139
- (i) SOLICITANTE/INVENTOR:
- 30 (A) NOMBRE: Richard C. Mulligan
 - (B) CALLE: 2 Sandy Pond Road
 - (C) CIUDAD: Lincoln
 - 35 (D) ESTADO/PROVINCIA: MA
 - (E) PAÍS: EEUU
 - (F) CÓDIGO POSTAL/ZIP: 01773
- 40 (ii) TÍTULO DE LA INVENTION: Proteínas de fusión bioactivas y su uso en el tratamiento de tumores
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 36
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- 45 (A) DESTINATARIO: Hamilton, Brook, Smith & Reynolds, P.C.
 - (B) CALLE: Two Militia Drive
 - (C) CIUDAD: Lexington
 - 50 (D) ESTADO: Massachusetts
 - (E) PAÍS: EEUU
 - (F) ZIP: 02173
- 55 (v) FORMULARIO LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: Disquete
 - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
 - (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
 - 60 (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30
- (vi) DATOS DE SOLICITUD ACTUALES:
- 65 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
 - (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
 - (C) CLASIFICACIÓN:

ES 2 302 565 T3

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIORES:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/385.335
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 08-FEB-1995

(viii) INFORMACIÓN DEL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: Granahan, Patricia
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 32.227
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: WHI95-01A.PCT

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- (A) TELÉFONO: 617-861-6240
- (B) FAX: 617-861-9540

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 54 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

AGCTCCGCCG GTGGTGGTGG GTCGGGTGGC GGCGGATCTT CCATGGGTCC
TCAG

54

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 66 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

GTCCGATCCG GTGGCGGTGG CTCGGGCGGT GGTGGGTCGG GTGGCGGCGG
ATCTTCCATG
GGTCAA

60

66

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 66 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 302 565 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

AGCTCCGCCG GTGGCGGTGG CTCGGGCGGT GGTGGGTCGG GTGGCGGCGG
5 ATCTATGTGG 60
GAGCTG 66

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 66 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

GTCCGATCCG GTGGCGGTGG CTCGGGCGGT GGTGGGTCGG GTGGCGGCGG
25 ATCTAGGGTC 60
ATTCCA 66

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 11 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 16 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser
1 5 10 15

ES 2 302 565 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 15 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 6350 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

```

AAGCTTTGCT CTTAGGAGTT TCCTAATACA TCCCAAAC TC AAATATATAA AGCATTGAC      60
TTGTTCTATG CCCTAGGGGG CGGGGGGAAG CTAAGCCAGC TTTTITTAAC ATTAAATG      120
TTAATTCCAT TTAAATGCA CAGATGTTTT TATTTCATAA GGGTTTCAAT GTGCATGAAT      180
  
```

ES 2 302 565 T3

GCTGCAATAT TCCTGTTACC AAAGCTAGTA TAAATAAAA TAGATAAACG TGGAAATTAC 240
 5 TTAGAGTTTC TGTCATTAAAC GTTTCCTTCC TCAGTTGACA ACATAAATGC GCTGCTGAGC 300
 AAGCCAGTTT GCATCTGTCA GGATCAATT CCCATTATGC CAGTCATATT AATTACTAGT 360
 10 CAATTAGTTG ATTTTATTTT TTGACATATA CATGTGAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT 420
 TGGCAAGCTA GCTTAAGTAA CGCCATTTTG CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAAT 480
 15 AGAAAAGTTC AGATCAAGGT CAGGAACAGA TGGAACAGCT GAATATGGGC CAAACAGGAT 540
 ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC AGGGCCAAGA ACAGATGGAA CAGCTGAATA 600
 20 TGGGCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG TTCCTGCCCC GGCTCAGGGC CAAGAACAGA 660
 TGGTCCCCAG ATGCGGTCCA GCCCTCAGCA GTTCTTAGAG AACCATCAGA TGTTTCCAGG 720
 25 GTGCCCCAGG GACCTGAAAT GACCCTGTGC CTTATTTGAA CTAACCAATC AGTTCGCTTC 780
 TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT ATGCTCCCCG AGCTCAATTA AAGAGCCAC AACCCTCAC 840
 30 TCGGGGCGCC AGTCTCTCCA TTGACTGAGT CGCCCGGGTA CCGGTGTATC CAATAAACCC 900
 TCTTGCAATT GCATCCGACT TGTGGTCTCG CTGTTCTTGG GGAGGGTCTC CTCTGAGTGA 960
 35 TTGACTACCC GTCAGCGGGG GTCTTTTATT TGGGGGCTCG TCCGGGATCG GGAGACCCCT 1020
 GCCCAGGGAC CACCGACCCA CCACCGGAG GTAAGCTGGC CAGCAACTTA TCTGTGTCTG 1080
 40 TCCGATTGTC TAGTGTCTAT GACTGATTTT ATGCGCCTGC GTCGGTACTA GTTAGCTAAC 1140
 TAGCTCTGTA TCTGGCGGAC CCGTGGTGA ACTGACGAGT TCGGAACACC CGGCCGCAAC 1200
 CCTGGGAGAC GTCCAGGGA CTTGGGGGGC CGTTTTTGTG GCCCGACCTG AGTCCTAAAA 1260
 50 TCCGATCGT TTAGGACTCT TTGGTGACC CCCCTTAGAG GAGGGATATG TGGTTCTGGT 1320
 AGGAGACGAG AACCTAAAC AGTTCGCCCC TCCGTCTGAA TTTTGTCTT CGGTTTGGGA 1380
 55 CCGAAGCCGC GCCCGCGCTC TTGTCTGCTG CAGCATCGTT CTGTGTTGTC TCTGTCTGAC 1440

