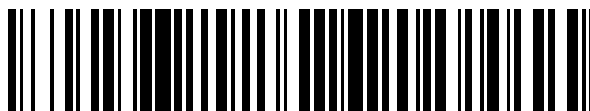


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 440 482**

51 Int. Cl.:

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2006** **E 06785283 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2013** **EP 1912677**

54 Título: **Conjugados de PSMA-anticuerpo-fármaco**

30 Prioridad:

20.06.2005 US 692399 P

14.04.2006 US 792360 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.01.2014

73 Titular/es:

PSMA DEVELOPMENT COMPANY, L.L.C.
(100.0%)

PROGENICS PHARMACEUTICALS, 777 OLD SAW
MILL RIVER ROAD
TARRYTOWN, NEW YORK 10591, US

72 Inventor/es:

MA, DANGSHE;
MADDON, PAUL J.;
OLSON, WILLIAM C.;
DORONINA, SVETLANA O.;
TOKI, BRIAN E. y
SENER, PETER D.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 440 482 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugados de PSMA-anticuerpo-fármaco

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere, en general, a conjugados anticuerpo-fármaco (ADCs – siglas en inglés). En particular, la invención se refiere a ADCs que comprenden un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno prostático específico de membrana (PSMA – siglas en inglés) y está conjugado a monometilauristatin norefredina (MMAE – siglas en inglés) o monometilauristatin fenilalanina (MMAF – siglas en inglés). El conjugado anticuerpo-fármaco tiene una selectividad por células PC-3™ a células C4-2 o LNCaP™ de al menos 250. La invención también se refiere, en parte, a composiciones de los ADCs. Los métodos proporcionados incluyen, por ejemplo, métodos para tratar una enfermedad mediada por PSMA.

15 **Antecedentes de la invención**

El cáncer de próstata es el cáncer más común y la segunda causa destacada de fallecimientos por cáncer en el hombre en los Estados Unidos de América (Jemal A, et al., *CA Cancer J Clin* 2005; 55:10-30). El cáncer de próstata localizado es tratado típicamente con cirugía o radiación, y la enfermedad recurrente puede ser controlada temporalmente con la ablación de andrógenos (Klein EA, et al., *Urol Clin North Am* 2003; 30:315-30). Sin embargo, casi todos los carcinomas de próstata se convierten finalmente en hormona-refractarios y progresan entonces rápidamente (Denmeade SR, et al., *Nat Rev Cancer* 2002; 2:389-96). El cáncer de próstata hormona-refractario o andrógeno-independiente ha demostrado ser ampliamente resistente a una quimioterapia convencional. Con la excepción de un cuidado paliativo, la única quimioterapia aprobada es docetaxel en combinación con prednisona, que ofrece un beneficio de supervivencia modesto (2,4 meses) (Gulley J. et al., *Am J Ther.* 2004; 351: 1513-20; Petrylak DP, et al., *New Engl J Med* 2004; 351:1513-20). Se necesitan nuevas terapias molecularmente dirigidas.

Sumario de la invención

30 La invención proporcionada en esta memoria se refiere a ADCs que exhiben una selectividad particularmente elevada. En un aspecto de la invención, se proporciona un conjugado anticuerpo-fármaco que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PSMA y está conjugado a monometilauristatin norefredina o monometilauristatin fenilalanina, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una selectividad por células PC-3™ a células C4-2 o LNCaP™ de al menos 250, y 3 ó 4 moléculas de monometilauristatin norefredina o monometilauristatin fenilalanina están conjugadas al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En una realización, la selectividad es al menos 500, 1000, 2500, 6000 ó 13.000. En otra realización, la selectividad es 1567, 6286 ó 13.636.

Se proporcionan en esta memoria ejemplos de anticuerpos que se pueden utilizar en las composiciones y los métodos de la invención, en algunas realizaciones. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a PSMA. Todavía en otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un dominio extracelular de PSMA. En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a un epítipo conformacional de PSMA.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo (i) inhibe competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA, o (ii) se une a un epítipo en PSMA definido por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 y Abgenix 4.152.1. En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo en PSMA definido por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en

secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8-13.

En algunas realizaciones, el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 y Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8-13.

En otras realizaciones, el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2 y 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8 y 9. En una realización, el segundo anticuerpo comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 2, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 8. En una realización adicional, el segundo anticuerpo comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 9.

En algunas realizaciones, el anticuerpo del conjugado anticuerpo-fármaco es un anticuerpo codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2 y 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8 y 9. En una realización, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 95% idéntica. En otra realización el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 97% idéntica. Todavía en otra realización, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 98% idéntica. En una realización adicional, el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 99% idéntica.

En otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de los conjugados anticuerpo-fármaco proporcionados en esta memoria es AB-PG1-XG1-006, AB-PG1-XG1-026 o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2 y 3, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8 y 9, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 2, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 8, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 3, y (b) una cadena ligera codificada

por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 9, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

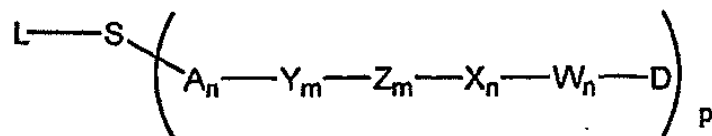
En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE o tiene un dominio constante y/o variable de inmunoglobulina de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.

En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo humano. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo recombinante. En realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. Todavía en realizaciones adicionales, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o multispecífico. Todavía en otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla.

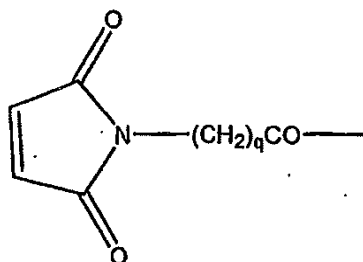
En otras realizaciones, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento Fv. Todavía en otras realizaciones, el fragmento de unión a antígeno es un fragmento que contiene CDR3.

En algunas realizaciones, la monometilauristatin norefredina (MMAE) o monometilauristatin fenilalanina (MMAF) está conjugada al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo con un compuesto de la fórmula (Fórmula 1) $-A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-$, en donde A es una unidad acilo carboxílica, Y es un aminoácido; Z es un aminoácido; X y W son cada uno un espaciador auto-inmolativo; n es un número entero de 0 ó 1; y m es un número entero de 0 ó 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En algunas realizaciones, el conjugado de la presente invención se representa por la fórmula (Fórmula 2): $L-[A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-D]_p$, en donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PSMA, D es MMAE o MMAF y p es un número entero de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. El resto de los componentes de los conjugados son como se definen inmediatamente antes.

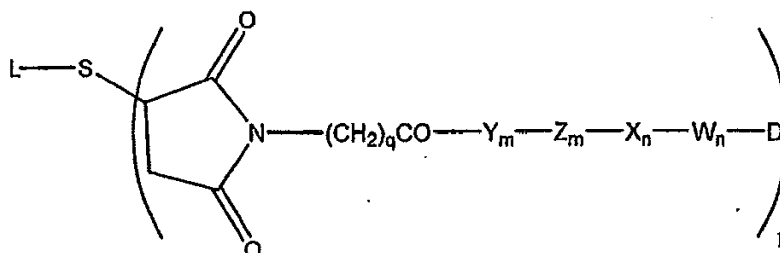
En una realización, la unidad carboxílica "A_n" está enlazada al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de un átomo de azufre derivado del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo:



En una realización, A es



en que q es 1-10. Por lo tanto, en una realización, el conjugado de Fórmula 2 es:

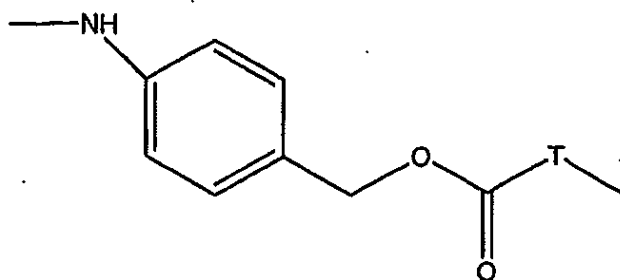


en donde L, Y, Z, X, W, D, n, m, q y p son como se definen previamente.

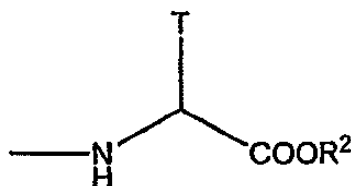
En otra realización, A es 4-(N-succinimidometil)ciclohexano-1-carbonilo, m-succinimidobenzoílo, 4-(p-succinimidofenil)-butirilo, 4-(2-acetamido)benzoílo, 3-tiopropionilo, 4-(1-tioetil)-benzoílo, 6-(3-tiopropionilamido)-hexanoílo o maleimida-caproílo. En una realización adicional, A es maleimida-caproílo.

En otra realización, Y es alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o prolina. Todavía en otra realización, Y es valina. En una realización adicional, Z es lisina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con tosilo o grupos nitro, histidina, ornitina, ornitina protegida con acetilo o formilo, o citrulina. Todavía en una realización adicional, Z es citrulina. En una realización, Y_m-Z_m es valina-citrulina. En otra realización, Y_m-Z_m es una secuencia de proteínas que es selectivamente escindible por una proteasa.

En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula

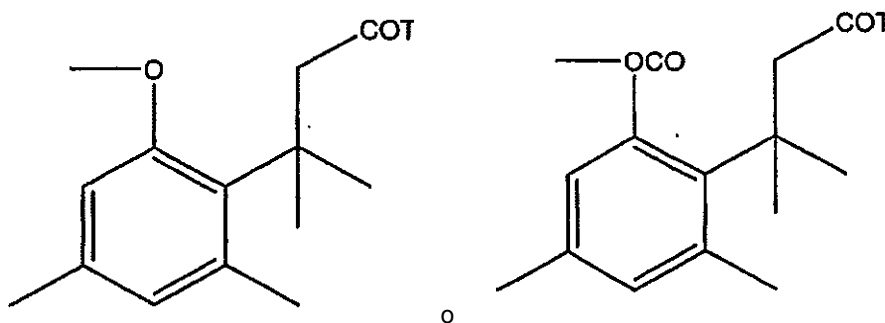


en que T es O, N o S. En otra realización, X es un compuesto que tiene la fórmula $-HN-R^1-COT$, en que R^1 es alquilo C_1-C_5 , T es O, N o S. En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula



en que T es O, N o S, R^2 es H o alquilo C_1-C_5 . En una realización, X es p-aminobencilcarbamoiilo. En otra realización, X es alcohol p-aminobencílico. En una realización adicional, X es carbamato de p-aminobencilo. Todavía en otra realización adicional, X es p-aminobenciloxycarbonilo. En otra realización, X es ácido γ -aminobutírico, ácido α,α -dimetil- γ -aminobutírico o ácido β,β -dimetil- γ -aminobutírico.

En algunas realizaciones, W es



en que T es O, S o N.

En otras realizaciones, m y n son 0.

En una realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefredina. En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin fenilalanina. En una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-006-maleimida-caproil-monometilauristatin fenilalanina. En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-026-maleimida-caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefredina. Todavía en otra

realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-026-maleimida-caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonil-monometilauristatin fenilalanina. En una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco es AB-PG1-XG1-026-maleimida-caproil- monometilauristatin fenilalanina. En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es un anticuerpo de unión a PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado al compuesto tal como se muestra en **Fig. 6A**, **Fig. 6B** o **Fig. 6C**.

En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco se une a células vivas. En una realización la célula es una célula tumoral. En otra realización, la célula tumoral es una célula de tumor de próstata. En una realización adicional, la célula tumoral es una célula de la neovascularización de un tumor no prostático. En otras realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco no requiere la lisis de las células para unirse a PSMA. Todavía en otras realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco conduce a una paralización del ciclo celular. Todavía en realizaciones adicionales, el conjugado anticuerpo-fármaco inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA. En una realización el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} menor que 1×10^{-10} M. En otra realización, la CI_{50} es menor que 1×10^{-11} M. Todavía en otra realización, la CI_{50} es menor que 1×10^{-12} M. En una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 11 a 208×10^{-12} M. Todavía en una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 42 a 208×10^{-12} M. Todavía en una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 60 a 208×10^{-12} M. En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 65 a 208×10^{-12} M. En una realización, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 11×10^{-12} M. En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 42×10^{-12} M. Todavía en otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 60×10^{-12} M. En una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de 83×10^{-12} M.

En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco, cuando se administra a ratones con un régimen de q4d x 6 a una dosis de 6 mg/kg resulta en una tasa de curación de al menos 20%, 30%, 40% o 50%. En una realización, la tasa de curación es de 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más. En una realización, los ratones son aquellos que son un modelo de cáncer de próstata humano andrógeno-independiente. En otra realización, los ratones son ratones inmunológicamente deficientes a los que se les han injertado intramuscularmente células C4-2 en la pata trasera izquierda. En una realización adicional, los ratones son los proporcionados en los **Ejemplos**.

En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco está unido a un marcador. En otras realizaciones, el marcador es un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador activo de resonancia magnética nuclear, un marcador luminiscente o un marcador cromóforo.

En algunas realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco está envasado en forma liofilizada. En otras realizaciones, el conjugado anticuerpo-fármaco está envasado en un medio acuoso. En realizaciones adicionales, el conjugado anticuerpo-fármaco está en una forma estéril.

También se proporcionan en esta memoria composiciones que comprenden uno o más conjugados anticuerpo-fármaco. En algunas realizaciones, la composición comprende dos o más conjugados anticuerpo-fármaco diferentes. En otras realizaciones, se proporciona una composición que comprende uno o más conjugados anticuerpo-fármaco y uno o más anticuerpos anti-PSMA no conjugados.

En algunas realizaciones, la composición comprende, además, un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, la composición comprende, además, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un corticosteroide o una combinación de los mismos. En una realización, el agente antitumoral es un agente citotóxico, un agente que actúa sobre la neovascularización del tumor o una combinación de los mismos. En otra realización el agente antitumoral es docetaxel. Todavía en otra realización, el inmunomodulador es una citoquina, quimioquina, adyuvante o una combinación de los mismos. Todavía en otra realización, el agente inmunoestimulante es interleuquina-2, α -interferón, γ -interferón, factor α de necrosis tumoral, oligonucleótidos inmunoestimuladores o una combinación de los mismos. En una realización adicional, el corticosteroide es prednisona o hidrocortisona. En todavía una realización adicional, la composición comprende prednisona y docetaxel.

Los conjugados anticuerpo-fármaco y composiciones de la invención se pueden utilizar en una diversidad de

métodos. En una realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA, que comprende poner en contacto la célula que expresa PSMA con una cantidad de un conjugado anticuerpo-fármaco eficaz para inhibir el crecimiento de la célula que expresa PSMA. En otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es para uso en un método para efectuar la

5 paralización del ciclo celular en una célula que expresa PSMA, que comprende poner en contacto la célula que expresa PSMA con una cantidad de un conjugado anticuerpo-fármaco eficaz para conducir a una paralización del ciclo celular en la célula que expresa PSMA. Todavía en otra realización, el conjugado anticuerpo-fármaco es para uso en un método para tratar una enfermedad mediada por PSMA, que comprende administrar a un sujeto que

10 tiene una enfermedad mediada por PSMA una cantidad de un conjugado anticuerpo-fármaco eficaz para tratar la enfermedad mediada por PSMA. En una realización adicional, el conjugado anticuerpo-fármaco es para uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor, que comprende poner en contacto células que expresan PSMA de la neovascularización del tumor con una cantidad de un conjugado anticuerpo-fármaco eficaz para inhibir el crecimiento del tumor.

15 En una realización, la enfermedad mediada por PSMA es cáncer. En otra realización, el cáncer es un cáncer de próstata. Todavía en otra realización, el cáncer es un cáncer no prostático. En algunas realizaciones, el cáncer no prostático es cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma.

20 En algunas realizaciones, el método comprende, además, co-administrar otro agente terapéutico para tratar la enfermedad mediada por PSMA. En otras realizaciones, el método comprende, además, poner en contacto células que expresan PSMA con otro agente terapéutico. En algunas realizaciones, el otro agente terapéutico se ha de administrar antes, durante o después de la administración del conjugado anticuerpo-fármaco. En una realización, el otro agente terapéutico es un agente antitumoral, un agente inmunoestimulador, un inmunomodulador, un

25 corticosteroide o una combinación de los mismos. En otra realización, el agente antitumoral es un agente citotóxico, un agente que actúa sobre la neovascularización del tumor o una combinación de los mismos. Todavía en otra realización el agente antitumoral es docetaxel. Todavía en otra realización, el inmunomodulador es una citoquina, quimioquina, adyuvante o una combinación de los mismos. Todavía en otra realización, el agente inmunoestimulante es interleuquina-2, α -interferón, γ -interferón, factor α de necrosis tumoral, oligonucleótidos

30 inmunoestimuladores o una combinación de los mismos. En una realización adicional, el corticosteroide es prednisona o hidrocortisona. En una realización, el agente terapéutico es una vacuna. En otra realización, la vacuna inmuniza al sujeto frente a PSMA. En otra realización, el método comprende, además, administrar todavía otro agente terapéutico. En una realización, el todavía otro agente terapéutico es prednisona. Por lo tanto, en una realización se administran tanto docetaxel como prednisona.

35 La célula que expresa PSMA es, en algunas realizaciones, una célula de tumor prostático o una célula de la neovascularización de un tumor no prostático. En algunas realizaciones, la célula que expresa PSMA es una célula andrógeno-dependiente o una célula andrógeno-independiente.

40 Cada una de las limitaciones de la invención puede comprender diversas realizaciones de la invención. Por lo tanto, se anticipa que cada una de las limitaciones de la invención que impliquen a cualquier elemento o combinaciones de elementos puede estar incluida en cada uno de los aspectos de la invención.

Breve Descripción de las Figuras

45 La **Fig. 1** es una gráfica que muestra el porcentaje de internalización y la unión total de PSMA Acm marcado con ^{111}In en células C4-2. Células C4-2 se incubaron con Acm marcado con ^{111}In a 37°C, 5% de CO_2 . En los instantes designados, las células se lavaron para separar el Acm no unido, y Acm unido a la superficie se separó por arrastre utilizando tampón de bajo pH. La radiactividad (recuentos por minuto (RPM)) del material eluido de bajo

50 pH y el sedimento de las células se recontó por separado utilizando un contador gamma. El porcentaje de internalización (**Fig. 1A**) se calculó como el RPM de sedimento de células/(RPM de sedimento de células + RPM de material eluido de bajo pH) x 100. La unión total (**Fig. 1B**) representa el RPM del sedimento de células más el RPM del material eluido de bajo pH.

55 La **Fig. 2** es una gráfica que muestra la unión de PSMA Acm y ADC a células 3T3TM-PSMA. Células 3T3TM-PSMA se incubaron con concentraciones crecientes del PSMA Acm (cuadrados en negro), PSMA ADC (cuadrados en blanco) o ADC control de isotipo (triángulos abiertos). Las células se incubaron en hielo durante 1 h y se lavaron para separar el Acm o ADC no unido. Después, las células se incubaron con IgG-FITC anti-humana de cabra, se lavaron de nuevo y se examinaron mediante citometría de flujo. Las intensidades de fluorescencia media (MFIs) se

60 representan como una función de la concentración de Acm o ADC.

La **Fig. 3** es una gráfica que muestra la citotoxicidad *in vitro* del PSMA ADC y ADC control sobre líneas de células de cáncer de próstata PSMA-positivas y PSMA-negativas. Células C4-2 PSMA-positivas (**Fig. 3A**) y células PC-3TM PSMA-negativas (**Fig. 3B**) en microplacas de 96 pocillos se expusieron a ADCs a diversas concentraciones. Al cabo de 96 horas, se sometió a ensayo la supervivencia de células en cultivos tratados y no tratados utilizando azul de Alamar.

La **Fig. 4** es una gráfica que muestra la supervivencia según Kaplan-Meier y los niveles de PSA en suero en un estudio de xenoinjerto. A ratones inmunológicamente deficientes se les implantaron por vía intramuscular células C4-2, asignadas aleatoriamente a grupos de tratamiento (6 ratones por grupo) de acuerdo con el PSA del suero el día 17 y luego se trataron q4d x 3 con PSMA ADC o vehículo. La **Fig. 4A** muestra la supervivencia de animales tratados con 0 (control vehículo, línea de trazos discontinuos), 2 mg/kg (línea continua fina) y 10 mg/kg de PSMA ADC. La **Fig. 4B** proporciona los valores de PSA medios a lo largo de 30 días en ratones tratados con 0 (columnas en negro), 2 mg/kg (columnas a rayas) y 10 mg/kg (columnas en blanco) de PSMA ADC. Los datos para el día 30 para el grupo control incluyen las evaluaciones el día 27 para dos ratones que no sobrevivieron los 30 días.

La **Fig. 5** muestra las curvas de supervivencia según Kaplan-Meier de animales tratados en otro estudio de xenoinjerto. A ratones inmunológicamente deficientes se les implantaron por vía intramuscular células C4-2, asignadas aleatoriamente a grupos de tratamiento (5 ratones por grupo) de acuerdo con el PSA del suero el día 14 y luego fueron tratados q4d x 6 con PSMA ADC y controles. Los ratones fueron tratados con 0 (control vehículo, círculos en negro), 6 mg/kg de PSMA Acm no modificado (triángulos en negro), 6 mg/kg de ADC control (triángulos en blanco), 3 mg/kg de PSMA ADC (cuadrados en blanco) y 6 mg/kg de PSMA ADC (cuadrados en negro).

La **Fig. 6** muestra las estructuras químicas de tres enlazadores de fármacos diferentes. La **Fig. 6A** proporciona la estructura de vcMMAE (maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxycarbonil-monometilauristatina E). La **Fig. 6B** proporciona la estructura de vcMMAF (maleimidocaproil-valina-citrulina-p-aminobenzoiloxycarbonil-monometilauristatina F). La **Fig. 6C** proporciona la estructura de mcMMAF (maleimidocaproil-monometilauristatina F).

La **Fig. 7** demuestra la citotoxicidad *in vitro* de PSMA ADCs (vcMMAE (**Fig. 7A**), vcMMAF (**Fig. 7B**), mcMMAF (**Fig. 7C**)) sobre líneas de células de cáncer de próstata PSMA-positivas (C4-2) y PSMA-negativas (PC-3TM). Las células en microplacas de 96 pocillos se expusieron a ADCs a diversas concentraciones. Al cabo de 4 días, la supervivencia de células en cultivos tratados y no tratados se sometió a ensayo utilizando azul de Alamar.

La **Fig. 8** ilustra los efectos de PSMA ADC sobre el ciclo celular. En cada uno de los paneles, el pico de la izquierda corresponde a la fase G₁ y el pico de la derecha a la fase G₂/M. El porcentaje de células en G₂/M aumentó acusadamente tras el tratamiento con el PSMA ADC, consistente con una paralización en la división celular que se produce después de la síntesis de ADN. El PSMA ADC no afectaba al ciclo de células 3T3TM parentales.

La **Fig. 9** muestra los resultados de una comparación de PSMA ADCs vcMMAE frente a vcMMAF.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se refiere, en parte, al sorprendente descubrimiento de que ADCs que comprenden un anticuerpo de unión a PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo, conjugados a MMAE (a la que se alude también en esta memoria como monometilauristatina E y monometilauristatina norefedrina) o MMAF (a la que se alude también en esta memoria como monometilauristatina F y monometilauristatina fenilalanina) son particularmente útiles para exterminar células que expresan PSMA. Los ADCs tienen una selectividad por células PC-3TM a células C4-2 o LNCaPTM de al menos 250, y 3 ó 4 moléculas de monometilauristatin norefedrina o monometilauristatin fenilalanina están conjugadas al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones, los ADCs exhiben determinados niveles de exterminio de células (de células que expresan PSMA), p. ej. valores CI₅₀ que son o están próximos a concentraciones picomolares. En otras realizaciones, los ADCs resultan en una tasa de curación de al menos 20%, 30%, 40% o 50% en ratones tratados con el ADC, con un régimen de q4d x 6 a una dosis de 6 mg/kg. Por lo tanto, se proporcionan composiciones y métodos de utilizar estos ADCs. En algunas realizaciones, los ratones son los previstos en los **Ejemplos**. En una realización, los ratones son aquellos que son un modelo de cáncer de próstata humano andrógeno-independiente. En otra realización, los ratones son ratones inmunológicamente deficientes a los que se les han injertado intramuscularmente células C4-2 en la pata trasera izquierda.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos de los ADCs son cualquier anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PSMA. En una realización, el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a PSMA (p. ej., se une específicamente a un dominio extracelular de PSMA, específicamente se une a un epítipo conformacional de PSMA, etc.) y puede inhibir competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA, en donde el segundo anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 y Abgenix 4.152.1 y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8-13. Por lo tanto, el segundo anticuerpo incluye cualquiera de los anticuerpos producidos por hibridomas o codificados por plásmidos mostrados a continuación en la **Tabla 1**. Estos hibridomas y plásmidos fueron depositados de acuerdo con y satisfaciendo los requisitos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en materia de Patentes con la American Type Culture Collection ("ATCC") como Autoridad de Depósito Internacional y a los que se les dio las Designaciones de Depósito de Patente mostradas anteriormente y en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Anticuerpo	Hibridoma/Plásmido	Designación del Depósito de Patente	Fecha de Depósito
PSMA 3.7	PSMA 3.7	PTA-3257	5 de abril de 2001
PSMA 3.9	PSMA 3.9	PTA-3258	5 de abril de 2001
PSMA 3.11	PSMA 3.11	PTA-3269	10 de abril de 2001
PSMA 5.4	PSMA 5.4	PTA-3268	10 de abril de 2001
PSMA 7.1	PSMA 7.1	PTA-3292	18 de abril de 2001
PSMA 7.3	PSMA 7.3	PTA-3293	18 de abril de 2001
PSMA 10.3	PSMA 10.3	PTA-3347	1 de mayo de 2001
	PSMA 10.3 HC en pcADN (SEQ ID NO: 7)	PTA-4413	29 de mayo de 2002
	PSMA 10.3 kappa en pcADN (SEQ ID NO: 13)	PTA-4414	29 de mayo de 2002
PSMA 1.8.3	PSMA 1.8.3	PTA-3906	5 diciembre de 2001
PSMA A3.1.3	PSMA A3.1.3	PTA-3904	5 diciembre de 2001
PSMA A3.3.1	PSMA A3.3.1	PTA-3905	5 diciembre de 2001
Abgenix 4.248.2	Abgenix 4.248.2	PTA-4427	4 de junio de 2002
Abgenix 4.360.3	Abgenix 4.360.3	PTA-4428	4 de junio de 2002
Abgenix 4.7.1	Abgenix 4.7.1	PTA-4429	4 de junio de 2002
Abgenix 4.4.1	Abgenix 4.4.1	PTA-4556	18 de julio de 2002
Abgenix 4.177.3	Abgenix 4.177.3	PTA-4557	18 de julio de 2002
Abgenix 4.16.1	Abgenix 4.16.1	PTA-4357	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.22.3	Abgenix 4.22.3	PTA-4358	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.28.3	Abgenix 4.28.3	PTA-4359	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.40.2	Abgenix 4.40.2	PTA-4360	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.48.3	Abgenix 4.48.3	PTA-4361	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.49.1	Abgenix 4.49.1	PTA-4362	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.209.3	Abgenix 4.209.3	PTA-4365	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.219.3	Abgenix 4.219.3	PTA-4366	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.288.1	Abgenix 4.288.1	PTA-4367	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.333.1	Abgenix 4.333.1	PTA-4368	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.54.1	Abgenix 4.54.1	PTA-4363	16 de mayo de 2002
Abgenix 4.153.1	Abgenix 4.153.1	PTA-4388	23 de mayo de 2002
Abgenix 4.232.3	Abgenix 4.232.3	PTA-4389	23 de mayo de 2002
Abgenix 4.292.3	Abgenix 4.292.3	PTA-4390	23 de mayo de 2002

Abgenix 4.304.1	Abgenix 4.304.1	PTA-4391	23 de mayo de 2002
AB-PG1-XG1-006	Cadena pesada de AB-PG1-XG1-006 (SEQ ID NO: 2) Cadena ligera de AB-PG1-XG1-006 (SEQ ID NO: 8)	PTA-4403 PTA-4404	29 de mayo de 2002
AB-PG1-XG1-026	Cadena pesada de AB-PG1-XG1-026 (SEQ ID NO: 3) Cadena ligera de AB-PG1-XG1-026 (SEQ ID NO: 9)	PTA-4405 PTA-4406	29 de mayo de 2002
AB-PG1-XG1-051	Cadena pesada de AB-PG1-XG1-051 (SEQ ID NO: 4) Cadena ligera de AB-PG1-XG1-051 (SEQ ID NO: 10)	PTA-4407 PTA-4408	29 de mayo de 2002
AB-PG1-XG1-069	Cadena pesada de AB-PG1-XG1-069 (SEQ ID NO: 5) Cadena ligera de AB-PG1-XG1-069 (SEQ ID NO: 11)	PTA-4409 PTA-4410	29 de mayo de 2002
AB-PG1-XG1-077	Cadena pesada de AB-PG1-XG1-077 (SEQ ID NO: 6) Cadena ligera de AB-PG1-XG1-077 (SEQ ID NO: 12)	PTA-4411 PTA-4412	29 de mayo de 2002

Para determinar la inhibición competitiva, se puede emplear una diversidad de ensayos conocidos por el experto ordinario en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar ensayos de competición cruzada para determinar si un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo inhibe de forma competitiva la unión a PSMA por parte de otro anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Estos ensayos incluyen métodos basados en células que emplean la citometría de flujo o el análisis de unión en fase sólida. También se pueden utilizar otros ensayos que evalúan la capacidad de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos para competir de forma cruzada por moléculas de PSMA que no están expresadas sobre la superficie de células, en fase sólida o en fase de disolución.

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos inhiben competitivamente la unión específica de un segundo anticuerpo a su epítipo diana en PSMA en al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99%. La inhibición se puede evaluar a diversas relaciones molares o relaciones másicas; por ejemplo, se pueden realizar experimentos de unión competitiva con un exceso molar de 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces o más de un primer anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo frente a un segundo anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un epítipo en PSMA definido por un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, 4.248.2, 4.360.3, 4.7.1, 4.4.1, 4.177.3, 4.16.1, 4.22.3, 4.28.3, 4.40.2, 4.48.3, 4.49.1, 4.209.3, 4.219.3, 4.288.1, 4.333.1, 4.54.1, 4.153.1, 4.232.3, 4.292.3, 4.304.1, 4.78.1 y 4.152.1. PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 y Abgenix 4.152.1, y anticuerpos que comprenden (a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2-7, y (b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8-13. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los ADCs incluyen, por lo tanto, los que se unen

específicamente a un epítipo en PSMA definidos por los anticuerpos producidos por los hibridomas o codificados por los plásmidos proporcionados antes en la **Tabla 1**.

Para determinar el epítipo se pueden utilizar métodos de representación en mapa de epítipos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar fragmentos (péptidos) de antígeno PSMA (p. ej. péptidos sintéticos) que unen el anticuerpo para determinar si un anticuerpo candidato o fragmento de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítipo. Para epítipos lineales se sintetizan péptidos solapantes de una longitud definida (p. ej. 8 o más aminoácidos). Los péptidos se pueden compensar en 1 aminoácido, de modo que se prepara una serie de péptidos que cubren cada 8 fragmentos de aminoácido de la secuencia de proteínas de PSMA. Se pueden preparar un menor número de péptidos utilizando mayores compensaciones, p. ej. de 2 ó 3 aminoácidos. Además, se pueden sintetizar péptidos mayores (p. ej. 9-, 10- u 11-meros). La unión de péptidos a anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno se puede determinar utilizando metodologías convencionales que incluyen ensayos de resonancia de plasmón superficial (BIACORE) y ELISA. Para el examen de epítipos conformacionales, se pueden utilizar fragmentos de PSMA mayores. Se han descrito y se pueden utilizar otros métodos que utilizan la espectrometría de masas para definir epítipos conformacionales (véase, p. ej., Baerga-Ortiz et al, *Protein Science* 11:1300-1308, 2002 y referencias citadas en el mismo). Todavía otros métodos para la determinación de epítipos se proporcionan en trabajos de referencia de laboratorio convencionales tales como Unidad 6.8 ("Phage Display Selection and Analysis of B-cell Epitopes") y Unidad 9.8 ("Identification of Antigenic Determinants Using Synthetic Peptide Combinatorial Libraries") de *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., comps., John Wiley & Sons. Los epítipos se pueden confirmar introduciendo mutaciones o delecciones puntuales en un epítipo conocido, y luego sometiendo a ensayo la unión con uno o más anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno para determinar qué mutaciones reducen la unión de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno.

En realizaciones particulares, los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs son los producidos por hibridomas a los que se alude en esta memoria como PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgenix 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgenix 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 y Abgenix 4.152.1, respectivamente. En otras realizaciones, los anticuerpos son los codificados por los plásmidos mostrados en la **Tabla 1**. Todavía en otras realizaciones particulares, los anticuerpos son los que comprenden una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2-7, y una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8-13.