60

65

ES 2 302 565 T3

	TGTGTTTCTG TATTTGTCTG AAAATATGGG CCCGGGCTAG CCTGTTACCA CTCCCTTAAG	1500
5	TTTGACCTTA GGTCACCTGA AAGATGTCGA GCGGATCGCT CACAACCAGT CGGTAGATGT	1560
	CAAGAAGAGA CGTTGGGTTA CCTTCTGCTC TGCAGAATGG CCAACCTTTA ACGTCGGATG	1620
10	GCCGCGAGAC GGCACCTTTA ACCGAGACCT CATCACCAG GTTAAGATCA AGGTCTTTTC	1680
	ACCTGGCCCG CATGGACACC CAGACCAGGT GGGGTACATC GTGACCTGGG AAGCCTTGGC	1740
15	TTTTGACCCC CTCCTCTGGG TCAAGCCCTT TGTACACCCT AAGCCTCCGC CTCCTCTTCC	1800
	TCCATCCGCC CCGTCTCTCC CCGTGAACC TCCTCGTTCC ACCCGCCCTC GATCCTCCCT	1860
20	TTATCCAGCC CTCACCTCTT CTCTAGGCGC CCCCATATGG CCATATGAGA TCTTATATGG	1920
	GGCAGCCCCG CCCCCTGTAA ACTTCCCTGA CCCTGACATG ACAAGAGTTA CTAACAGCCC	1980
25	CTCTCTCCAA GCTCACTTAC AGGCTCTCTA CTTAGTCCAG CACGAAGTCT GGAGACCTCT	2040
	GGCGGCAGCC TACCAAGAAC AACTGGACCG ACCGGTGGTA CTCACCCCTT ACCGAGTCGG	2100
30	CGACACAGTG TGGGTCCGCC GACACCAGAC TAAGAACCTA GAACCTCGCT GGAAGGACC	2160
	TTACACAGTC CTGCTGACCA CCCCCACCGC CCTCAAAGTA GACGGCATCG CAGCTTGGAT	2220
35	ACACGCCGCC CACGTGAAGG CTGCCGACCC CGGGGGTGGG CCATCCTCTA GACTGCCATG	2280
	GCGCGGATCC GGATTAGTCC AATTTGTTAA AGACAGGATA TCAGTGGTCC AGGCTCTAGT	2340
40	TTTGACTCAA CAATATCACC AGCTGAAGCC TATAGAGTAC GAGCCATAGA TAAATAAAA	2400
	GATTTTATTT AGTCTCCAGA AAAAGGGGGG AATGAAAGAC CCCACCTGTA GGTTTGGCAA	2460
45	GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAGGC ATGGAAAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA	2520
	GTTTCAATCA AGGTGAGGAA CAGATGGAAC AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT	2580
50	GGTAAGCAGT TCCTGCCCCG GCTCAGGCCC AAGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC	2640
55	AAACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCTCT CCCCAGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGTCC	2700

ES 2 302 565 T3

	CCAGATGCGG TCCAGCCCTC AGCAGTTTCT AGAGAACCAT CAGATGTTTC CAGGOTGCCC	2760
5	CAAGGACCTG AAATGACCCT GTGCCTTATT TGAACTAACC AATCAGTTCC CTTCCTGCTT	2820
	CTGTTGCGGC GCTTCTGCTC CCCGAGCTCA ATAAAAGAGC CCACAACCCC TCACTCGGGG	2880
10	CGCCAGTCCT CCGATTGACT GAGTCGCCCC GGTACCCGTG TATCCAATAA ACCCTCTTGC	2940
	AGTTGCATCC GACTTGTGGT CTCGCTGTTT CTTGGGAGGG TCTCCTCTGA GTGATTGACT	3000
15	ACCCGTCAGC GGGGGTCTTT CACACATGCA GCATGTATCA AAATTAATTT GGTTTTTTTT	3060
	CTTAAGTATT TACATTAAAT GGCATAGTA CTTAAAGTTA CATTGGCTTC CTTGAAATAA	3120
20	ACATGGAGTA TTCAGAAATG GTCATAAATA TTTCTAATTT TAAGATAGTA TCTCCATTGG	3180
	CTTCTACCTT TTTCTTTTAT TTTTTTTTGT CCTCTGTCTT CCATTGTGTG TTGTTGTTGT	3240
25	TTGTTTGTIT GTTTGTTGGT TGGTTGGTTA ATTTTPTTTT AAAGATCCTA CACTATAGTT	3300
	CAAGCTAGAC TATTAGCTAC TCTGTAACCC AGGGTGACCT TGAAGTCATG GGTAGCCTGC	3360
30	TGTTTTAGCC TTCCACATC TAAGATTACA GGTATGAGCT ATCATTTTTG STATATTGAT	3420
	TGATTGATTG ATTGATGTGT GTGTGTGTGA TTGTGTTTGT GTGTGTGACT GTGAAAATGT	3480
35	GTGTATGGGT GTGTGTGAAT GTGTGTATGT ATGTGTGTGT GTGAGTGTGT GTGTGTGTGT	3540
	GTGCATGTGT GTGTGTGTGA CTGTGTCTAT GTGTATGACT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT	3600
	GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTTGTG AAAAAATATT CTATGGTAGT GAGAGCCAAC	3660
45	GCTCCGGCTC AGGTGTCAGG TTGGTTTTTG AGACAGAGTC TTTCACCTAG CTGGGAATTC	3720
	ACTGGCCGTC GTTTTACAAC GTCGTGACTG GGAAAACCCCT GGCCTTACCC AACTTAATCG	3780
50	CCTTGACGCA CATCCCCCTT TCGCCAGCTG GCGTAATAGC GAAGAGGCCC GCACCGATCG	3840
	CCCTTCCCAA CAGTTGCGCA GCCTGAATGG CGAATGGCGC CTGATGCGGT ATTTTCTCCT	3900
55	TACGCATCTG TCGGGTATTT CACACCGCAT ATGGTGCACT CTCAGTACAA TCTGCTCTGA	3960