Tal como se utiliza en esta memoria, los nombres de los hibridomas o plásmidos depositados se pueden utilizar indistintamente con los nombres de los anticuerpos. Resultará claro para un experto ordinario en la técnica cuando el nombre pretende aludir al anticuerpo o cuando alude a los plásmidos o hibridomas que codifican o producen los anticuerpos, respectivamente. Adicionalmente, los nombres de anticuerpos pueden ser una forma abreviada del nombre mostrado en la **Tabla 1**. Por ejemplo, al anticuerpo AB-PG1-XG1-006 se le puede aludir como AB-PG1-XG1-006, PG1-XG1-006, XG1-006, 006, etc. En otro ejemplo, al nombre de anticuerpo PSMA 4.232.3 se le puede aludir como PSMA 4.232.1, 4.232.3, 4.232.1, 4.232, etc. Se pretende que todas las variaciones en el nombre del anticuerpo aludan al mismo anticuerpo y no a uno diferente.

Los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs incluyen los codificados por conjuntos particulares de secuencias de cadenas pesadas y ligeras. En una realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-006) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de las secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 2 y 8. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-026) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de las secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 3 y 9. Todavía en una realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-051) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de las secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 4 y 10. Todavía en otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-069) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de las secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 5 y 11. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-077) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de las secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 6 y 12. Todavía en otra realización, el anticuerpo (PSMA 10.3) es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de las

secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 7 y 13. En otras realizaciones, los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs incluyen una región variable de cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 14, 18, 22, 26 y 30, y una región variable de cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende una región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 16, 20, 24, 28 y 32. En una realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-006) incluye una secuencia variable de inmunoglobulina codificada por moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una región o regiones codificadoras de las secuencias de ácidos nucleicos recogidas como SEQ ID NOs: 14 y 16. De igual manera, el anticuerpo puede ser uno que incluya una secuencia variable de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 15 y 17. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-026) incluye una secuencia variable de inmunoglobulina codificada por moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una región o regiones codificadoras de la secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 18 y 20, o incluye una secuencia variable de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 19 y 21. Todavía en otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-051) incluye una secuencia variable de inmunoglobulina codificada por las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una región o regiones codificadoras de secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 22 y 24, o incluye una secuencia variable de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 23 y 25. Todavía en otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-069) incluye una secuencia variable de inmunoglobulina codificada por las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una región o regiones codificadoras de secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 26 y 28 o incluye una secuencia variable de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 27 y 29. En otra realización, el anticuerpo (AB-PG1-XG1-077) incluye una secuencia variable de inmunoglobulina codificada por las moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una región o regiones codificadoras de secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 30 y 32 o incluye una secuencia variable de inmunoglobulina que comprende las secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 31 y 33. En otras realizaciones, el anticuerpo incluye una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 15, 19, 23, 27 y 31, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos recogidas como SEQ ID NOs: 17, 21, 25, 29 y 33.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "región codificadora" se refiere a una región de una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de polipéptidos. Su uso en esta memoria es consistente con el significado reconocido, conocido en la técnica.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son los que son codificados por moléculas de ácidos nucleicos que son altamente homólogas a los ácidos nucleicos que anteceden. La molécula de ácido nucleico homóloga, en algunas realizaciones, puede comprender una secuencia de nucleótidos que es al menos aproximadamente 90% idéntica a la secuencia de nucleótidos proporcionada en esta memoria. En otras realizaciones, la secuencia de nucleótidos es al menos aproximadamente 95% idéntica, al menos aproximadamente 97% idéntica, al menos aproximadamente 98% idéntica o al menos aproximadamente 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos proporcionada en esta memoria. La homología se puede calcular utilizando diversas herramientas de software, públicamente disponibles y bien conocidas para un experto ordinario en la técnica. Herramientas ilustrativas incluyen el sistema BLAST disponible de la página web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en el National Institutes of Health.

Un método para identificar secuencias de nucleótidos altamente homólogas es a través de la hibridación del ácido nucleico. Así, la invención incluye también anticuerpos que tienen las propiedades de unión a PSMA y otras propiedades funcionales descritas en esta memoria, que son codificados por moléculas de ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de alta rigurosidad a las moléculas de ácidos nucleicos que anteceden. La identificación de secuencias relacionadas también se puede conseguir utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR – siglas en inglés) y otras técnicas de amplificación adecuadas para clonar secuencias de ácidos nucleicos relacionadas. Cebadores de PCR se pueden seleccionar para amplificar partes de una secuencia de ácidos nucleicos de interés tal como una CDR (siglas inglesas de región determinante de la complementariedad).

La expresión "condiciones de alta rigurosidad", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a parámetros con los que es familiar la técnica. Parámetros de hibridación de ácidos nucleicos se pueden encontrar en referencias que recopilan métodos de este tipo, p. ej. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook, et al., comps.,

Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel, et al., comps., John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Un ejemplo de condiciones de alta rigurosidad es la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3,5X SSC, Ficoll al 0,02%, polivinilpirrolidona al 0,02%, albúmina de suero bovino al 0,02%, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5%, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,015 M, pH 7; SDS es dodecilsulfato de sodio; y EDTA es ácido etilendiaminotetraacético. Después de la hibridación, una membrana a la cual se transfiere el ácido nucleico, se lava, por ejemplo, en 2X SSC a la temperatura ambiente y luego a 0,1-0,5X SSC/0,1X SDS a temperaturas de hasta 68°C.

Tal como se utiliza en esta memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) inter-conectadas por enlaces disulfuro. Cada una de las cadenas pesadas está constituida por una región variable de la cadena pesada (abreviada en esta memoria como HCVR o V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está constituida por tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3. Cada una de las cadenas ligeras está constituida por una región variable de la cadena ligera (abreviada en esta memoria como LCVR o V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está constituida por un dominio, CL. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR – siglas en inglés). Cada una de V_H y V_L está constituida por tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores hospedadores, incluidas diversas células del sistema inmune (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

La expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo, tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a una o más partes de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (es decir, PSMA). Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, V_H y C_L y C_H1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_H1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546) que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Las CDRs y, en particular, las regiones CDR3 y, más particularmente, la CDR3 de cadena pesada contribuyen en la especificidad del anticuerpo. Debido a que estas regiones CDR y, en particular, la región CDR3 confieren especificidad al antígeno en el anticuerpo, estas regiones se pueden incorporar en otros anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno para conferir la especificidad del antígeno idéntica sobre ese anticuerpo o péptido. Además de ello, a pesar de que los dos dominios del fragmento Fv, V y V_H, son codificados por genes separados, éstos se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, por parte de un enlazador sintético que les permite producirlos como una cadena de proteínas sencilla en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, p. ej., Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883). Anticuerpos de cadena sencilla de este tipo también pretenden quedar abarcados dentro de la expresión “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando procesos convencionales tales como procesos de fragmentación proteolítica tal como se describe en J. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, págs. 98-118 (N.Y. Academic Press 1983), así como por otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Los fragmentos son rastreados en cuanto a su utilidad de la misma manera que lo son los anticuerpos intactos.

Los anticuerpos, o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de los ADCs, están en algunas realizaciones, aislados. “Aislados”, tal como se utiliza en esta memoria, pretende aludir a un anticuerpo (o fragmento de unión a antígeno del mismo) que está esencialmente exento de otros anticuerpos (o fragmentos de unión a antígeno) con diferentes especificidades antigénicas (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a PSMA está esencialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos que no sean PSMA). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de PSMA puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, p. ej., de otras especies (p. ej., homólogos de especies de PSMA). Además de ello, un anticuerpo aislado (o fragmento de unión a antígeno del mismo) puede estar esencialmente exento de otro material celular y/o productos químicos. Tal como se utiliza en esta memoria, “unión específica” se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado, en este caso PSMA. Típicamente, el

anticuerpo se une con una afinidad que es al menos dos veces mayor que su afinidad por unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína), que es un antígeno distinto de PSMA, una isoforma o variante de PSMA o un antígeno estrechamente relacionado.

Los anticuerpos abarcan diversos isotipos de anticuerpos tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE. Tal como se utiliza en esta memoria, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpos (p. ej., IgM o IgG1) que es codificada por genes de la región constante de la cadena pesada. Los anticuerpos pueden ser de longitud completa o pueden incluir sólo un fragmento de unión a antígeno tal como el dominio constante y/o variable de anticuerpo de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE, o podrían consistir en un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ y un fragmento Fv.

Los anticuerpos de los ADCs, o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs son, en algunas realizaciones, monoclonales. Los anticuerpos se pueden producir por una diversidad de técnicas bien conocidas en la técnica. La producción de anticuerpos monoclonales puede efectuarse mediante técnicas que son bien conocidas en la técnica. La expresión "anticuerpo monoclonal", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a un preparado de moléculas de anticuerpo de una composición molecular sencilla. Un anticuerpo monoclonal exhibe una especificidad de unión sencilla y una afinidad por un epítipo particular. El procedimiento de la producción de anticuerpos monoclonales implica obtener células somáticas inmunes con el potencial de producir un anticuerpo, en particular linfocitos B, que han sido previamente inmunizados con el antígeno de interés, ya sea *in vivo* o *in vitro* y que sean adecuados para la fusión con una línea de mieloma de células B.

Linfocitos de mamíferos se inmunizan típicamente mediante inmunización *in vivo* del animal (p. ej., un ratón) con la proteína o polipéptido deseado. Inmunizaciones de este tipo se repiten según sea necesario a intervalos de hasta varias semanas para obtener un título suficiente de anticuerpos. Una vez inmunizados, los animales pueden utilizarse como una fuente de linfocitos productores de anticuerpos. Después del último refuerzo con antígenos, los animales son sacrificados y se les separan células del bazo. Linfocitos de ratón proporcionan un elevado porcentaje de fusiones estables con las líneas de mieloma de ratón descritas en esta memoria. Por ejemplo, del ratón BALB/c. Sin embargo, también se pueden utilizar como hospedadores para preparar células productoras de anticuerpos otras razas de ratones, conejos, hámsteres, ovejas y ranas. Véase; Goding (en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., págs. 60-61, Orlando, Fla., Academic Press, 1986). En particular, se pueden utilizar razas de ratones que tengan genes de inmunoglobulina humana insertados en el genoma (y que no puedan producir inmunoglobulinas de ratón). Ejemplos incluyen las razas de ratón HuMAb producidas por Medarex/GenPharm International, y las cepas XenoMouse producidas por Abgenix. Ratones de este tipo producen moléculas de inmunoglobulina totalmente humanas en respuesta a la inmunización. En algunas realizaciones, por lo tanto, los ADCs comprenden un anticuerpo monoclonal totalmente humano o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PSMA.

Preferentemente, se fusionan aquellas células productoras de anticuerpos que se encuentren en la fase de división del plasmablasto. Células somáticas se pueden obtener a partir de los nódulos linfáticos, bazos y sangre periférica de animales estimulados con antígenos, y las células linfáticas de elección dependen en gran medida de su utilidad empírica en el sistema de fusión particular. Los linfocitos secretores de anticuerpos se fusionan luego con células de mieloma de células B (de ratón) o células transformadas que son capaces de replicarse indefinidamente en cultivos celulares, produciendo con ello una línea de células inmortal, secretora de inmunoglobulina. Se cultivan las células fusionadas resultantes, o hibridomas, y las colonias resultantes se rastrean en cuanto a la producción de los anticuerpos monoclonales deseados. Colonias que producen este tipo de anticuerpos se clonan y se hacen crecer *in vivo* o *in vitro* para producir grandes cantidades de anticuerpos. Una descripción de la base teórica y de la metodología práctica de fusión de este tipo de células se recoge en Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975).

Alternativamente, células somáticas humanas capaces de producir anticuerpos, específicamente linfocitos B, son adecuadas para la fusión con líneas de células de mieloma. Aún cuando pueden utilizarse linfocitos B procedentes de bazos, amígdalas o nódulos linfáticos biopsiados de un individuo, también se pueden utilizar los linfocitos B de la sangre periférica más fácilmente accesibles. Los linfocitos pueden derivarse de pacientes con carcinomas de próstata diagnosticados u otro cáncer que exprese PSMA. Además, células B humanas pueden ser directamente immortalizadas por el virus Epstein-Barr (Cole et al., 1995, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). A pesar de que se pueden utilizar procesos de hibridación de células somáticas, en principio se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales tales como la transformación viral u oncogénica de linfocitos B.

Líneas de células de mieloma adecuadas para uso en procesos de fusión productores de hibridoma pueden ser no productoras de anticuerpos, tener una elevada eficacia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen

incapaces de desarrollarse en determinados medios selectivos que sustentan el desarrollo de los hibridomas deseados. Ejemplos de líneas de células de mieloma de este tipo que se pueden utilizar para la producción de líneas de células fusionadas incluyen P3-X63/Ag8, X63-Ag8.653, NS1/1. Ag 4.1, Sp2/0-Ag14, FO, NSO/U, MPC-11, MPC11-X45-GTG 1.7, S194/5XX0 Bul, todas derivadas de ratones; R210.RCY3, Y3-Ag 1.2.3, IR983F y 4B210 derivadas de ratas y U-266, GM1500-GRG2, LICR-LON-HMy2, UC729-6, todas ellas derivadas de seres humanos (Goding, en *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 2ª ed., págs. 65-66, Orlando, Fla., Academic Press, 1986; Campbell, en *Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* Vol. 13, Burden y Von Knippenberg, comps. págs. 75-83, Amsterdam, Elsevier, 1984).

La fusión con células de mieloma de mamíferos u otros participantes en la fusión capaces de replicarse indefinidamente en cultivos celulares se efectúa por técnicas convencionales y bien conocidas, por ejemplo utilizando polietilenglicol ("PEG") u otros agentes de fusión (véase Milstein y Kohler, *Eur. J. Immunol.* 6:511 (1976)).

En otras realizaciones, los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs, son anticuerpos recombinantes. La expresión "anticuerpo recombinante", tal como se utiliza en esta memoria, pretende incluir anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes tales como anticuerpos aislados de un animal (p. ej. un ratón) que es transgénico para otros genes de inmunoglobulina de las especies, anticuerpos expresados utilizando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de un banco de anticuerpos recombinantes y combinatorios, o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que implican el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

Todavía en otras realizaciones, los anticuerpos son anticuerpos quiméricos o humanizados. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que combina las regiones variables o hipervariables murinas con la región constante humana o las regiones de marco constantes y variables. Tal como se utiliza en esta memoria, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que conserva sólo las CDRs de unión a antígenos procedentes del anticuerpo parental en asociación con regiones de marco humanas (véase Waldmann, 1991, *Science* 252:1657). Se espera que anticuerpos quiméricos o humanizados de este tipo que conservan la especificidad de unión del anticuerpo murino tengan una inmunogenicidad reducida cuando se administran *in vivo* para aplicaciones de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una realización alternativa, los anticuerpos monoclonales de la presente invención se pueden modificar en forma de un anticuerpo biespecífico o un anticuerpo multiespecífico. La expresión "anticuerpo biespecífico" pretende incluir cualquier agente, p. ej. una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos, que tenga dos especificidades de unión diferentes que se unan a o interactúen con (a) un antígeno de la superficie de la célula y (b) un receptor Fc en la superficie de una célula efectora. La expresión "anticuerpo multiespecífico" pretende incluir cualquier agente, p. ej. una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos que tenga más de dos especificidades de unión diferentes que se unan a o interactúen con (a) un antígeno de la superficie de la célula y (b) un receptor Fc en la superficie de una célula efectora y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos biespecíficos, trispecíficos, tetraespecíficos y otros anticuerpos multiespecíficos que están dirigidos a PSMA y a receptores Fc en células efectoras. La expresión "anticuerpos biespecíficos" incluye además diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos, en los que los dominios V_H y V_L se expresan en una cadena polipeptídica sencilla, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando con ello a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígenos (véase, p. ej., Holliger, P., *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poijak, R.J., *et al.* (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Un anticuerpo biespecífico se puede formar de una región de antígeno específica para PSMA y una región de unión a antígeno específica para una célula efectora que tiene una actividad tumoricida o inhibidora de tumores. Las dos regiones de unión a antígeno del anticuerpo biespecífico están químicamente enlazadas o pueden ser expresadas por una célula tratada genéticamente para producir el anticuerpo biespecífico. (Véase, en general, Fanger *et al.*, 1995, *Drug News & Perspec.* 8(3): 133-137). Células efectoras adecuadas con actividad tumoricida incluyen, pero no se limitan a células T citotóxicas (principalmente células $CD8^+$), células asesinas naturales, etc. Una cantidad eficaz de anticuerpo biespecífico de acuerdo con la invención puede administrarse a un sujeto con cáncer, y el anticuerpo biespecífico extermina y/o inhibe la proliferación de las células cancerígenas después de la localización en sitios de tumores primarios o metastásicos que portan PSMA.

En determinadas realizaciones, los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígenos de los ADCs son anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en esta

memoria, pretende incluir anticuerpos con regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (p. ej., mutaciones introducidas por mutagénesis al azar o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, la expresión “anticuerpo humano”, tal como se utiliza en esta memoria, no pretende incluir anticuerpos en los que secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias del marco humanas (a las que se alude en esta memoria como “anticuerpos humanizados”). Anticuerpos humanos dirigidos contra PSMA se pueden generar utilizando ratones transgénicos que portan partes del sistema inmune humano más que el sistema de ratón. Algunos ejemplos de los mismos se describieron anteriormente.

Anticuerpos monoclonales totalmente humanos también se pueden preparar inmunizando ratones transgénicos en grandes partes de loci de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. 5.591.669, 5.598.369, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y referencias citadas en ellas. Estos animales han sido genéticamente modificados de modo que existe una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (p. ej., murinos). Los animales se modifican adicionalmente de modo que contengan la totalidad o una parte del locus del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana, de modo que la inmunización de estos animales resulta en la producción de anticuerpos totalmente humanos contra el antígeno de interés. Después de la inmunización de estos ratones (p. ej., XenoMouse (Abgenix), ratones HuMAb (Medarex/GenPharm)), anticuerpos monoclonales se preparan de acuerdo con la tecnología del hibridoma estándar. Estos anticuerpos monoclonales tienen secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por lo tanto, no provocarán respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) cuando se administran a seres humanos. En general, pero no se pretende que sea limitante, los ratones son de una edad de 6-16 semanas tras la primera inmunización. Por ejemplo, se utiliza un preparado purificado o enriquecido de antígeno PSMA (p. ej., PSMA recombinante o células que expresan PSMA) para inmunizar intraperitonealmente (IP) a los ratones, a pesar de que también son posibles otras vías de inmunización conocidas por un experto ordinario en la técnica. El antígeno PSMA se inyecta en combinación con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund y, en algunas realizaciones, la inyección inicial es seguida por inmunizaciones de refuerzo con antígeno en un adyuvante tal como adyuvante incompleto de Freund. La respuesta inmune se vigila a lo largo del transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas, por ejemplo, mediante sangrado retro-orbital. El plasma se rastrea por ELISA y, para las fusiones se utilizan ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-PSMA. A los ratones se les refuerza por vía intravenosa con antígeno 3 días antes de sacrificarlos y de la separación del bazo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de los ADCs se puede seleccionar en cuanto a la capacidad de unirse a células que expresan PSMA vivas. Con el fin de demostrar la unión a células que expresan PSMA vivas se puede utilizar la citometría de flujo. Por ejemplo, líneas de células que expresan PSMA (desarrolladas bajo condiciones de crecimiento convencionales) o células de cáncer de próstata que expresan PSMA se mezclan con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en PBS que contiene Tween 80 al 0,1% y suero de ratón al 20%, y se incuban a 37°C durante 1 hora. Después del lavado, las células se hacen reaccionar con anticuerpo secundario de IgG anti-humano marcado con fluoresceína (si se utilizaron anticuerpos anti-PSMA humanos) bajo las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar mediante un instrumento clasificador de células activadas por fluorescencia (FACS), utilizando propiedades de dispersión de la luz y laterales para dirigirlos a células individuales. Se puede utilizar un ensayo alternativo que utilice microscopía de fluorescencia (además de o en lugar de) el ensayo de citometría de flujo. Las células se pueden teñir y examinar mediante microscopía de fluorescencia. Este método permite la visualización de células individuales, pero puede tener una sensibilidad disminuida dependiendo de la densidad del antígeno. Se deduce que los ADCs, en algunas realizaciones, se unen a células vivas. Por lo tanto, los ADCs, en algunas realizaciones, no requieren la lisis de la célula para unirse a PSMA.

En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden fomentar la citolisis de células que expresan PSMA. La citolisis puede ser mediada por el complemento o puede ser mediada por células efectoras. En una realización, la citolisis se lleva a cabo en un organismo vivo tal como un mamífero, y la célula viva es una célula tumoral. Ejemplos de tumores que pueden ser fijados como objetivo por los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen cualquier tumor que exprese PSMA (éste incluye tumores con PSMA que expresa la neovasculatura), tal como de próstata, vejiga, páncreas, pulmón, colon, riñón, melanomas y sarcomas. En una realización, la célula tumoral es una célula de cáncer de próstata.

El ensayo de la actividad citolítica *in vitro* por el ensayo de la liberación de cromo puede proporcionar un rastreo inicial antes del ensayo en modelos *in vivo*. Este ensayo se puede llevar a cabo utilizando ensayos de liberación de cromo convencionales. En síntesis, células polimorfonucleares (PMN) u otras células efectoras procedentes de

donantes sanos se pueden purificar mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. PMNs lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% y pueden mezclarse con células marcadas con ^{51}Cr que expresen PSMA, en diversas relaciones de células efectoras a células tumorales (células efectoras: células tumorales). IgGs anti-PSMA purificadas se pueden luego añadir a diversas concentraciones. IgG irrelevante se puede utilizar como un control negativo. Los ensayos se pueden llevar a cabo durante 0-120 minutos a 37°C. Las muestras se pueden someter a ensayo para la citolisis, midiendo la liberación de ^{51}Cr en el sobrenadante del cultivo. Anticuerpos monoclonales anti-PSMA y/o ADCs también se pueden someter a ensayo en combinaciones entre sí para determinar si la citolisis es reforzada con anticuerpos monoclonales múltiples y/o ADCs. Anticuerpos que se unen a PSMA y/o ADCs también pueden someterse a ensayo en un modelo *in vivo* (p. ej., en ratones) para determinar su eficacia en mediar en la citolisis y exterminar células que expresen PSMA, p. ej., células tumorales.

Los anticuerpos de los ADCs o de los que se derivan los fragmentos de unión a antígeno de los ADCs se pueden seleccionar, por ejemplo, en base a los siguientes criterios, que no pretenden ser exclusivos:

- 1) unión a células vivas que expresan PSMA;
- 2) elevada afinidad de unión a PSMA;
- 3) unión a un epítipo único en PSMA (es decir, un epítipo no reconocido por un anticuerpo previamente producido);
- 4) opsonización de células que expresan PSMA;
- 5) mediación de la inhibición del crecimiento, fagocitosis y/o exterminio de células que expresan PSMA en presencia de células efectoras;
- 6) modulación (inhibición o potenciación) de actividades de NAALADasa, folato hidrolasa, dipetidil peptidasa IV y/o γ -glutamyl-hidrolasa;
- 7) inhibición del crecimiento, paralización del ciclo celular y/o citotoxicidad en ausencia de células efectoras;
- 8) internalización de PSMA;
- 9) unión a un epítipo conformacional en PSMA;
- 10) reactividad cruzada mínima con células o tejidos que no expresan PSMA; y
- 11) unión preferente a formas dimericas de PSMA más que a formas monoméricas de PSMA.

Los anticuerpos pueden cumplir uno o más y, posiblemente, todos estos criterios.

En una realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo conformacional tal como un epítipo conformacional dentro del dominio extracelular de PSMA. Para determinar si un anticuerpo anti-PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a epítopos conformacionales, cada uno de los anticuerpos se pueden someter a ensayos utilizando proteína nativa (p. ej., inmunoprecipitación no desnaturante, análisis por citometría de flujo de la unión a la superficie de la célula) y proteína desnaturada (p. ej., bórñon de transferencia Western, inmunoprecipitación de proteínas desnaturadas). Una comparación de los resultados indicará si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo conformacional. Anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a proteína nativa, pero no a proteína desnaturada son, en algunas realizaciones, aquellos que se unen a epítopos conformacionales. Se deduce que los ADCs en algunas realizaciones, se unen a epítopos conformacionales de PSMA.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une a un epítipo específico de dímeros en PSMA. En general, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen a un epítipo específico para dímeros se unen preferentemente al PSMA dímero más que al PSMA monómero. Para determinar si un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une preferentemente (es decir., selectiva y/o específicamente) a un PSMA dímero, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede someter a ensayos (p. ej., inmunoprecipitación seguida de transferencia Western) utilizando proteína de PSMA dimerica nativa y proteína de PSMA monomérica disociada. Una comparación de los resultados indicará si el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une preferentemente al dímero. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se unen al PSMA dímero, pero no a la proteína de PSMA monomérica. Se deduce que los ADCs, en algunas realizaciones, se unen a un epítipo específico para el dímero en PSMA.

Por lo tanto, la invención incluye también ADCs que se unen selectivamente a PSMA multímero. Tal como se utiliza en esta memoria, particularmente con respecto a la unión de PSMA multímero por parte de los ADCs, "se une selectivamente" significa que un anticuerpo se une preferentemente a un multímero de proteína de PSMA (p. ej., con mayor avidez, mayor afinidad de unión) que a un monómero de proteína de PSMA. En algunas realizaciones, los ADCs de la invención se unen a un multímero de proteína de PSMA con una avidez y/o afinidad

de unión que es 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 7 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 70 veces, 100 veces, 200 veces, 300 veces, 500 veces, 1000 veces o más que la exhibida por el ADC para un monómero de proteína de PSMA. El ADC puede, en algunas realizaciones, unirse selectivamente a un multímero de proteína de PSMA y no a un monómero de proteína de PSMA, es decir, exclusivamente se une a un multímero de proteína de PSMA. En algunas realizaciones, el ADC se une selectivamente a un dímero de proteína de PSMA.

Un multímero de proteína de PSMA, tal como se utiliza en esta memoria, es un complejo proteínico de al menos dos proteínas de PSMA o fragmentos de las mismas. Los multímeros de proteína de PSMA pueden estar constituidos por diversas combinaciones de proteínas de PSMA de longitud completa (p. ej., SEQ ID NO: 1), PSMA soluble recombinante (rsPSMA, p. ej., aminoácidos 44-750 de SEQ ID NO: 1) y fragmentos de lo que antecede que forman multímeros (es decir, que conservan el dominio de proteína requerido para formar dímeros y/o multímeros de mayor orden de PSMA). En algunas realizaciones, al menos una de las proteínas de PSMA que forman el multímero es un polipéptido de PSMA recombinante, soluble (rsPSMA). Los multímeros de proteína de PSMA pueden ser dímeros tales como los formados a partir de proteína de PSMA recombinante soluble. En una realización, el dímero es un homodímero de rsPSMA. Se piensa que los multímeros de proteína de PSMA a los que se alude en esta memoria asumen una conformación nativa y pueden tener una conformación de este tipo. Las proteínas de PSMA en determinadas realizaciones están unidas de manera no covalente juntas para formar el multímero de proteína de PSMA. Por ejemplo, se ha descubierto que la proteína de PSMA se asocia de manera no covalente para formar dímeros bajo condiciones no desnaturizantes. Los multímeros de proteína de PSMA pueden conservar las actividades de PSMA. La actividad de PSMA puede ser una actividad enzimática, tal como una actividad de folato hidrolasa, actividad de NAALADasa, actividad de dipeptidil peptidasa IV o actividad de γ -glutamyl hidrolasa. Métodos para someter a ensayo la actividad de PSMA de multímeros son bien conocidos en la técnica (revisada por O'Keefe et al. en: *Prostate Cancer: Biology, Genetics, and the New Therapeutics*, L.W.K. Chung, W.B. Isaacs y J.W. Simons (comps.) Humana Press, Totowa, NJ, 2000, págs. 307-326).

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo de los ADCs se puede unir a y es internalizado con PSMA expresado en células. El mecanismo mediante el cual el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se internaliza con PSMA no es crítico para la práctica de la presente invención. Por ejemplo, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede inducir la internalización de PSMA. Alternativamente, la internalización del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede ser el resultado de una internalización rutinaria de PSMA. Se deduce que el ADC puede ser internalizado con PSMA expresado en células.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y, por lo tanto, los ADCs de la invención pueden unirse específicamente a PSMA de la superficie de la célula y/o rsPSMA con afinidad sub-nanomolar. Las afinidades de unión pueden ser de aproximadamente 1×10^{-9} M o menores, aproximadamente 1×10^{-10} M o menores o aproximadamente 1×10^{-11} M o menores. En una realización particular, la afinidad de unión es menor que aproximadamente 5×10^{-10} M.

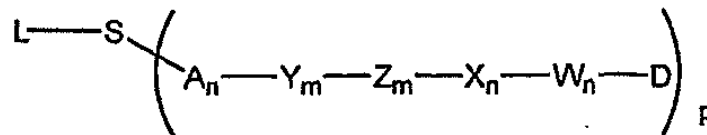
Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígenos de los mismos pueden modular, en algunas realizaciones, al menos una actividad enzimática de PSMA. La actividad se puede seleccionar del grupo que consiste en actividad de dipeptidasa de carácter ácido N-acetilada y α -enlazada (NAALADasa), folato hidrolasa, dipeptidil dipeptidasa IV, γ -glutamyl hidrolasa y combinaciones de las mismas *in vitro* o *in vivo*. La modulación puede ser una potenciación o inhibición de al menos una actividad enzimática de PSMA.

Niveles en tejido de NAALADasa se pueden determinar solubilizando en detergente, tejidos homogeneizantes, sedimentando el material insoluble mediante centrifugación y midiendo la actividad de NAALADasa en el sobrenadante restante. De igual manera, la actividad de NAALADasa en fluidos corporales también se puede medir sedimentando primero el material celular mediante centrifugación y realizando un ensayo enzimático típico para la actividad de NAALADasa en el sobrenadante. Ensayos de enzimas NAALADasa han sido descritos por Frieden, 1959, *J. Biol. Chem.*, 234:2891. En este ensayo, el producto de reacción de la enzima NAALADasa es ácido glutámico. Éste se deriva de la escisión de N-acetilaspargilglutamato catalizada por enzima para proporcionar ácido N-acetilaspártico y ácido glutámico. El ácido glutámico, en una etapa que requiere NAD(P)^+ , proporciona 2-oxoglutarato más NAD(P)H en una reacción catalizada por glutamato deshidrogenasa. El progreso de la reacción puede medirse de manera fácil y conveniente mediante el cambio en la absorbancia a 340 nm debido a la conversión de NAD(P)^+ en NAD(P)H .

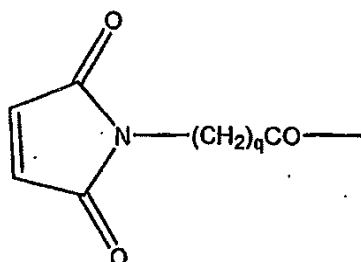
La actividad de folato hidrolasa de PSMA se puede medir realizando ensayos enzimáticos según se describe por Heston y otros (p. ej., *Clin Cancer Res.* 2(9):1445-51, 1996; *Urology* 49 (3A Supl):104-12, 1997). Folato hidrolasas tales como PSMA separan los glutamatos gamma-enlazados de folatos poliglutamatos. La actividad de folato

hidrolasa se puede medir utilizando sustratos tales como metotrexato tri-gamma glutamato (MTXGlu3), metotrexato di-gamma glutamato (MTXGlu2) o pteroilpentaglutamato (PteGlu5), por ejemplo utilizando electroforesis capilar (véase *Clin. Cancer Res.* 2(9):1445-51, 1996). Incubaciones cronometradas de PSMA con sustratos poliglutamados son seguidas por separación y detección de productos de la hidrólisis.