60

65

ES 2 302 565 T3

	TGCCGCATAG TTAAGCCAGC CCCGACACCC GCCAACACCC GCTGACGCGC CCTGACGGGC	4020
5	TTGTCTGCTC CCGGCATCCG CTTACAGACA AGCTGTGACC GTCTCCGGGA GCTGCATGTG	4080
	TCAGAGGTTT TCACCGTCAT CACCGAAACG CGCGATGACG AAAGGGCCTC GTGATACGCC	4140
10	TATTTTATA GGTAAATGTC ATGATAATAA TGGTTTCTTA GACGTCAGGT GGCACCTTTC	4200
	GGGGAAATGT GCGCGGAACC CCTATTTGTT TATTTTCTA AATACATTCA AATATGTATC	4260
15	CGCTCATGAG ACAATAAACC TGATAAATGC TTCAATAATA TTGAAAAGG AAGAGTATGA	4320
	GTATTCACAA TTTCCGTGTC GCCCTTATTC CCTTTTTCG GGCATTTTGC CTTCCTGTTT	4380
20	TTGCTCACCC AGAAACGCTG GTGAAAGTAA AAGATGCTGA AGATCAGTTG GGTGCACGAG	4440
	TGGGTTACAT CGAACTGGAT CTCAACAGCG GTAAGATCCT TGAGAGTTTT CGCCCCGAAG	4500
25	AACGTTTTCC AATGATGAGC ACTTTTAAAG TTCTGCTATG TGGCGCGGTA TTATCCCGTA	4560
	TTGACGCCGG GCAAGAGCAA CTCGGTCGCC GCATACACTA TTCTCAGAAT GACTTGGTTG	4620
30	AGTACTCACC AGTCACAGAA AAGCATCTTA CGGATGGCAT GACAGTAAGA GAATTATGCA	4680
	GTGCTGCCAT AACCATGAGT GATAACACTG CGGCCAACTT ACTTCTGACA ACGATCGGAG	4740
35	GACCGAAGGA GCTAACCGCT TTTTGCACA ACATGGGGGA TCATGTAAC TCGCTTGATC	4800
	GTTGGGAACC GGAGCTGAAT GAAGCCATAC CAAACGACGA GCGTGACACC ACGATGCCTG	4860
40	TAGCAATGGC AACAACTTG CGCAAATAT TAACTGGCGA ACTACTTACT CTAGCTTCCC	4920
	GGCAACAATT AATAGACTGG ATGGAGGCGG ATAAAGTTGC AGGACCACTT CTGCGCTCGG	4980
45	CCCTTCCGGC TGGCTGGTTT ATTGCTGATA AATCTGGAGC CGGTGAGCGT GGTCTCGCG	5040
	GTATCATTCG AGCACTGGGG CCAGATGGTA AGCCCTCCCG TATCGTAGTT ATCTACACGA	5100
50	CGGGGAGTCA GGCAACTATG GATGAACGAA ATAGACAGAT CGCTGAGATA GGTGCCTCAC	5160
55	TGATTAAGCA TTGGTAACTG TCAGACCAAG TTTACTCATA TATACTTTAG ATTGATTTAA	5220

ES 2 302 565 T3

	AACTTCATTT TTAATTTAAA AGGATCTAGG TGAAGATCCT TTTTGATAAT CTCATGACCA	5280
5	AAATCCCTTA ACGTGAGTTT TCGTTCCACT GAGCGTCAGA CCCCGTAGAA AAGATCAAAG	5340
	GATCTTCTTG AGATCCTTTT TTTCTGCGCG TAATCTGCTG CTTGCAAACA AAAAAACCAC	5400
10	CGCTACCAGC GGTGGTTTGT TTGCCGATC AAGAGCTACC AACTCTTTTT CCGAAGGTAA	5460
	CTGGCTTCAG CAGAGCGCAG ATACCAAATA CTGTCTTCT AGTGTAGCCG TAGTTAGGCC	5520
15	ACCACTTCAA GAACCTGTGA GCACCGCCTA CATACCTCGC TCTGCTAATC CTGTTACCAG	5580
	TGGCTGCTGC CAGTGGCGAT AAGTCGTGTC TTACCGGGTT GGA CTCAAGA CGATAGTTAC	5640
20	CGGATAAGGC GCAGCGGTGC GGCTGAACGG GGGGTTCTGT CACACAGCCC AGCTTGGAGC	5700
	GAACGACCTA CACCGAAGTG AGATACCTAC AGCGTGAGCA TTGAGAAAGC GCCACGCTTC	5760
25	CCGAAGGGAG AAAGGCGGAC AGGTATCCGG TAAGCGGCAG GGTGGGAACA GGAGAGCGCA	5820
	CGAGGGAGCT TCCAGGGGGA AACGCCTGGT ATCTTTATAG TCCGTGTCGGG TTTGCGCCACC	5880
30	TCTGACTTGA GCGTCGATTT TTGTGATGCT CGTCAGGGGG GCGGAGCCTA TGGAAAAACG	5940
35	CCAGCAACGC GGCTTTTTTA CGGTTCCTGG CCTTTTGCTG GCCTTTTGCT CACATGTTCT	6000
	TTCTGCGTT ATCCCCTGAT TCTGTGGATA ACCGTATTAC CGCCTTTGAG TGAGCTGATA	6060
40	CCGCTCGCCG CAGCCGAACG ACCGAGCGCA GCGAGTCAGT GAGCGAGGAA GCGGAAGAGC	6120
	GCCCAATACG CAAACCGCCT CTCCCAGCGC GTTGGCCGAT TCATTAATGC AGCTGGCAGC	6180
45	ACAGGTTTCC CCACTGGAAA GCGGGCAGTG AGCGCAACGC AATTAATGTG AGTTAGCTCA	6240
	CTCATTAGGC ACCCCAGGCT TTACACTTTA TGCTTCGGC TCGTATGTTG TGTGGAATTG	6300
50	TGAGCGGATA ACAATTTTAC ACAGGAAACA GCTATGACCA TGATTACGCC	6350

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 9:

- 55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6350 pares base
 - (B) TIPO: ácido nucleico
 - 60 (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
 - (D) TOPOLOGÍA: desconocida
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- 65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