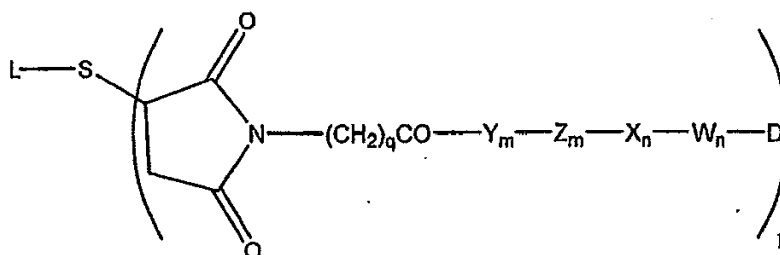
Un ADC de la invención comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado MMAE o MMAF. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede estar, en algunas realizaciones, conjugado a MMAE o MMAF con un compuesto de la siguiente fórmula (**Fórmula 1**) $-A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-$, en donde A es una unidad acilo carboxílica; Y es un aminoácido; Z es un aminoácido; X y W son cada uno un espaciador auto-inmolativo; n es un número entero de 0 ó 1; y m es un número entero de 0 ó 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En algunas realizaciones, el conjugado de la presente invención se representa por la fórmula (**Fórmula 2**): $L-(A_n-Y_m-Z_m-X_n-W_n-D)_p$, en donde L es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a PSMA, D es MMAE o MMAF y p es un número entero de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. Los otros componentes son como se definen antes. En una realización, la unidad carboxílica "A_n" está enlazada al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo a través de un átomo de azufre derivado del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo:



En una realización, A es



en que q es 1-10. Por lo tanto, en una realización, el conjugado es:

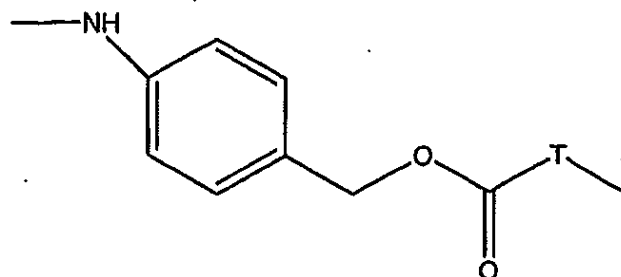


en donde L, Y, Z, X, W, D, n, m, q y p son como se definen previamente.

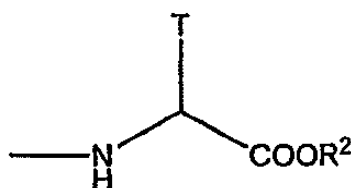
En otra realización, A es 4-(N-succinimidometil)ciclohexano-1-carbonilo, m-succinimidobenzoílo, 4-(p-succinimidofenil)-butirilo, 4-(2-acetamido)benzoílo, 3-tiopropionilo, 4-(1-tioetil)-benzoílo, 6-(3-tiopropionilamido)-hexanoílo o maleimida-caproílo. En una realización adicional, A es maleimida-caproílo. Ejemplos representativos de diversas unidades de acilo carboxílico y métodos para su síntesis y fijación se describen en la patente de EE.UU. N° 6.214.345, cuyo contenido completo se incorpora en esta memoria como referencia.

En otra realización, Y es alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o prolina. Todavía en otra realización, Y es valina. En una realización adicional, Z es lisina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con tosilo o grupos nitro, histidina, ornitina, ornitina protegida con acetilo o formilo, o citrulina. Todavía en una realización adicional, Z es citrulina. En una realización, Y_m-Z_m es valina-citrulina. En otra realización, Y_m-Z_m es una secuencia de proteínas que es selectivamente escindible por una proteasa.

En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula

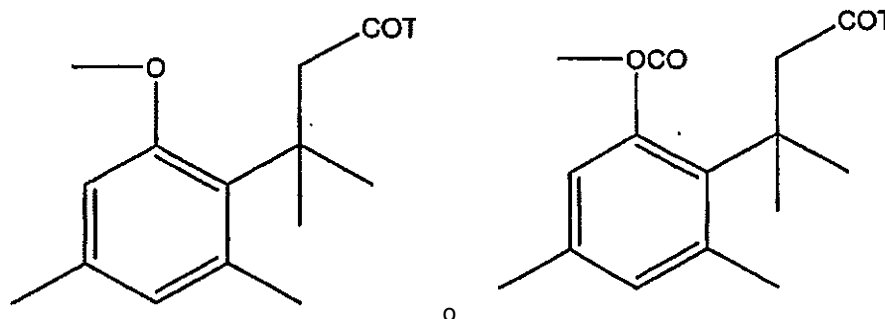


en que T es O, N o S. En otra realización, X es un compuesto que tiene la fórmula $\text{-HN-R}^1\text{-COT}$, en que R^1 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$, T es O, N o S. En una realización adicional, X es un compuesto que tiene la fórmula



en que T es O, N o S, R^2 es H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_5$. En una realización, X es p-aminobencilcarbamoiloxi. En otra realización, X es alcohol p-aminobencílico. En una realización adicional, X es carbamato de p-aminobencilo. Todavía en una realización adicional, X es p-aminobenciloxycarbonilo. En otra realización, X es ácido γ -aminobutírico; ácido α,α -dimetil- γ -aminobutírico o ácido β,β -dimetil- γ -aminobutírico.

En algunas realizaciones, W es



en que T es O, S o N.

En una realización, el compuesto de **Fórmula 1** maleimidocaproilo. Maleimidocaproilo ha sido utilizado para la conjugación de dos auristatinas específicas a un Acm anti-CD30 (AC10) (Doronina, Svetlana et al. "Novel Linkers for Monoclonal Antibody-Mediated Delivery of Anticancer Agents", AACR, Anaheim, CA, Resumen N° 1421, 16-20 de abril de 2005). Maleimidocaproilo reacciona con grupos tiol para formar un tioéter.

MMAE o MMAF se pueden conjugar a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo utilizando métodos conocidos por los expertos ordinarios en la técnica (p. ej., véase, Niemeyer, CM, *Bioconjugation Protocols, Strategies and Methods*, Humana Press, 2004) o según se describe en esta memoria. 3 ó 4 moléculas de MMAE o MMAF están conjugadas al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Se ha encontrado que los ADCs de la invención tienen niveles particularmente elevados de selectividad cuando exterminan a células que no expresan PSMA en comparación con el exterminio de células que expresan PSMA. Por lo tanto, los ADCs tienen una selectividad por células PC-3TM a células C4-2 o células LNCaPTM de al menos 250. En realizaciones, la selectividad es de al menos 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 17500, 20000 o más. En algunas realizaciones, la selectividad oscila entre 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-2000, 2000-5000, 5000-10000, 10000-15000, o 15000-20000. "Selectividad", tal como se define en esta memoria, se refiere a la relación de valores CI_{50} de un ADC en células PC-3TM (células que no expresan PSMA) a células C4-2 o células

LNCaP™ (células que expresan PSMA).

Se ha encontrado también que los ADCs de la invención median, en algunas realizaciones, en el exterminio de células específicas que expresan PSMA a concentraciones muy bajas tales como a o cerca de concentraciones picomolares. En algunas realizaciones, los ADCs exhiben CI_{50} s a concentraciones menores que aproximadamente 1×10^{-10} M, menores que aproximadamente 1×10^{-11} M o menores que aproximadamente 1×10^{-12} M. En una realización particular, se consigue una CI_{50} a una concentración menor que aproximadamente $1,5 \times 10^{-11}$ M. En otra realización, los ADCs proporcionados exhiben CI_{50} s entre 10-210, 40-210, 60-210 o 65-210 pM. Todavía en otra realización, los ADCs proporcionados exhiben CI_{50} s de aproximadamente 10, 40, 60 u 80 pM. Todavía en otra realización, los ADCs proporcionados exhiben CI_{50} s entre 11, 42, 60 u 83 pM.

Se ha encontrado también que los ADCs, en algunas realizaciones, resultan en una tasa de curación en ratones de al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. En otras realizaciones, la tasa de curación en ratones es de aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95%. Todavía en otras realizaciones, la tasa de curación es 20-40%, 40-60% o 60-80%. Tal como se utiliza en esta memoria, "tasa de curación" se refiere al número de ratones todavía vivos después de aproximadamente 500 días desde el comienzo del período de estudio, sin evidencia de un tumor y sin niveles de PSA medibles, dividido por el número de ratones al comienzo del período de estudio. Para evaluar la tasa de curación, a los ratones se les administran 6 mg/kg de ADC con un régimen de q4d x 6. En algunas realizaciones, el número de ratones al comienzo del estudio es de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30 o más ratones. Detalles adicionales en relación con un ejemplo de un estudio de este tipo se proporcionan en esta memoria más adelante en los **Ejemplos**. En una realización, los ratones son aquellos que son un modelo de cáncer de próstata humano andrógeno-independiente. En otra realización, los ratones son ratones inmunológicamente deficientes a los que se ha injertado por vía intramuscular células C4-2 en la pata trasera izquierda. Técnicas para determinar la presencia de un tumor y para medir los niveles de PSA son bien conocidas por los expertos ordinarios en la técnica.

La unión de los ADCs de la invención a células que expresan PSMA vivas puede inhibir el crecimiento de células que expresan PSMA, dando como resultado una paralización del ciclo celular (p. ej., paralización de G_2/M), puede fomentar la apoptosis de células que expresan PSMA, etc. Tal como se utiliza en esta memoria, "resultan en una paralización del ciclo celular" se refiere a un aumento en el número de células en la fase G_2/M , debido a la administración de un ADC. En algunas realizaciones, los ADCs pueden efectuar una apoptosis. En otras realizaciones, los ADCs resultan tanto en una paralización del ciclo celular como en la subsiguiente apoptosis. Los ADCs de la invención, por lo tanto, se pueden utilizar en diversos métodos *in vitro* e *in vivo* para efectuar estos posibles puntos finales. En particular, los ADCs de la invención se pueden utilizar en métodos para tratar enfermedades mediadas por PSMA.

Tal como se utiliza en esta memoria, una "enfermedad mediada por PSMA" es cualquier enfermedad en la que el PSMA es el causante o un síntoma de la enfermedad. Enfermedades mediadas por PSMA incluyen también enfermedades o trastornos en los que existe una aberración (p. ej., sobre-expresión) de PSMA. PSMA es una glicoproteína de la membrana de tipo II de 100 kD, expresada en tejidos de la próstata (Horoszewicz et al., 1987, *Anticancer Res.* 7:927-935; patente de EE.UU. N.º 5.162.504). PSMA se caracterizó como una proteína de la transmembrana de tipo II con una identidad de la secuencia con el receptor transferrina (Israeli et al., 1994, *Cancer Res.* 54: 1807-1811) y con actividad de NAALADasa (Carter et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:749-753). De manera más importante, PSMA se expresa en cantidades incrementadas en cáncer de próstata, y niveles elevados de PSMA también son detectables en los sueros de estos pacientes (Horoszewicz et al., 1987; Rochon et al., 1994, *Prostate* 25:219-233; Murphy et al., 1995, *Prostate* 26: 164-168; y Murphy et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1473-1479). Por lo tanto, un trastorno mediado por PSMA es, por ejemplo, cáncer de próstata. La expresión de PSMA aumenta con el progreso de la enfermedad, volviéndose el más elevado en una enfermedad metastásica hormona-refractaria para la que no existe actualmente terapia. Adicionalmente, datos sugerentes indican que el PSMA es también expresado de manera abundante en la neovasculatura de una diversidad de otros tumores importantes, incluidas células tumorales de vejiga, páncreas, sarcoma o melanoma, pulmón y riñón, pero no en la vasculatura normal. Por lo tanto, enfermedades mediadas por PSMA incluyen cánceres en los que PSMA es expresado en la células del tumor o de la neovasculatura del tumor.

Por lo tanto, se proporcionan composiciones que pueden utilizarse para tratar cualquier trastorno mediado por PSMA. Por ejemplo, se pueden utilizar ADCs para inhibir la neovascularización de un tumor. En otro ejemplo, se pueden utilizar ADCs de PSMA para exterminar células tumorales. En algunas realizaciones, dos o más ADCs diferentes se utilizan en combinación. En otra realización, uno o más anticuerpos anti-PSMA no conjugados o fragmentos de unión a antígeno de los mismos se pueden combinar con uno o más ADCs en una terapia única para conseguir un efecto terapéutico deseado. Como ilustración, un anticuerpo anti-PSMA no conjugado que media

en el exterminio altamente eficaz de células diana en presencia de células efectoras y/o que inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA se puede utilizar con uno o más ADCs. Todavía en otra realización, los ADCs se pueden combinar con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Agentes terapéuticos de este tipo incluyen agentes antitumorales tales como docetaxel; corticosteroides tales como prednisona o hidrocortisona; agentes inmuoestimulantes; inmunomoduladores; o alguna combinación de los mismos.

Agentes antitumorales incluyen agentes citotóxicos, agentes quimioterapéuticos y agentes que actúan sobre la neovascularización del tumor. Agentes citotóxicos incluyen radionucleidos citotóxicos, toxinas químicas y proteínas toxinas. El radionucleido o isótopo radioterapéutico citotóxico puede ser un isótopo alfa-emisor tal como ^{225}Ac , ^{211}At , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{224}Ra o ^{223}Ra . Alternativamente, el radionucleido citotóxico puede ser un isótopo beta-emisor tal como ^{186}Rh , ^{188}Rh , ^{177}Lu , ^{90}Y , ^{131}I , ^{67}Cu , ^{64}Cu , ^{153}Sm o ^{166}Ho . Además, el radionucleido citotóxico puede emitir electrones Auger y de baja energía e incluye los isótopos ^{125}I , ^{123}I o ^{77}Br .

Toxinas químicas o agentes quimioterapéuticos adecuados incluyen miembros de la familia de moléculas enedina, tales como calicheamicina y esperamicina. Toxinas químicas también pueden tomarse del grupo que consiste en metotrexato, doxorubicina, melfalan, clorambucilo, ARA-C, vindesina, mitomicina C, cis-platino, etopósido, bleomicina y 5-fluorouracilo. Otros agentes antineoplásicos incluyen dolastatinas (patentes de EE.UU. N.ºs. 6.034.065 y 6.239.104) y derivados de las mismas. Dolastatinas y derivados de las mismas incluyen dolastatina 10 (dolavalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-dolafenina) y los derivados auristatina PHE (dolavalina-valina-dolaisoleucina-dolaproina-fenilalanina-éster metílico) (Pettit, G.R. et al., *Anticancer Drug Des.* 13(4):243-277, 1998; Woyke, T. et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(12):3580-3584, 2001) y aurastatina E y similares. Las toxinas incluyen también lectinas venenosas, toxinas vegetales tales como toxinas ricina, abrina, modicina, botulina y difteria. Otros agentes terapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica.

Agentes que actúan sobre la vasculatura del tumor incluyen agentes de unión a tubulina tales como combrestatina A4 (Griggs et al., *Lancet Oncol.* 2:82, 2001), angiostatina y endostatina (revisado en Rosen, *Oncologist* 5:20, 2000) y proteína 10 inducible por interferón (patente de EE.UU. N.º. 5.994.292). También están contemplados un cierto número de otros agentes anti-angiogénicos, e incluyen 2ME2, angiostatina, Angiozyme, RhuAcm anti-VEGF, Apra (CT-2584), Avicina, Benefin, BMS275291, carboxiamidotriazol, CC4047, CC5013, CC7085, CDC801, CGP- 41251 (PKC 412), CM101, combretastatina profármaco A-4, EMD 121974, endostatina, flavopiridol, genisteína (GCP), Extracto de té verde, IM-862, ImmTher, Interferón alfa, interleuquina-12, Iressa (ZD1839), Marimastat, Metastat (Col-3), Neovastat, Octreotida, Paclitaxel, Penicilamina, fotofrina, fotopoint, PI-88, Prinomastat (AG-3340), PTK787 (ZK22584), RO317453, Solimastat, escualamina, SU 101, SU 5416, SU-6668, Suradista (FCE 26644), Suramin (Metaret), tetratiomolibdato, talidomida, TNP- 470 y Vitaxina. Agentes anti-angiogénicos adicionales se describen por parte de Kerbel, J. Clin. Oncol. 19 (18s): 45s- 51s, 2001.

Los ADCs se pueden administrar con uno o más agentes inmuoestimulantes para inducir o potenciar una respuesta inmune tal como IL-2 y oligonucleótidos inmuoestimulantes (p. ej., los que contienen motivos CpG). Agentes inmuoestimulantes pueden estimular, en algunas realizaciones, brazos específicos del sistema inmune tales como células asesinas naturales (NK) que median en la citotoxicidad de las células dependiente de anticuerpos (ADCC). Agentes inmuoestimulantes incluyen interleuquina-2, α -interferón, γ -interferón, factor α de necrosis tumoral (TNF α), oligonucleótidos inmuoestimulantes o una combinación de los mismos. Inmunomoduladores incluyen citoquinas, quimoquinas, adyuvantes o una combinación de los mismos. Quimioquinas útiles en el aumento de las respuestas inmunes incluyen, pero no se limitan a SLC, ELC, MIP3 α , MIP3 β , IP-10, MIG y combinaciones de las mismas.

El otro agente terapéutico también puede ser una vacuna. En algunas realizaciones, la vacuna inmuniza a un sujeto frente a PSMA. Vacunas de este tipo, en algunas realizaciones, incluyen antígenos tales como PSMA dímeros, opcionalmente con uno o más adyuvantes para inducir o potenciar una respuesta inmune. Un adyuvante es una sustancia que potencia la respuesta inmune. Adyuvantes de muchos tipos son bien conocidos en la técnica. Ejemplos específicos de adyuvantes incluyen monofosforil-lípido A (MPL, SmithKline Beecham), saponinas que incluyen QS21 (SmithKline Beecham); oligonucleótidos inmuoestimulantes (p. ej., oligonucleótidos CpG descritos por Kreig et al., *Nature* 374:546-9, 1995); adyuvante incompleto de Freund; adyuvante completo de Freund; montanida; vitamina E y diversas emulsiones de agua en aceite preparadas a partir de aceites biodegradables tales como escualeno y/o tocoferol, Quil A, Ribi Detox, CRL-1005, L-121 y combinaciones de los mismos. También se contemplan para uso como vacunas en los métodos proporcionados en esta memoria formulaciones tales como las descritas en la solicitud de EE.UU. N.º. de serie 10/976352.

En algunas realizaciones, las vacunas pueden incluir uno o más de las proteínas multiméricas de PSMA aisladas descritas en esta memoria, tal como la proteína dimérica de PSMA. En algunas realizaciones, una composición de

proteínas multiméricas de PSMA contiene al menos aproximadamente 10% de proteínas multiméricas de PSMA (de la cantidad total de proteína de PSMA en la composición). En otras realizaciones, la composición de proteínas multiméricas de PSMA contiene al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o 99,5% de proteína multimérica de PSMA. En una realización, la composición de proteínas multiméricas de PSMA contiene proteína multimérica de PSMA sustancialmente pura, sustancialmente sin proteína monomérica de PSMA. Se entiende que la lista de porcentajes específicos incluye mediante inferencia la totalidad de los porcentajes no nombrados entre los porcentajes reseñados.

También se pueden utilizar citoquinas en protocolos de vacunación como resultado de sus propiedades reguladoras de linfocitos. Muchas citoquinas útiles para este tipo de fines serán conocidas por un experto ordinario en la técnica, incluidas interleuquina-2 (IL-2); IL-4; IL-5; IL-12, que ha demostrado potenciar los efectos protectores de vacunas (véase, p. ej., *Science* 268: 1432-1434, 1995); GM-CSF; IL-15; IL-18; combinaciones de las mismas, y similares. Así, las citoquinas se pueden administrar en unión con un antígeno, quimioquinas y/o adyuvantes para aumentar una respuesta inmune.

Los otros agentes terapéuticos que pueden estar presentes en las composiciones de la invención en forma no conjugada o en forma conjugada, tal como conjugada a un anticuerpo anti-PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo. El acoplamiento de una o más moléculas de toxina al anticuerpo anti-PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo pueden incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo una unión covalente, unión de afinidad, intercalación, unión de coordenadas y formación de complejos.

La unión covalente se puede conseguir mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas de puenteo externas. Muchos agentes bivalentes o polivalentes son útiles en el acoplamiento de moléculas de proteínas a otras proteínas, péptidos o funciones amina. Por ejemplo, la bibliografía está repleta de agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. Esta lista no pretende ser exhaustiva de los diversos agentes de acoplamiento conocidos en la técnica sino, más bien, es ilustrativa de los agentes de acoplamiento más comunes.

En algunas realizaciones, se contempla que se desee primero derivatizar el anticuerpo y luego fijar el agente terapéutico al producto derivatizado. Agentes reticulantes adecuados para uso de esta manera incluyen, por ejemplo, SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), y SMPT, 4-succinimidil-oxicarbonil-metil-(2-piridilditio)tolueno.

Además, proteínas toxinas se pueden fusionar al anticuerpo anti-PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo por métodos genéticos para formar una proteína de fusión de inmunotoxina híbrida. Las proteínas de fusión pueden incluir secuencias peptídicas adicionales tales como espaciadores peptídicos que fijan operativamente, por ejemplo, el anticuerpo anti-PSMA y toxina, siempre que secuencias adicionales de este tipo no afecten de manera apreciable a las actividades de fijación como objetivo o de toxina de la proteína de fusión. Las proteínas se pueden fijar por un enlazador o un espaciador peptídico tal como un péptido espaciador de glicina-serina, o una bisagra de péptido, según se conoce en la técnica. Así, por ejemplo, el extremo C de un anticuerpo anti-PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo se puede fusionar al extremo N de la molécula de proteína toxina para formar una inmunotoxina que conserva las propiedades de unión del anticuerpo anti-PSMA. Otras disposiciones de fusión serán conocidas por un experto ordinario en la técnica. Para expresar la inmunotoxina de fusión, el ácido nucleico que codifica la proteína de fusión se inserta en un vector de expresión de acuerdo con métodos convencionales para la expresión estable de la proteína de fusión tal como en células de mamíferos tales como células CHO. La proteína de fusión se puede aislar y purificar de las células o del sobrenadante del cultivo utilizando una metodología convencional tal como una columna de afinidad de PSMA.

Los radionucleidos se acoplan típicamente a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo mediante quelación. Por ejemplo, en el caso de radionucleidos metálicos, se utiliza habitualmente un quelante bifuncional para enlazar el isótopo al anticuerpo u otra proteína de interés. Típicamente, el quelante se fija primero al anticuerpo, y el conjugado quelante-anticuerpo se pone en contacto con el radioisótopo metálico. Para este fin se ha desarrollado un cierto número de quelantes bifuncionales, que incluyen las series ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) de aminoácidos descritos en las patentes de EE.UU. 5.124.471, 5.286.850 y 5.434.287. Como otro ejemplo, agentes quelantes bifuncionales basados en ácido hidroxámico se describen en la patente de EE.UU. 5.756.825. Otro ejemplo es el agente quelante denominado *p*-SCN-Bz-HEHA (ácido 1,4,7,10,13,16-hexaazaciclo-octadecano-N,N',N'', N''', N''', N''''-hexaacético) (Deal et al., *J. Med. Chem.* 42:2988 (1999), que es un quelante eficaz de radiometales tales como ²²⁵Ac. Todavía otro ejemplo es DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano N,N',N'',N'''-tetraacético) que es un agente quelante bifuncional (véase McDevitt et al., *Science* 294:1537-1540, 2001) que se puede utilizar en un método de dos etapas para el marcaje, seguido de

conjugación.

Otros agentes terapéuticos incluyen también virus selectivos de replicación. Virus competentes para la replicación tales como el mutante de adenovirus dl1520 que fija como objetivo la vía p53, ONYX-015, extermina selectivamente células tumorales (Biederer, C. et al., *J. Mol. Med.* 80(3):163-175, 2002). En algunas realizaciones, el virus puede conjugarse a anticuerpos de PSMA o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

Las composiciones proporcionadas por la presente invención se pueden utilizar en unión con otras modalidades de tratamiento terapéutico. Otros tratamientos de este tipo incluyen cirugía, radiación, criocirugía, termoterapia, tratamiento con hormonas, quimioterapia, vacunas y otras inmunoterapias.

Los ADCs de la invención tales como a través de su anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se pueden enlazar a un marcador. Marcadores incluyen, por ejemplo, marcadores fluorescentes, marcadores enzimáticos, marcadores radiactivos, marcadores activos de resonancia magnética nuclear, marcadores luminiscentes o marcadores cromóforos.

Las composiciones proporcionadas pueden incluir un vehículo, excipiente o estabilizante fisiológica o farmacéuticamente aceptable, mezclado con el ADC. En algunas realizaciones, cuando una composición comprende dos o más ADCs diferentes, cada uno de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos de los ADCs se une a un epítipo conformacional distinto de PSMA.

Tal como se utiliza en esta memoria, "célula diana" ha de significar cualquier célula indeseable en un sujeto (p. ej., un ser humano o animal) que puede ser fijada como objetivo por un ADC de la invención. En algunas realizaciones, la célula diana es una célula que expresa o sobre-expresa PSMA. Células que expresan PSMA incluyen típicamente células tumorales tales como células tumorales de próstata, vejiga, páncreas, pulmón, riñón, colon, así como células de melanoma y sarcoma.

Composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar en una terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con al menos un agente antitumoral, inmunomodulador, agente inmunoestimulante u otra terapia convencional. El otro agente se puede conjugar a o formar como una molécula de fusión recombinante con un anticuerpo de PSMA o fragmento de unión a antígeno del mismo para dirigir la fijación como objetivo del agente a células que expresan PSMA. En otra realización, el otro agente terapéutico puede estar no conjugado. Agentes terapéuticos adicionales pueden administrarse o ponerse en contacto con las células que expresan PSMA a través de co-administración. "Co-administrar", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere a administrar dos o más agentes terapéuticos simultáneamente en forma de una mezcla en una composición sencilla, o secuencialmente, y lo suficientemente próximo en el tiempo, de modo que los compuestos puedan ejercer un efecto aditivo o incluso sinérgico. Todavía en otras realizaciones, se puede administrar un agente terapéutico adicional antes, durante o después de la administración de uno o más ADCs o composiciones de los mismos.

Tal como se utiliza en esta memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable" incluye cualquiera y todas las sales, disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de adsorción retardada y similares que sean fisiológicamente compatibles. En algunas realizaciones, el vehículo es adecuado para la administración por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidermal (p. ej., mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo se puede revestir en un material para proteger al compuesto frente a la acción de los ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar al compuesto.

Cuando se administran, los preparados farmacéuticos de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los ingredientes activos. Preparados de este tipo pueden contener rutinariamente sales, agentes tampón, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos tales como agentes potenciadores inmunes suplementarios que incluyen adyuvantes, quimioquinas y citoquinas. Cuando se utilizan en medicina, las sales deberían ser farmacéuticamente aceptables, pero convenientemente se pueden utilizar sales no farmacéuticamente aceptables para preparar sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención.

Una sal conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no imparte efectos toxicológicos indeseados algunos (véase, p. ej., Berge, S.M., et al. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19). Ejemplos de sales de este

tipo incluyen sales por adición de ácidos y sales por adición de bases. Sales por adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil-sustituídos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Sales por adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Un ADC se puede combinar, si se desea, con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se utiliza en esta memoria, significa una o más cargas sólidas o líquidas, diluyentes o sustancias encapsulantes compatibles, que sean adecuados para la administración a un ser humano. El término "vehículo" designa un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que el ingrediente activo se combina para facilitar la aplicación. Los componentes de las composiciones farmacéuticas son también capaces de ser co-mezclados de una manera tal que no exista interacción que perjudique sustancialmente la eficacia farmacéutica deseada.

Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tampón adecuados, que incluyen: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal.

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados tales como cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el agente activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido, o ambos, y luego, si es necesario, conformando el producto.

Composiciones adecuadas para la administración por vía parenteral comprenden un preparado acuoso o no acuoso estéril de los compuestos que, en algunas realizaciones, es isotónico con la sangre del receptor. Este preparado se puede formular de acuerdo con métodos conocidos, utilizando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. El preparado inyectable estéril también puede ser una disolución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico y parenteralmente aceptable, por ejemplo en forma de una disolución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear se encuentran agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceite fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, se puede emplear cualquier mezcla de aceite fijo que incluya mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden utilizar ácidos grasos tales como ácido oleico. Formulaciones de vehículo adecuadas para la administración por vía oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. se pueden encontrar en *Remington's Pharmaceuticals Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán al compuesto frente a una liberación rápida tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdermales y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de formulaciones de este tipo están patentados o son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, p. ej. *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, comp., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Los productos terapéuticos de la invención se pueden administrar por cualquier vía convencional, incluida inyección o mediante infusión gradual a lo largo del tiempo. La administración puede ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intracavidad, intratumoral o transdermal. Cuando se utilizan terapéuticamente compuestos que contienen anticuerpos, vías de administración incluyen la intravenosa y por aerosol pulmonar. Técnicas para preparar sistemas de administración de aerosol que contienen anticuerpos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Generalmente, sistemas de este tipo deberían utilizar componentes que no perjudiquen significativamente las propiedades biológicas de los anticuerpos tales como la capacidad de unión al paratopo (véase, por ejemplo, Sciarra y Cutie, "Aerosols" en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18ª edición, 1990, págs. 1694-1712). Los expertos en la técnica pueden determinar fácilmente los diversos parámetros y condiciones para producir aerosoles de anticuerpo sin recurrir a una experimentación excesiva.

Las composiciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" es la cantidad de cualquiera de los ADCs proporcionadas en esta memoria que sola, o junto con dosis adicionales y/u otros agentes terapéuticos, produce la respuesta deseada, p. ej., trata una enfermedad mediada por PSMA en un sujeto. Esto puede implicar solamente ralentizar temporalmente el progreso de la enfermedad, a pesar de que en algunas realizaciones implica detener permanentemente el progreso de la enfermedad. Esto se puede vigilar por métodos rutinarios. La respuesta deseada al tratamiento de la enfermedad o estado también puede retardar el brote o incluso prevenir el brote de la enfermedad o estado. Una cantidad que es eficaz puede ser la cantidad de un ADC solo que produce el punto final terapéutico deseado. Una cantidad que es eficaz es también la cantidad de un ADC en combinación con otro agente que produce el resultado deseado.

Cantidades de este tipo dependerán, naturalmente, de la enfermedad mediada por PSMA particular que se esté tratando, la gravedad del estado, los parámetros del paciente individuales incluidas la edad, condición física, altura y peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia concurrente (si existe), la vía específica de administración y factores similares dentro del conocimiento y experiencia del practicante. Estos factores son bien conocidos por los expertos ordinarios en la técnica y pueden acometerse sin más que mediante una experimentación rutinaria. Generalmente, se prefiere utilizar una dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis más elevada segura, de acuerdo con el juicio médico. Se comprenderá por parte de los expertos ordinarios en la técnica, sin embargo, que un paciente puede insistir en una dosis menor o una dosis tolerable por razones médicas, razones psicológicas o virtualmente por cualesquiera otras razones.

Las composiciones farmacéuticas utilizadas en los métodos que anteceden son preferiblemente estériles y contienen una cantidad eficaz de un ADC, sólo o en combinación con otro agente, para producir la respuesta deseada en una unidad de peso o volumen adecuada para la administración a un paciente. La respuesta, por ejemplo, se puede medir determinando los efectos fisiológicos de la composición de ADC tales como la regresión de un tumor o la disminución de síntomas de la enfermedad. Otros ensayos serán conocidos por un experto ordinario en la técnica y se pueden emplear para medir el nivel de la respuesta.

Las dosis de ADCs administradas a un sujeto se pueden elegir de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el modo de administración utilizado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el período de tratamiento deseado. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente en las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis mayores (o dosis eficazmente mayores por una vía de suministro diferente y más localizada) en la medida en que lo permita la tolerancia del paciente.

En general, las dosis pueden oscilar entre aproximadamente 10 µg/kg y aproximadamente 100.000 µg/kg. En algunas realizaciones, las dosis pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg. Todavía en otras realizaciones, las dosis pueden oscilar entre aproximadamente 0,1 mg/kg y 5 mg/kg, 0,1 mg/kg y 10 mg/kg o 0,1 mg/kg y 15 mg/kg. Todavía en otras realizaciones, las dosis oscilan entre aproximadamente 1 mg/kg y 5 mg/kg, 5 mg/kg y 10 mg/kg, 10 mg/kg y 15 mg/kg o 15 mg/kg y 20 mg/kg. En realizaciones adicionales, la dosis es de aproximadamente 0,1 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg, 7 mg/kg, 10 mg/kg, 12 mg/kg, 15 mg/kg, 17 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg o 30 mg/kg. En otra realización, la dosis es de aproximadamente 1 mg/kg, 3 mg/kg, 5 mg/kg o 6 mg/kg. Basado en la composición, la dosis se puede administrar de modo continuo tal como mediante una bomba continua, o a intervalos periódicos. En algunas realizaciones, cuando el ADC se administra por vía intravenosa, la dosis oscila entre 0,1 y 20 mg/kg o cualquier valor entremedias. Intervalos de tiempos deseados de múltiples dosis de una composición particular se pueden determinar sin una experimentación excesiva por parte de un experto en la técnica. Otros protocolos para la administración de las composiciones proporcionadas serán conocidas por un experto ordinario en la técnica, en que la cantidad de dosis, el programa de administración, los sitios de administración, el modo de administración y similares varían de lo que antecede. En algunas realizaciones, a los sujetos se les administra el ADC con un régimen de dosis de q4d x 3 o q4d x 6. En una realización, la dosis se administra por vía intravenosa. En otra realización, el régimen de dosis es una dosis intravenosa única.

La administración de composiciones de ADC a mamíferos distintos de seres humanos, p. ej., para fines de ensayo o fines terapéuticos de veterinaria, se lleva a cabo bajo sustancialmente las mismas condiciones que las arriba descritas.