ES 2 302 565 T3

	TTCGAAACGA GAATCCTCAA AGGATTATGT AGGGTTTGAG TTTATATATT TCGTAAACTG	60
5	AACAAGATAC GGGATCCCCC GCCCCCCTTC GATTCGGTCG AAAAAAATTG TAAATTTTAC	120
	AATTAAGGTA AAATTTACGT GTCTACAAA ATAAAGTATT CCCAAGTTA CACGTACTTA	180
10	CGACGTTATA AGGACAATGG TTTCGATCAT ATTTATTTTT ATCTATTGTC ACCTTTAATG	240
	AATCTCAAAG ACASTAATTG CAAAGGAAGG AGTCACTGT TGTATTTACG CGACGACTCG	300
15	TTCGGTCAAA CGTAGACAGT CCTAGTTAAA GGGTAATACG GTCAGTATAA TTAATGATCA	360
	GTTAATCAAC TAAAAATAAA AACTGTATAT GTACACTTAC TTTCTGGGGT GGACATCCAA	420
20	ACCGTTTGAT CGAATTCATT GCGGTAAAC GTTCGGTACC TTTTATGTA TTGACTCTTA	480
	TCTTTTCAAG TCTAGTTCCA GTCCTTGTCT ACCTTGTCGA CTTATACCCG GTTGTCTTA	540
25	TAGACACCAT TCGTCAAGGA CCGGGCCGAG TCCCGGTTCT TGTCTACCTT GTCGACTTAT	600
	ACCGGGTTTG TCCTATAGAC ACCATTCTGC AAGGACGGGG CCGAGTCCCG GTTCTTGTCT	660
30	ACCAGGGGTC TACGCCAGGT CCGGAGTCGT CAAAGATCTC TTGGTAGTCT ACAAGGTCC	720
	CACGGGGTTC CTGGACTTTA CTGGGACACG GAATAAACTT GATTGGTTAG TCAAGCGAAG	780
35	AGCGAAGACA AGCGCGCGAA TACGAGGGGC TCGAGTTATT TTCTCGGGTG TTGGGGAGTG	840
40	AGCCCCGCGG TCAGGAGGCT AACTGACTCA GCGGGCCCAT GGGCACATAG GTTATTTGGG	900
45		
50		
55		
60		
65		

ES 2 302 565 T3

	AGAACGTCAA CGTAGGCTGA ACACCAGAGC GACAAGGAAC CCTCCCAGAG GAGACTCACT	960
5	AACTGATGGG CAGTCGCCCC CAGAAAGTAA ACCCCCGAGC AGGCCCTAGC CCTCTGGGGA	1020
	CGGGTCCCTG GTGGCTGGGT GGTGGCCCTC CATTCGACCG GTCGTTGAAT AGACACAGAC	1080
10	AGGCTAACAG ATCACAGATA CTGACTAAAA TAGCGGGACG CAGCCATGAT CAATCGATTG	1140
	ATCGAGACAT AGACCGCCTG GGCACCACCT TGA CTGCTCA AGCCTTGTGG GCCGGCGTTG	1200
15	GGACCCTCTG CAGGGTCCCT GAAGCCCCCG GCAAAAACAC CGGGCTGGAC TCAGGATTTT	1260
	AGGGCTAGCA AATCCTGAGA AACCACGTGG GGGGAATCTC CTCCCTATAC ACCAAGACCA	1320
20	TCCTCTGCTC TTGATTTTG TCAAGGGCGG AGGCAGACTT AAAAACGAAA GCCAAACCTT	1380
	GGCTTCGCG CGGCGGCGAG AACAGACGAC GTCGTAGCAA GACACAACAG AGACAGACTG	1440
25	ACACAAAGAC ATAACAGAC TTTTATACCC GGGCCCGATC GGACAATGGT GAAGGAATTC	1500
	AAACTGGAAT CCAGTGACCT TTCTACAGCT CGCCTAGCGA GTGTTGGTCA GCCATCTACA	1560
30	GTCTTCTCT GCAACCCAAT GGAAGACGAG ACGTCTTACC GGTTOGAAAT TGCAGCCTAC	1620
	CGGCGCTCTG CCGTGGAAT TGGCTCTGGA GTAGTGGGTC CAATTCTAGT TCCAGAAAAG	1680
35	TGGACCGGGC GTACCTGTGG GTCTGGTCCA CCCCATGTAG CACTGGACCC TTCGGAACCG	1740
	AAACTGGGG GGAGGGACCC AGTTCGGGAA ACATGTGGGA TTCGGAGGCG GAGGAGAAGG	1800
40	AGGTAGGCGG GGCAGAGAGG GGGAACTTGG AGGAGCAAGC TGGGGCGGAG CTAGGAGGGA	1860
	AATAGGTCCG GAGTGAGGAA GAGATCCGCG GGGGTATACC GGTATACTCT AGAATATACC	1920
45	CCGTGGGGGC GGGGAACATT TGAAGGGACT GGGACTGTAC TGTCTCAAT GATTGTGCGG	1980
	GAGAGAGGTT CGAGTGAATG TCCGAGAGAT GAATCAGGTC GTGCTTCAGA CCTCTGGAGA	2040
50	CCGCCGTCGG ATGGTTCTTG TTGACCTGGC TGGCCACCAT GGAGTGGGAA TGGCTCAGCC	2100
55	GCTGTGTAC ACCCAGGCGG CTGTGGTCTG ATTCTTGGAT CTTGGAGCGA CCTTTCCTGG	2160