Las composiciones de la presente invención tienen utilidades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, las moléculas se pueden administrar a células de un cultivo, p. ej. *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, p. ej. *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de enfermedades mediadas por PSMA. Tal como se

utiliza en esta memoria, el término “sujeto” pretende incluir seres humanos y animales no humanos. Sujetos incluyen un paciente humano que tiene un trastorno caracterizado por la expresión, típicamente una expresión aberrante (p. ej., sobre-expresión) de PSMA, trastornos de este tipo están incluidos en la definición “enfermedad mediada por PSMA”.

Las composiciones proporcionadas en esta memoria se pueden utilizar en la terapia *in vivo* de cáncer. Los ADCs se pueden utilizar para inhibir la proliferación de las células o tejidos malignos después de la administración y localización de los conjugados. Las composiciones proporcionadas pueden incluir anticuerpos anti-PSMA, en algunas realizaciones, que pueden mediar en la destrucción del tumor mediante fijación del complemento o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Alternativamente, las composiciones pueden contener un agente terapéutico adicional que dé como resultado efectos terapéuticos sinérgicos (Baslya y Mendelsohn, 1994, *Breast Cancer Res. and Treatment* 29: 127-138).

Las composiciones de la invención también se pueden administrar, en algunas realizaciones, junto con anticuerpos anti-PSMA de complemento y/o no conjugados. Por consiguiente, dentro del alcance de la invención se encuentran composiciones que comprenden ADC y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas, debido a que el complemento está situado en estrecha proximidad a los anticuerpos humanos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Alternativamente, los ADCs, anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos y/o complemento o suero se pueden administrar por separado.

El uso de los ADCs de la presente invención tiene un cierto número de beneficios. Dado que los ADCs fijan preferentemente como objetivo PSMA, p. ej., en células de cáncer de próstata, se puede reponer otro tejido. Como resultado, el tratamiento con agentes biológicos de este tipo es más seguro, particularmente para pacientes de edad. Se espera que el tratamiento con ADCs de acuerdo con la presente invención sea particularmente eficaz, en algunas realizaciones, debido a que puede dirigir altos niveles de ADCs a la médula ósea y nódulos linfáticos en los que pueden predominar metástasis de cáncer tales como metástasis de cáncer de próstata. El tratamiento con ADCs de acuerdo con la presente invención se puede vigilar eficazmente con parámetros clínicos tales como antígeno prostático específico en suero y/o características patológicas del cáncer de un paciente, incluida fase, puntuación de Gleason, invasión extracapsular, seminal, vesicular o perineural, márgenes positivos, nódulos linfáticos implicados, etc. Alternativamente, estos parámetros se pueden utilizar para indicar cuando debería emplearse un tratamiento de este tipo.

También dentro del alcance de la invención se encuentran kits que comprenden las composiciones, p. ej. uno o más ADCs de la invención e instrucciones para su uso. Los kits pueden contener, además, al menos un reactivo adicional tal como complemento, agente quimioterapéutico, un corticosteroide o uno o más anticuerpos que se unen a PSMA. Otros kits pueden incluir también multímeros de PSMA. En otra realización, un kit puede comprender un soporte que esté repartido en compartimientos para alojar en estrecho confinamiento en su interior uno o más medios de recipiente o series de medios de recipiente tales como tubos de ensayo, viales, matraces, frascos, jeringas o similares. Uno primero de dichos medios de recipiente o serie de medios de recipiente puede contener uno o más anticuerpos anti-PSMA o fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Un segundo medio de recipiente o series de medio de recipiente puede, en algunas realizaciones, contener MMAE o MMAF, o el compuesto de **Fórmula 1** conjugado a MMAE o MMAF. En algunas realizaciones, un tercer medio de recipiente o series de medio de recipiente contienen un compuesto de **Fórmula 1**. Se pueden preparar kits para uso en la localización del tumor *in vivo* y el método de terapia que contiene los ADCs. Los componentes de los kits pueden envasarse en un medio acuoso o en forma liofilizada. Los componentes de los conjugados ADC se pueden suministrar en forma totalmente conjugada, en forma de compuestos intermedios o como restos separados a conjugar por parte del usuario del kit.

Tal como se utiliza en esta memoria con respecto a polipéptidos, proteínas o fragmentos de los mismos, “aislado” significa separado de su entorno nativo y presente en una cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Aislado, cuando se refiere a una proteína o polipéptido significa, por ejemplo, (i) producido selectivamente mediante clonación de expresión o (ii) purificado tal como por cromatografía o electroforesis. Proteínas o polipéptidos aislados pueden pero no necesitan ser sustancialmente puros. La expresión “sustancialmente puros” significa que las proteínas o polipéptidos están esencialmente exentos de otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o sistemas *in vivo* en una medida práctica y apropiada para su uso pretendido. Polipéptidos sustancialmente puros se pueden producir por técnicas bien conocidas en la técnica. Dado que una proteína aislada se puede mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable en un preparado farmacéutico, la proteína puede comprender sólo un pequeño porcentaje en peso del preparado. No obstante, la proteína está aislada, debido a que ha sido separada de las sustancias con las que puede estar asociada en sistemas vivos, es decir, aislada de otras proteínas.

Las composiciones proporcionadas en esta memoria pueden estar en forma liofilizada o pueden ser proporcionadas en un medio acuoso.

5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes **Ejemplos**.

Ejemplos

Ejemplo 1: Potente Actividad Antitumoral de un Anticuerpo Monoclonal Conjugado con Auristatina, Totalmente Humano, contra Antígeno Prostático Específico de Membrana

Materiales y métodos

Líneas de células y anticuerpos

15 LNCaP™ (CRL-1740), PC-3™ (CRL-1435) y 3T3™ (CRL-2752) se obtuvieron de American Type Culture Collection (Rockville, MD). La línea de células C4-2, una sub-línea de células procedente de LNCaP™, se obtuvo de The Cleveland Clinic Foundation (Cleveland, OH). Una línea de células de 3T3™-PSMA se obtuvo de Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Nueva York, NY). LNCaP™, C4-2 y PC-3™ se cultivaron en RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD), y 3T3™ y 3T3™-PSMA se cultivaron en DMEM (Life Technologies). Los medios de cultivo se suplementaron con suero de bovino fetal al 10% (Hyclone, Logan, UT), L-glutamina, penicilina y estreptomycin (Life Technologies). Se determinó que células C4-2, LNCaP™ y 3T3™-PSMA expresan PSMA a niveles de aproximadamente 2×10^5 , 6×10^5 y $> 1 \times 10^6$ copias/célula, respectivamente, de acuerdo con los métodos publicados (Ma D, et al., *Leukemia* 2002; 16:60-6). C4-2 es un sub-clon andrógeno-independiente de células LNCaP™ andrógeno-dependientes. PC-3™ es una línea de células de cáncer de próstata des-diferenciada que no expresa PSMA. PSMA Acms (AB-PG1-XG1-006 (PTA-4403 y PTA 4404) y Abgenix 4.40.2 (PTA-4360)) se produjeron tal como se describe previamente en la solicitud de patente de EE.UU. N°. 10/395.894 y Schulke N et al., *PNAS USA*, 2003; 100:12590-5, cada uno de los cuales se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad. Abgenix 4.40.2 se utilizó como control. Un PSMA Acm totalmente humano (IgG1, κ) se desarrolló en ratones transgénicos para el locus del gen de inmunoglobulina humana (XenoMice™, Abgenix, Inc., Fremont, CA) después de inmunización con PSMA soluble recombinante y células LNCaP según se ha descrito previamente (Schulke N et al., *PNAS USA*, 2003; 100:12590-5).

Internalización de PSMA

35 Acms se modificaron con quelatos bifuncionales de ácido ciclohexil-dietilentriaminapentaacético (CHX-DTPA) obtenidos del National Cancer Institute (Bethesda, MD) y se marcaron con ^{111}In (Perkin Elmer, Boston, MA), tal como se describe previamente (Ma D, et al., *Leukemia* 2002; 16:60-6; Nikula TK, et al., *J Nucl. Med* 1999; 40:166-76). Se determinó que el Acm marcado con ^{111}In era $> 90\%$ inmunorreactivo al incubar el radioconjugado con un exceso de células 3T3™-PSMA y medir la fracción unida de acuerdo con métodos publicados (Ma D, et al., *Leukemia* 2002; 16:60-6; Nikula TK, et al., *J Nucl. Med* 1999; 40:166-76). Para el análisis de la internalización, el Acm marcado con ^{111}In se incubó con 2×10^5 células C4-2 a 37°C en 5% de CO_2 . A instantes secuenciales, el Acm no ligado se separó mediante lavado en PBS y el Acm de la superficie de la célula se eluyó utilizando el tampón de pH bajo (pH 2,4, glicina/NaCl). El material eluido de bajo pH se recontó por separado a partir del sedimento de células, y el porcentaje de internalización se calculó como se describe previamente (McDevitt MR, et al., *Cancer Res* 2000; 60:6095-100).

Preparación de Conjugados Anticuerpo-Fármaco

50 La síntesis y el diseño de los enlazadores y la conjugación del enlazador al fármaco citotóxico se llevaron a cabo según se describe en la patente de EE.UU. N°. 6.884.889 y la patente de EE.UU. N°. 6.214.345, cada una de las cuales se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad. La conjugación de Acms con maleimidocaproil (mc)-valina (Val)-citulina (Cit)-monometil auristatina E (MMAE) se realizó según se describe (Doronina SO, et al., *Nat. Biotechnology*. 2003; 21:778-84). PSMA Acm e IgG1 humana control de isotipo (Calbiochem, San Diego, CA) en PBS que contenía borato 50 mM, pH 8,0, se trataron con ditiotreitól (DTT) (10 mM final) a 37°C durante 30 min. Las concentraciones de la reacción finales eran 7,5 mL – 8,0 mL, 1 mL de borato de sodio 0,5 M pH 8 y NaCl 0,5 M, 1 mL de DTT 100 mM y 0,5 mL o 0 mL, respectivamente, de PBS. Esta disolución se incubó a 40°C durante 1 h y el anticuerpo se purificó en una columna de filtración en gel. La columna se equilibró con DTPA 10 mM en PBS a razón de 10 mL/min, se cargó con 10,0 mL de mezcla de reducción de anticuerpos y se eluyó a 8 mL/min en tampón PBS/DTPA. La concentración de anticuerpo-cisteína tioles

producidos se determinó titulando con 5,5'-ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB) (Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Un producto químico equivalente se puede obtener de Sigma (St. Louis, MO).

El Acm totalmente reducido Abgenix 4.40.2 (22,6 mL de Acm 7,8 μ M, cisteína-tiol 75,6 μ M) se re-oxidó parcialmente con 35,43 μ L de DTNB 10 mM, y el Acm totalmente reducido AB-PG1-XG1-006 (25,1 mL de Acm 11,2 μ M, cisteína-tiol 95,8 μ M) se re-oxidó parcialmente con 56,27 μ L de DTNB 10 mM. El color de la disolución se volvió inmediatamente amarillo.

El fármaco mc-Val-Cit-carbamato de paraaminobencil-MMAE (vcMMAE) se conjugó luego con los Acms parcialmente re-oxidados como sigue: primeramente, los Acms se enfriaron hasta 0°C. vcMMAE (5 equivalentes molares por anticuerpo: 89,7 y 140,6 μ L, respectivamente, de una disolución patrón 10 mM de vcMMAE) se disolvieron en 5 mL de acetonitrilo y luego se añadieron a la disolución de anticuerpos al tiempo que se sometía a vórtice con cuidado. Las mezclas de reacción se incubaron en hielo. No se observó cambio de color adicional alguno. Las mezclas de reacción se enfriaron bruscamente con 20 equivalentes molares de cisteína/fármaco. El conjugado se purificó utilizando una columna de filtración en gel a 4°C y se eluyó con PBS a razón de 8,0 mL/min. Se determinó que los ADCs tenían $\geq 98\%$ de Acm monomérico que contenía 3,0-3,5 fármacos por Acm, utilizando los métodos publicados (Doronina SO, et al., *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 778-84).

Alternativamente, la conjugación de Acms con maleimidocaproil (mc)-valina (Val)-citrulina (Cit)-monometil auristatina E (MMAE) se realizó como se describe (Doronina SO, et al., *Nat Biotechnol.* 2003; 21:778-84). PSMA Acm e IgG1 humana control de isotipo (Calbiochem, San Diego, CA) en PBS, que contenía borato 50 mM, pH 8,0, se trataron con ditioneitol (DTT) (10 mM final) a 37°C durante 30 min. Los Acms se intercambiaron en PBS que contenía DTPA 1 mM (Aldrich, Milwaukee, WI) mediante el paso a través de una columna Sephadex G-25 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las disoluciones de Acm se enfriaron rápidamente hasta 4°C y se combinaron con el derivado de fármaco maleimido en CH_3CN frío. Al cabo de una 1 hora, las reacciones se enfriaron bruscamente con cisteína en exceso, y los conjugados se concentraron e intercambiaron en tampón PBS. Se determinó que los ADCs tenían $\geq 98\%$ de Acm monomérico que contenía 3,0-3,5 fármacos por Acm utilizando métodos publicados (Doronina SO, et al., *Nat Biotechnol.* 2003; 21:778-84).

Reactividad de ADCs con PSMA de la Superficie de la Célula

La unión de PSMA Acm y ADC a células 3T3TM-PSMA y 3T3TM parentales se analizó utilizando un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience, San Diego, CA). En síntesis, 2×10^5 células 3T3TM-PSMA (o 3T3TM) se incubaron con diferentes concentraciones de Acm o ADC en hielo durante 1 h. Después del lavado, la presencia de anticuerpos ligados se detectó utilizando IgG-FITC anti-humano de cabra (Caltag Laboratories, Burlingame, CA). En paralelo se examinaron el anticuerpo control de isotipo y ADC.

Ensayo de Citotoxicidad In Vitro

Células PSMA-positivas (C4-2, LNCaPTM o 3T3TM-PSMA) y células PSMA-negativas (PC-3TM o 3T3TM) se añadieron a microplacas de 96 pocillos (Falcon, BD Biosciences, San Jose, CA) a razón de $2,5 \times 10^3$ células/pocillo y se incubaron durante una noche a 37°C y 5% de CO_2 . Las células se incubaron luego con ADCs diluidos en serie durante 4 días. El medio de cultivo celular se reemplazó por medio reciente que contenía azul de Alamar al 10% (Biosource International, Camarillo, CA), y las células se incubaron durante 4 h. Después, las placas se leyeron en un lector de placas para fluorescencia utilizando una longitud de onda de excitación de 530 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm. La supervivencia de células se comparó en cultivos tratados y no tratados, y se determinó la concentración de ADC requerida para el exterminio del 50% de las células (valor CI_{50}).

Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de Próstata Andrógeno-Independiente

Todos los estudios con animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices del Comité para el Cuidado y Uso de Animales. A ratones inmunológicamente deficientes machos atímicos (National Cancer Institute, Frederick, MD) de 6-8 semanas de edad se les implantaron con una inyección intramuscular de 5×10^6 células C4-2 mezcladas con Matrigel al 50% (Beckon Dickinson Labware, Bedford, MA) en la pata trasera izquierda según se describe (McDevitt MR, et al., *Cancer Res* 2000; 60:6095-100). Aproximadamente 1 día antes del inicio del tratamiento, los animales fueron repartidos al azar de acuerdo con los niveles de suero de antígeno prostático específico (PSA) según se mide por ELISA (Medicorp, Montreal, Quebec, Canadá). ADC, Acms y control vehículo se administraron a través de inyección en la vena de la cola. En la primera serie de experimentos, los ratones fueron tratados en grupos de 6 con 2 ó 10 mg/kg de PSMA ADC o con control vehículo. El tratamiento se inició 17 días después de la implantación y consistía en 3 inyecciones a intervalos de 4 días (q4d x 3). La segunda serie de

experimentos examinó los niveles de dosis de 0,3 ó 6 mg/kg. El tratamiento se inició 14 días post-implantación y consistía en 6 inyecciones a intervalos de 4 días (q4d x 6). Los animales fueron vigilados en cuanto a su aspecto físico, peso corporal, nivel de PSA y tamaño del tumor. Las tasas de supervivencia se registraron a lo largo de los estudios.

Análisis Estadísticos

Los efectos del tratamiento se examinaron en cuanto a la significancia a través de ensayos t (para niveles de PSA) o ensayos de rangos logarítmicos (para la supervivencia de animales) utilizando análisis apareados de dos colas. Los datos eran considerados significativos cuando $P < 0,05$.