ES 2 302 565 T3

	AATGTGTCAG GACGACTGGT GGGGGTGGCG GGAGTTTCAT CTGCCGTAGC GTCGAACCTA	2220
5	TGTGCGGCGG GTGCACTTCC GACGGCTGGG GCGCCACCT GGTAGGAGAT CTGACGGTAC	2280
	CGCGCCTAGG CCTAATCAGG TTAAACAATT TCTGTCTAT AGTCACCAGG TCCGAGATCA	2340
10	AAACTGAGTT GTTATAGTGG TCGACTTCGG ATATCTCATG CTCGGTATCT ATTTTATTTT	2400
	CTAAAATAAA TCAGAGGTCT TTTTCCCCC TTACTTTCTG GGGTGGACAT CCAAACCGTT	2460
15	CGATCGAATT CATTGCGGTA AAACGTTCCG TACCTTTTTA TGTATTGACT CTTATCTCTT	2520
	CAAGTCTAGT TCCAGTCCTT GTCTACCTG TCGACTTATA CCGGTTTGT CCTATAGACA	2580
20	CCATTGCTCA AGGACGGGGC CGAGTCCCGG TTCTTGCTA CCTGTGCGAC TTATACCCGG	2640
	TTTGTCTAT AGACACCATT CGTCAAGGAC GGGGCCGAGT CCGGTTCTT GTCTACCAGG	2700
25	GGTCTACGCC AGGTCCGGAG TCGTCAAAGA TCTCTGGTA GTCTACAAAG GTCCACGGG	2760
	GTTCTTGGAC TTTACTGGGA CACGGAATAA ACTTGATTGG TTAGTCAAGC GAAGAGCGAA	2820
30	GACAAGCGCG CGAAGACGAG GGGCTCGAGT TATTTTCTCG GGTGTTGGG AGTGAGCCCC	2880
	GCGGTCAGGA GGCTAACTGA CTCAGCGGGC CCATGGGCAC ATAGGTTATT TGGGAGAACG	2940
35	TCAACGTAGG CTGAACACCA GAGCGACAAG GAACCTCCC AGAGGAGACT CACTAACTGA	3000
	TGGGCAGTCG CCCCAGAAA GTGTGTACGT CGTACATAGT TTTAATTAAA CCAAAAAAA	3060
40	GAATTCTATA ATGTAATTTA CCGGTATCAT GAATTTCAAT GTAACCGAAG GAACTTTATT	3120
	TGTACCTCAT AAGTCTTACA CAGTATTTAT AAAGATTAAA ATTCTATCAT AGAGGTAACC	3180
45	GAAAGATGAA AAAGAAAATA AAAAAAACA GGAGACAGAA GGTAACAAC AACACAACA	3240
	AACAAACAAA CAAACAACCA ACCAACCAAT TAAAAAATA TTTCTAGGAT GTGATATCAA	3300
50	GTTGATCTG ATAATCGATG AGACATTGGG TCCACTGGA ACTTCAGTAC CCATCGGACG	3360
	ACAAAATCGG AAGGGTGTAG ATTCTAATGT CCATACTCGA TAGTAAAAAC CATATACTA	3420

ES 2 302 565 T3

	ACTAACTAAC TAACTACACA CACACACACT AACACAAACA CACACACTGA CACTTTTACA	3480
5	CACATACCCA CACACACTTA CACACATACA TACACACACA CACTCACACA CACACACACA	3540
	CACGTACACA CACACACACT GACACAGATA CACATACTGA CACACACACA CACACACACA	3600
10	CACACACACA CACACACACA CACACAACAC TTTTATTATA GATACCATCA CTCTCGGTTG	3660
	CGAGGCCGAG TCCACAGTCC AACCAAAAC TCTGTCTCAG AAAGTGAATC GAACCTTAAG	3720
15	TGACCGGCAG CAAAATGTTG CAGCACTGAC CCTTTTGGGA CCGCAATGGG TTGAATTAGC	3780
	GGAACGTCTG GTAGGGGGAA AGCGGTCTGAC CGCATTATCG CTCTCCGGG CGTGGCTAGC	3840
20	GGGAAGGGTT GTCAACGCGT CGGACTTACC GCTTACCGCG GACTACGCCA TAAAGAGGA	3900
	ATGCGTAGAC ACGCCATAAA GTGTGGCGTA TACCACGTGA GAGTCATGTT AGACGAGACT	3960
25	ACGGCGTATC AATTCGGTCG GGGCTGTGGG CGGTTGTGGG CGACTGCGCG GGACTGCCCG	4020
	AACAGACGAG GGCCGTAGGC GAATGTCTGT TCGACACTGG CAGAGGCCCT CGACGTACAC	4080
30	AGTCTCCAAA AGTGGCAGTA GTGGCTTTGC GCGCTACTGC TTTCCCGGAG CACTATGCGG	4140
	ATAAAATAT CCAATTACAG TACTATTATT ACCAAAGAAT CTGCAGTCCA CCGTGAAGAAG	4200
35	CCCCTTTACA CGCGCCTTGG GGATAAACAA ATAAAAGAT TTATGTAAGT TTATACATAG	4260
	GCGAGTACTC TGTTATTGGG ACTATTTACG AAGTTATTAT AACTTTTTC TTTCTACT	4320
40	CATAAGTTGT AAAGGCACAG CCGGAATAAG GGAAAAACG CCGTAAAACG GAAGGACAAA	4380
	AACGAGTGGG TCTTTGCGAC CACTTTCATT TTCTACGACT TCTAGTCAAC CCACGTGCTC	4440
45	ACCCAATGTA GCTTGACCTA GAGTTGTGCG CATTCTAGGA ACTCTCAAAA GCGGGGCTTC	4500
50	TTGCAAAAGG TTACTACTCG TGAAAATTC AAGACGATAC ACCGCGCCAT AATAGGCGAT	4560
	AACTGCGGCC CGTTCTCGTT GAGCCAGCGG CGTATGTGAT AAGAGTCTTA CTGAACCAAC	4620
55	TCATGAGTGG TCAGTGTCTT TTCGTAGAAT GCCTACCGTA CTGTCATTCT CTTAATACGT	4680

60

65

ES 2 302 565 T3

	CACGACGGTA TTGGTACTCA CTATTGTGAC GCCGGTTGAA TGAAGACTGT TGCTAGCCTC	4740
5	CTGGCTTCCT CGATTGGCGA AAAAACGTGT TGTACCCCTT AGTACATTGA GCGGAAGTAG	4800
	CAACCCTTGG CCTCGACTTA CTTCCGGTATG GTTTGCTGCT CGCACTGTGG TGCTACGGAC	4860
10	ATCGTTACCG TTGTTGCAAC GCGTTTGATA ATTGACCGCT TGATGAATGA GATCGAAGGG	4920
	CCGTTGTAA TTATCTGACC TACCTCCGCC TATTTCAACG TCCTGCTGAA GACGCGAGCC	4980
15	GGGAAGGCCG ACCGACCAAA TAACGACTAT TTAGACCTCG GCCACTCGCA CCCAGAGCGC	5040
	CATAGTAACG TCGTGACCCC GGTCTACCAT TCGGGAGGGC ATAGCATCAA TAGATGTGCT	5100
20	GCCCCTCAGT CCGTTGATAC CTACTTGCTT TATCTGTCTA GCGACTCTAT CCACGGAGTG	5160
	ACTAATTCGT AACCATTGAC AGTCTGGTTC AATGAGTAT ATATGAAATC TAACTAAATT	5220
25	TTGAAGTAAA AATTAAATTT TCCTAGATCC ACTTCTAGGA AAACATATTA GAGTACTGGT	5280
	TTTAGGGAAT TGCACTCAAA AGCAAGGTGA CTCGCAGTCT GGGGCATCTT TTCTAGTTTC	5340
30	CTAGAAGAAC TCTAGGAAAA AAAGACGCGC ATTAGACGAC GAACGTTTGT TTTTTTGGTG	5400
	GCGATGGTCG CCACCAAACA AACGGCCTAG TTCTCGATGG TTGAGAAAAA GGCTTCCATT	5460
35	GACCGAAGTC GTCTCCGCTC TATGGTTTAT GACAGGAAGA TCACATCGGC ATCAATCCGG	5520
	TGGTGAAGTT CTTGAGACAT CGTGGCGGAT GTATGGAGCG AGACGATTAG GACAATGGTC	5580
40	ACCGACGACG GTCACCGCTA TTCAGCACAG AATGGCCCAA CCTGAGTTCT GCTATCAATG	5640
	GCCTATTCCG CGTCGCCAGC CCGACTTGCC CCCCAGCAC GTGTGTCCGG TCGAACCTCG	5700
45	CTTGCTGGAT GTGGCTGAC TCTATGGATG TCGCACTCGT AACTCTTTCC CGGTGCGAAG	5760
50	GGCTTCCCTC TTTCGCCCTG TCCATAGGCC ATTCCGCGTC CCAGCCTTGT CCTCTCGCGT	5820
	GCTCCCTCGA AGGTCCCCCT TTGCGGACCA TAGAAATATC AGGACAGCCC AAAGCGGTGG	5880
55	AGACTGAAGT CGCAGCTAAA AACACTACGA GCAGTCCCCC CGCCTCGGAT ACCTTTTTGC	5940

ES 2 302 565 T3

GGTCGTTGCG CCGGAAAAAT GCCAAGGACC GGAAAACGAC CGGAAAACGA GTGTACAAGA 6000
 5 AAGGACGCAA TAGGGGACTA AGACACCTAT TGGCATAATG GCGGAAACTC ACTCGACTAT 6060
 GGCAGACGGC GTGGGCTTGC TGGCTCGCGT CGCTCAGTCA CTCGCTCCTT CGCCTTCTCG 6120
 10 CCGGTTATGC GTTTGGCGGA GAGGGGCGCG CAACCGGCTA AGTAATTACG TCGACCGTGC 6180
 TGTCCAAAGG GCTGACCTTT CGCCCGTCAC TCGCGTTGCG TTAATTACAC TCAATCGAGT 6240
 15 GAGTAATCCG TGGGGTCCGA AATGTGAAAT ACGAAGGCCG AGCATACAAC ACACCTTAAC 6300
 ACTCGCCTAT TGTTAAAGTG TGTCTTTGT CGATACTGGT ACTAATGCGG 6350

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 713 pares base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
 30 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

35 AAGCTTGGGC TGCAGGTGCA TCGACTCTAG AGGATCGATC CCCACCATGG GTCAATCAGC 60
 CTACCTCCTC TTTTGGCCA CCCTTGCCCT CCTAACCAC CTCAGTTTGG CCAGGGTCAT 120
 40 TCCAGTCTCT GGACCTGCCA GGTGTCTTAG CCACTCCGA AACCTGCTGA AGACCACAGA 180
 TGACATGGTG AAGACGGCCA GAGAAAACT GAAACATTAT TCCTGCACTG CTGAAGACAT 240
 45 CGATCATGAA GACATCACAC GGGACCAAC CAGCACATTC AAGACCTGTT TACCACTGGA 300
 ACTACACAAG AAGGAGAGTT GCCTGGCTAC TAGAGAGACT TCTTCCACAA CAAGAGGGAG 360
 CTGCCTGCCC CCACAGAAGA CTTCTTTGAT GATGACCCTG TGCCTTGGTA GCATCTATGA 420
 55 GGACTTGAAG ATGTACCAGA CAGAGTTCCA GGCCATCAAC GCAGCACTTC AGAATCACAA 480
 CCATCAGCAG ATCATTCTAG ACAAGGGCAT GCTGGTGGCC ATCGATGAGC TGATGCAGTC 540
 60 TCTGAATCAT AATGGCGAGA CTCTGCGCCA GAAACCTCCT GTGGGAGAAG CAGACCCCTTA 600
 CAGAGTGAAA ATGAAGCTCT GCATCCTGCT TCACGCTTC AGCACCOCG TCGTGACCAT 660
 65 CAACAGGGTG ATGGGCTATC TGAGCTCCGC CTGAGAATTC ATTGATCCAC TAG 713

ES 2 302 565 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 713 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

```

TTCGAACCCG ACGTCCAGCT AGCTGAGATC TCCTAGCTAG GGGTGGTACC CAGTTAGTGC      60
GATGGAGGAG AAAAACCGGT GGAACGGGA GGATTTGGTG GAGTCAAACC GGTCCCAGTA      120
AGGTCAGAGA CCTGGACGGT CCACAGAATC GGTGAGGGCT TTGGACGACT TCTGGTGTCT      180
ACTGTACCAC TTCTGCCGGT CTCCTTTTGA CTTTGTAATA AGGACGTGAC GACTTCTGTA      240
GCTAGTACTT CTGTAGTGTG CCCTGGTTTG GTCGTGTAAC TTCTGGACAA ATGGTGACCT      300
TGATGTGTTT TTGCTCTCAA CGGACCGATG ATCTCTCTGA AGAAGGTGTT GTTCTCCCTC      360
GACGGACGGG GGTGTCTTCT GCAGAACTA CTACTGGGAC ACGGAACCAT CGTAGATACT      420
CCTGAAC TTCATGGTCT GTCTCAAGGT CCGGTAGTTG CGTCGTGAAG TCTTAGTGTT      480
GGTAGTCGTC TAGTAAGATC TGTTCCTCGTA CGACCACCGG TAGCTACTCG ACTACGTCAG      540
AGACTTAGTA TTACCGCTCT GAGACGCGGT CTTTGGAGGA CACCCTCTTC GTCTGGGAAT      600
GTCTCACTTT TACTTCGAGA CGTAGGACGA AGTGCGGAAG TCGTGGGCGC AGCACTGGTA      660
GTGTCCAC TACCCGATAG ACTCGAGGCG GACTCTTAAG TAACTAGGTG ATC      713

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 215 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

ES 2 302 565 T3

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

ES 2 302 565 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1060 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 13:

```

AAGCTTGGGC TGCAGGTCGA TCGACTCTAG AGGATCGATC CCCACCATGG GTCCTCAGAA      60
GCTAACCATC TCCTGGTTTG CCATCGTTTT GCTGGTGTCT CCACTCATGG CCATGTGGGA      120
GCTGAGAAAG ACGTTTATGT TGTAGAGGTG GACTGGACTC CCGATGCCCC TGGAGAAACA      180
GTGAACCTCA CCTGTGACAC GCCTGAAGAA GATGACATCA CCTGGACCTC AGACCAGAGA      240
CATGGAGTCA TAGGCTCTGG AAAGACCCTG ACCATCACTG TCAAAGAGTT TCTAGATGCT      300
GGCCAGTACA CCTGCCACAA AGGAGGCGAG ACTCTGAGCC ACTCACATCT GCTGCTCCAC      360
AAGAAGGAAA ATGGAATTTG GTCCACTGAA ATTTTAAAAA ATTTCAAAA CAAGACTTTC      420
CTGAAGTGTG AAGCACCAA TTACTCCGGA CGGTTCACGT GCTCATGGCT GGTGCAAAGA      480
AACATGGACT TGAAGTTCAA CATCAAGAGC AGTAGCAGTT CCCCTGACTC TCGGCGAGTG      540
ACATGTGGAA TGGCGTCTCT GTCTGCAGAG AAGGTCACAC TGGACCRAAG GGACTATGAG      600
AAGTATTCAG TGTCTGCCA GGAGGATGTC ACCTGCCCAA CTGCCGAGGA GACCTTGCCC      660
ATTGAAGTGG CGTTGGAAGC ACGGCAGCAG AATAAATATG AGAACTACAG CACCAGCTTC      720
TTCATCAGGG ACATCATCAA ACCAGACCCG CCCAAGAAGT TGCAGATGAA GCCTTTGAAG      780
AATTCACAGG TGGAGGTCAG CTGGGAGTAC CCTGACTCCT GGAGCACTCC CCATTCTTAC      840
TTCTCCCTCA AGTTCTTTGT TCGAATCCAG CGCAAGAAAG AAAAGATGAA GGAGACAGAG      900
GAGGGGTGTA ACCAGAAAGG TCGTTCCTC GTAGAGAAGA CATCTACCGA AGTCCAATGC      960
AAAGGCGGGA ATGTCTGCGT GCAAGCTCAG GATCGCTATT ACAATTCCTC ATGCAGCAAG     1020
TGGGCATGTG TTCCCTGCAG GGTCCGATCC TAGGAATTCC     1060

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1060 pares base

ES 2 302 565 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

```

10      TTCGAACCCG ACGTCCAGCT AGCTGAGATC TCCTAGCTAG GGGTGGTACC CAGGAGTCTT      60
      CGATTGGTAG AGGACCAAAC GGTAGCAAAA CGACCACAGA GGTGAGTACC GGTACACCCT      120
15      CGACCTCTTT CTGCAATAC AACATCTCCA CCTGACCTGA GGGCTACGGG GACCTCTTTG      180
      TCACCTGGAG TGGACACTGT GCGGACTTCT TCTACTGTAG TGGACCTGGA GTCTGGTCTC      240
20      TGTACCTCAG TATCCGAGAC CTTTCTGGGA CTGGTAGTGA CAGTTTCTCA AAGATCTACG      300
      ACCGGTCATG TGGACGGTGT TTCCTCCGCT CTGAGACTCG GTGAGTGTAG ACGACGAGGT      360
25      GTTCTTCCTT TTACCTTAAA CCAGGTGACT TTAAATTTT TTAAAGTTT TGTCTGAAA      420
      GGACTTCACA CTTCTGTGGT TAATGAGGCC TGCCAAGTGC ACGAGTACCG ACCACGTTTC      480
30      TTGTACCTG AACTTCAAGT TGTAGTTCTC GTCATCGTCA AGGGGACTGA GAGCCCGTCA      540
      CTGTACACCT TACCGCAGAG ACAGACGTCT CTTCCAGTGT GACCTGGTTT CCCTGATACT      600
      CTTCATAAAT CACAGGACGG TCCTCCTACA GTGGACGGGT TGACGGCTCC TCTGGGACGG      660
40      GTAACCTGAC CGCAACCTTC GTGCCGTCGT CTTATTTATA CTCTTGATGT CGTGGTCGAA      720
      GAAGTAGTCC CTGTAGTAGT TTGGTCTGGG CGGGTTCTTG AACGTCTACT TCGGAACCTT      780
45      CTTGAGTGTC CACCTCCAGT CGACCCTCAT GGGACTGAGG ACCTCGTGAG GGGTAAGGAT      840
      GAAGAGGGAG TTCAAGAAAC AAGCTTAGGT CGCGTTCTTT CTTTCTACT TCCTCTGTCT      900
50      CCTCCCCACA TTGGTCTTTC CACGCAAGGA GCATCTCTTC TGTAGATGGC TTCAGGTTAC      960
      GTTCCGCCCC TTACAGACGC ACGTTCGAGT CCTAGCGATA ATGTTAAGGA GTACGTCGTT      1020
55      CACCCGTACA CAAGGGACGT CCCAGGCTAG GATCTTAAGG      1060

```

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 335 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

ES 2 302 565 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

```

5      Met Gly Pro Gln Lys Leu Thr Ile Ser Trp Phe Ala Ile Val Leu Leu
      1              5              10              15

10     Val Ser Pro Leu Met Ala Met Trp Glu Leu Glu Lys Asp Val Tyr Val
              20              25              30

15     Val Glu Val Asp Trp Thr Pro Asp Ala Pro Gly Glu Thr Val Asn Leu
              35              40              45

20     Thr Cys Asp Thr Pro Glu Glu Asp Asp Ile Thr Trp Thr Ser Asp Gln
              50              55              60

25     Arg His Gly Val Ile Gly Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Thr Val Lys
      65              70              75              80

30     Glu Phe Leu Asp Ala Gly Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Thr
              85              90              95

35     Leu Ser His Ser His Leu Leu Leu His Lys Lys Glu Asn Gly Ile Trp
              100             105             110

40     Ser Thr Glu Ile Leu Lys Asn Phe Lys Asn Lys Thr Phe Leu Lys Cys
              115             120             125

45     Glu Ala Pro Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Ser Trp Leu Val Gln
              130             135             140

50     Arg Asn Met Asp Leu Lys Phe Asn Ile Lys Ser Ser Ser Ser Ser Pro
      145             150             155             160

55     Asp Ser Arg Ala Val Thr Cys Gly Met Ala Ser Leu Ser Ala Glu Lys
              165             170             175

```

ES 2 302 565 T3

Val Thr Leu Asp Gln Arg Asp Tyr Glu Lys Tyr Ser Val Ser Cys Gln
 180 185 190
 5
 Glu Asp Val Thr Cys Pro Thr Ala Glu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Leu
 195 200 205
 10
 Ala Leu Glu Ala Arg Gln Gln Asn Lys Tyr Glu Asn Tyr Ser Thr Ser
 210 215 220
 15
 Phe Phe Ile Arg Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln
 225 230 235 240
 20
 Met Lys Pro Leu Lys Asn Ser Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro
 245 250 255
 25
 Asp Ser Trp Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Lys Phe Phe Val
 260 265 270
 30
 Arg Ile Gln Arg Lys Lys Glu Lys Met Lys Glu Thr Glu Glu Gly Cys
 275 280 285
 35
 Asn Gln Lys Gly Ala Phe Leu Val Glu Lys Thr Ser Thr Glu Val Gln
 290 295 300
 40
 Cys Lys Gly Gly Asn Val Cys Val Gln Ala Gln Asp Arg Tyr Tyr Asn
 305 310 315 320
 45
 Ser Ser Cys Ser Lys Trp Ala Cys Val Pro Cys Arg Val Arg Ser
 325 330 335

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 16:

- 50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
 (A) LONGITUD: 61 pares base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 55 (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
 (D) TOPOLOGÍA: desconocida
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

CCGCCGGTGG CGGTGGCTCG GGCGGTGGTG GGTCGGGTGG CGGCGGATCT
 65 TCCATGGAGC 60
 T 61

ES 2 302 565 T3

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 61 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

CCATGGAAGA TCCGCCGCCA CCCGACCCAC CACCGCCCCGA GCCACCGCCA
CCGGC GGAGC 60
T 61

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

CAGAGTGAAA ATGAAGCT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

GAAGCTCTGC ATCCTGCT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 62 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

ES 2 302 565 T3

GGGTCCGATC CGGTGGCGGT GGCTCGGGCG GTGGTGGGTC GGGTGGCGGC
GGATCTTCCA 60

5 TG 62

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 21:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 70 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

GATCCATGGA AGATCCGCCG CCACCCGACC CACCACCGCC CGAGCCACCG

25 CCACCGGATC 60

GGACCCTGCA 70

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 22:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares base

35 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

CTATTACAAT TCCTCATG 18

45

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50 (A) LONGITUD: 18 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida

55 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

60

GAGGGCAAGG GTGGCCAA 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 24:

65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 67 pares base

ES 2 302 565 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

10 TTGCTGGAGC TCCGCCGGTG GCGGTGGCTC GGGCGGTGGT GGGTCGGGTG
GCGGCGGATC 60
TATGTGG 67

15 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 25:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 20 (A) LONGITUD: 67 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- 25 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

30 CACATAGATC CGCCGCCACC CGACCCACCA CCGCCCGAGC CACCGCCACC
GGCGGAGCTC 60
CAGCAAA 67

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 26:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 82 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- 45 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

50 CTGGCCTGCA GGGTCCGATC CGGTGGCGGT GGCTCGGGCG GTGGTGGGTC
GGGTGGCGGC 60
55 GGATCTAGGG TCATTCCAGT CT 82

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 27:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 82 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 65 (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

ES 2 302 565 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

5 CTGGAATGAC CCTAGATCCG CCGCCACCCG ACCCACCACC GCCCGAGCCA
CCGCCACCGG 60
ATCGGACCCT GCAGGCCAGA GA 82

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

15 (A) LONGITUD: 18 pares base
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
 20 (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

25 GCAAAGGCGG GAATGTCT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

- (A) LONGITUD: 18 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

AGGAATAATG TTTCAGTT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50 (A) LONGITUD: 18 pares base
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

60 CAGCAGTGCA GGAATAAT 18

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEO ID NO: 31:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 75 pares base

ES 2 302 565 T3

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

```
CCCTGCAGGG TCCGATCCGG TGGCGGTGGC TCGGGCGGTG GTGGGTCGGG
TGGCGGCGGA
TCTTCCATGG GTCAA
```

60

75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 75 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

```
CCCTGCAGGG TCCGATCCGG TGGCGGTGGC TCGGGCGGTG GTGGGTCGGG
TGGCGGCGGA
TCTTCCATGG GTCAA
```

60

75

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 96 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida
- (D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

```
TGTGTTCCCT GCAGGGTCCG ATCCGGTGGC GGTGGCTCGG GCGGTGGTGG
GTCGGGTGGC
GGCGGATCTA GGGTCATTCC AGTCTCTGGA CCTGCC
```

60

96

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 18 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: desconocida

ES 2 302 565 T3

(D) TOPOLOGÍA: desconocida

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

GTCATCTTCT TCAGGCGT

18

10 (2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 33 pares base

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

25 TGCAGTGGTG GCGGTGGCGG CGGATCTAGA AAC

33

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) DISPOSICIÓN EN HEBRAS:

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

40

Gly Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

45

50

55

60

65