Resultados

Internacionalización de PSMA Acm en Células de Cáncer de Próstata Humano

La internalización se examinó utilizando PSMA Acm marcado con ^{111}In y células C4-2. En las **Fig. 1** se ilustra la unión total y el porcentaje de internalización a lo largo del tiempo. Más de la mitad del Acm ligado se internalizó en el espacio de 2 h (**Fig. 1A**). La unión total aumentó a lo largo del tiempo, presumiblemente debido al reciclaje de PSMA (**Fig. 1B**). Así, el PSMA Acm se internaliza fácilmente en células que expresan PSMA.

Reactividad del PSMA ADC con Células que expresan PSMA

La citometría de flujo se utilizó para comparar la unión de PSMA Acm y ADC. El Acm y ADC no modificados demostraron niveles equiparables de unión a 3T3TM-PSMA a lo largo de un amplio intervalo de dilución (**Fig. 2**). Ni la cantidad máxima de unión ni la concentración requerida para la unión semi-máxima se vio apreciablemente afectada por la conjugación. No se observó unión significativa alguna para el ADC de control de isotipo o anticuerpo en células 3T3TM-PSMA o para el PSMA Acm o ADC en células 3T3TM parentales.

Potencia y selectividad *in vitro* del PSMA ADC

PSMA y control ADCs se sometieron a ensayo en cuanto a citotoxicidad *in vitro* frente a líneas de células de cáncer de próstata humanas y células 3T3TM-PSMA. La **Fig. 3** ilustra curvas de dosis-respuesta para células C4-2 PSMA-positivas y células PC-3TM PSMA-negativas en un experimento representativo, y valores CI_{50} para las diversas líneas de células se listan en la **Tabla 2**. El PSMA ADC eliminaba en potencia todas las líneas de células PSMA-positivas examinadas, a valores CI_{50} de 65-210 pM, mientras que estas concentraciones no tenían efecto alguno sobre células PSMA-negativas. En contraposición, se requerían concentraciones aproximadamente 1000 veces mayores para el ADC control, cuya actividad era independiente de la expresión de PSMA (**Fig. 3 y Tabla 2**).

Tabla 2: Sumario de la citotoxicidad *in vitro* (valores CI_{50} en pM)

	C4-2	LNCaP TM	3T3 TM -PSMA
PSMA ADC	65 ± 19 (n = 3)	83 ± 21 (n = 2)	208 ± 37 (n = 3)
ADC control	54.954 (n = 1)	72.444 (n = 1)	154.880 (n = 1)
Selectividad*	848	877	744

*La selectividad iguala a la relación de valores CI_{50} observados para el PSMA ADC y ADC control

Eficacia del PSMA ADC en un Modelo de Xenoinjerto de Cáncer de Próstata Andrógeno-Independiente

La eficacia *in vivo* del PSMA ADC se evaluó en un modelo de ratón de cáncer de próstata humano andrógeno-independiente. A ratones inmunológicamente deficientes se les injertaron por vía intramuscular células C4-2 en la pata trasera izquierda. Aproximadamente 14-17 días más tarde se midieron los niveles de PSA en el suero y se utilizaron para asignar al azar, animales a grupos de tratamiento. Los animales fueron tratados por vía intravenosa con el PSMA ADC y los animales fueron vigilados en cuanto a la carga del tumor, niveles de PSA y otros parámetros durante un tiempo tan prolongado como de 500 días.

En el primer experimento, los animales fueron tratados q4d x 3 con 0,2 ó 10 mg/kg de PSMA ADC. Los animales que se dejaron sin tratar desarrollaron rápidamente tumores y los animales tenían una supervivencia mediana de 32 días. En contraposición, los grupos tratados con 2 mg/kg y 10 mg/kg de PSMA ADC tenían supervivencias medianas de 58 días ($P = 0,0035$) y 94,5 días ($P = 0,0012$), respectivamente (**Tabla 3, Fig. 4A**). El tratamiento con

PSMA ADC mejoró significativamente la supervivencia mediana hasta 4,5 veces de una manera dependiente de la dosis. No existía evidencia de toxicidad relacionada con el tratamiento.

Los niveles de PSA en el suero se midieron a lo largo del tiempo mediante ELISA. La **Fig. 4B** representa la concentración media de PSA en cada uno de los grupos en los días de estudio 17, 23 y 30. El tratamiento a razón de 10 mg/kg redujo los niveles de PSA > 10 veces desde $8,8 \pm 11,7$ ng/mL el día 17 hasta $0,7 \pm 0,9$ ng/mL el día 30, mientras que niveles de PSA en el grupo control aumentaban > 60 veces a lo largo del mismo período de tiempo. Se observó una respuesta intermedia a 2 mg/kg de PSMA ADC. Las diferencias en los niveles de PSA el día 30 eran significativas tanto para los grupos de dosis de 2 mg/kg ($P = 0,0048$) como de 10 mg/kg ($P = 0,0006$). Tres de seis animales en el grupo de 10 mg/kg tenían un PSA no detectable hasta el día 52 del estudio.

Con el fin de ampliar estos hallazgos, se realizó un segundo estudio de PSMA ADC que también incluía Acm no modificado y ADC control de isotipo. Después de la aleatorización el día 14 con un nivel medio de PSA de $2,0 \pm 1,1$ ng/mL en cada uno de los grupos ($n = 5$), los animales fueron tratados con un régimen de q4d x 6. En la **Fig. 5** se representan curvas de supervivencia según Kaplan-Meier para cada uno de los grupos. Los animales tratados con control vehículo, 6 mg/kg de PSMA Acm no modificado y 6 mg/kg de ADC control tenían tiempos de supervivencia medianos similares de 29, 31 y 31 días, respectivamente; y estas diferencias no eran significativas. Sin embargo, la supervivencia mediana se amplió hasta 49 días y 148 días para animales tratados con 3 mg/kg y 6 mg/kg de PSMA ADC, respectivamente (**Tabla 3**). El tratamiento del grupo de PSMA ADC con 6 mg/kg mejoró la supervivencia post-aleatorización 7,9 veces con relación al grupo ADC control ($P = 0,0018$). El día 500, 2 de 5 animales no tenían evidencia de tumor, no había un PSA mensurable y se consideraron curados mediante el tratamiento. Como en el primer estudio, el tratamiento tenía un impacto significativo sobre los niveles de PSA el día 29 ($P = 0,0068$ para grupos de 6 mg/kg de PSMA y vehículo). Además de ello, en el grupo de 6 mg/kg de PSMA ADC, el PSA del suero disminuyó hasta niveles no detectables post-tratamiento y permaneció siendo no detectable hasta el día 63 en 4 de 5 animales. No existía una toxicidad evidente asociada con la terapia con ADC. El aspecto físico y la actividad se vieron no afectados por el tratamiento, y los pesos corporales de animales tratados y vehículo-control no eran significativamente diferentes en cualquier instante.

Tabla 3: Sumario de los tiempos de supervivencia medianos de animales portadores de tumores C4-2 tratados con PSMA ADC

	Artículo de ensayo	Dosis (mg/kg)	Supervivencia mediana (días)	Valor P^*
Estudio nº 1	Vehículo	NA	32	NA
	PSMA ADC	2	58	0,0035
	PSMA ADC	10	95	0,0010
Estudio nº 2	Vehículo	NA	29	NA
	PSMA Acm	6	31	0,1869
	ADC control	6	31	0,2970
	PSMA ADC	3	49	0,0018
	PSMA ADC	6	148	0,0018

*Comparado con el grupo control vehículo en un análisis de rangos logarítmicos de doble cara. NA = no aplicable

Ejemplo 2: Evaluación de PSMA Acm Conjugado a Tres Fármaco-enlazador Diferentes

Se evaluó el PSMA Acm cuando se conjugaba a vcMMAE y a otros dos fármaco-enlazador vcMMAF y mcMMAF. Las estructuras químicas completas de los tres fármaco-enlazador diferentes se ilustran en la **Fig. 6**.

Preparación de Tres Conjugados de Fármaco-enlazador de PSMA Acm

Los tres fármaco-enlazador se conjugaron directamente a PSMA Acm a través de un enlace tioéter para preparar aproximadamente cuatro fármacos por conjugado de anticuerpos. La reducción parcial de los disulfuros de la intercadena del Acm prosiguió con un ligero exceso de tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) a pH 7,2 y 37°C y la subsiguiente conjugación de los tioles libres con fármaco-enlazadores era cuantitativa. En síntesis, el PSMA Acm (10 mg, 67,5 nmol en PBS) se incubó a 37°C con DTPA 1 mM y 169 nmol de TCEP durante 90 min. A tres instantes durante la incubación (30, 60 y 90 minutos) se separaron partes alícuotas de 50 µg de Acm y se hicieron reaccionar con un exceso de vcMMAE. El análisis de los ADCs resultantes mediante cromatografía por interacción hidrofóbica permitió seguir el progreso de la reducción. Los resultados indicaban que el Acm se reducía rápidamente bajo las condiciones anteriores, completándose esencialmente al cabo de 1 hora. Además de ello, el grado de reducción resultó en una carga media de fármaco de 5 fármacos/Acm.

Para preparar un ADC 4 veces cargado con fármaco-enlazadores procedentes del Acm parcialmente reducido anterior, 0,5 equivalentes de DTNB se añadieron para re-oxidar de nuevo la población de Acm al nivel deseado. Después, 3 mg de este material (20,3 nmol) se hicieron reaccionar con 101 nmol de vcMMAE, vcMMAF o mcMMAF en una disolución de reacción de dimetilsulfóxido (DMSO) al 15%. Esta reacción prosiguió durante 1 hora a 0°C y luego se enfrió bruscamente con un exceso de 20 veces de N-acetil-cisteína. Los ADCs se separaron del fármaco que no había reaccionado y otras impurezas de moléculas pequeñas mediante cromatografía por exclusión del tamaño (SEC) en una columna PD-10 (Amersham Biosciences/GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se concentraron con un dispositivo de concentración centrífugo (30 kD MWCO) (Amicon Bioseparations, Millipore Corporation, Bedford, MA).

Un resumen de la caracterización de tres conjugados fármaco-enlazador se proporciona en las **Tablas 4-6** para vcMMAE, vcMMAF y mcMMAF, respectivamente. Para cada uno de los tres fármaco-enlazadores, el ADC contiene aproximadamente 4 fármacos por Acm, según se determina mediante distribución de la carga de cadena H/L y la distribución de la especie, y < 2% de fármaco libre según se determina utilizando HPLC de fase inversa (RP). Para todos los conjugados, no se detectaron agregados mediante SEC-HPLC. Además, los rendimientos globales de Acm eran 70-80%.

Tabla 4
Certificado de Ensayo del Conjugado
699028A
PSMA Acm vcMMAE
Reducción Parcial

Ensayo	Método	Resultado
<u>Concentración de Acm</u> mg/mL	UV	3,3
<u>Fármaco/Acm</u> mol/mol	Distribución de la Carga de cadena H/L (PLRP) Distribución de la especie (HIC)	4,3
<u>Fármaco No Conjugado</u> % de fármaco total	RP-HPLC	< 0,5
<u>Homogeneidad del Tamaño</u> % de Agregado	SEC-HPLC	No detectado
<u>Distribución de la Relación Molar</u> % del total	HIC-HPLC	3,5% 0 fármacos/Ac 19,4% 2 fármacos/Ac 39,6% 4 fármacos/Ac 21,0% 6 fármacos/Ac 11,7% 8 fármacos/Ac
<u>Anticuerpo Desnaturalizado</u>	PLRP-HPLC	31,3% L0 68,7% L1 10,7% H0 40,4% H1 25,1% H2 23,7% H3

Tabla 5
Certificado de Ensayo del Conjugado
699028B
PSMA Acm vcMMAF
Reducción Parcial

5

Ensayo	Método	Resultado
<u>Concentración de Acm</u> mg/mL	UV	3,1
<u>Fármaco/Acm</u> mol/mol	Distribución de la Carga de cadena H/L (PLRP) Distribución de la especie (HIC)	4,4
<u>Fármaco No Conjugado</u> % de fármaco total	RP-HPLC	< 0,5
<u>Homogeneidad del Tamaño</u> % de Agregado	SEC-HPLC	No detectado
<u>Distribución de la Relación Molar</u> % del total	HIC-HPLC	3,3% 0 fármacos/Ac 18,5% 2 fármacos/Ac 39,0% 4 fármacos/Ac 22,2% 6 fármacos/Ac 13,5% 8 fármacos/Ac
<u>Anticuerpo Desnaturalizado</u>	PLRP-HPLC	29,0% L0 71,0% L1 9,9% H0 40,2% H1 24,9% H2 25,0% H3

Tabla 6
Certificado de Ensayo del Conjugado
699028C
PSMA Acm vcMMAF
Reducción Parcial

10

Ensayo	Método	Resultado
<u>Concentración de Acm</u> mg/mL	UV	3,7
<u>Fármaco/Acm</u> mol/mol	Distribución de la Carga de cadena H/L (PLRP) Distribución de la especie (HIC)	4,4
<u>Fármaco No Conjugado</u> % de fármaco total	RP-HPLC	1,8
<u>Homogeneidad del Tamaño</u> % de Agregado	SEC-HPLC	No detectado
<u>Distribución de la Relación Molar</u> % del total	HIC-HPLC	3,8% 0 fármacos/Ac 22,4% 2 fármacos/Ac 36,3% 4 fármacos/Ac 23,1% 6 fármacos/Ac 14,4% 8 fármacos/Ac
<u>Anticuerpo Desnaturalizado</u>	PLRP-HPLC	32,7% L0 67,3% L1 14,7% H0 39,6% H1 23,8% H2 21,9% H3

Potencia y selectividad de Conjugados de PSMA Acm sobre Células de Cáncer de Próstata Humano

15 Se realizaron estudios de citotoxicidad *in vitro* con líneas de células PSMA-positivas y PSMA-negativas. En

síntesis, células PSMA-positivas (C4-2, LNCaP™ o 3T3™-PSMA) y células PSMA-negativas (PC-3T™ o 3T3™) se añadieron a microplacas de 96 pocillos a razón de $2,5 \times 10^3$ células/pocillo y se incubaron durante una noche a 37°C y 5% de CO₂. Después, las células se incubaron con ADCs diluidos en serie durante 4 días y se sometieron a ensayo en cuanto al porcentaje de exterminio de células en comparación con controles no tratados, utilizando azul de Alamar al 10%. Se determinó la concentración de ADCs requerida para el exterminio del 50% de las células (valor CI₅₀).

La **Fig. 7** ilustra curvas de dosis-respuesta de conjugados de vcMMAE (**Fig. 7A**), vcMMAF (**Fig. 7B**) y mcMMAF (**Fig. 7C**) para células C4-2 PSMA-positivas y células PC-3™ PSMA-negativas en un experimento representativo. En la **Tabla 7** se lista un resumen de la potencia (CI₅₀) y selectividad sobre líneas de células C4-2 y PC-3™. La CI₅₀ en células C4-2 que expresan PSMA se encontraba en concentraciones picomolares de 11, 42 y 60 para conjugados de vcMMAF, mcMMAF y vcMMAE, respectivamente. En contraposición, los CI₅₀ en células PC-3™ PSMA-negativas eran mayores que 90 nM, oscilando desde 94 a 264 nM. En base a la potencia de cada uno de los conjugados en PC-3™ y C4-2, se calculó la selectividad que era de 13.636; 6.286 y 1.567 para conjugados vcMMAF, mcMMAF y vcMMAE, respectivamente. El conjugado vcMMAF era el más potente en la línea de células C4-2 PSMA-positiva, y el mcMMAF era el menos tóxico frente a la línea de células control PC-3™. En comparación con el conjugado vcMMAE, existía una mejora de 4 veces y 9 veces en la selectividad para conjugados mcMMAF y vcMMAF, respectivamente.

Tabla 7: Sumario de la potencia y selectividad *in vitro* (valores CI₅₀ en pM)

Fármaco-enlazador	Potencia (pM)		Selectividad (PC-3/C4-2)	Mejora frente a vcMMAE
	C4-2 (n = 3)	PC-3 (n = 2)		
vcMMAF	11	150.000	13636	9 veces
mcMMAF	42	264.000	6286	4 veces
vcMMAE	60	94.000	1567	-

Mecanismo del Exterminio de Células por parte de Conjugado PSMA Acm Fármaco

Se realizó un análisis del ciclo celular para determinar el mecanismo de la citotoxicidad mediada por MMAE-Acm conjugado. Células 3T3™-PSMA o C4-2 se cultivaron en presencia de PSMA ADC 0,2 nM o PSMA Acm 20 nM no modificado. Las células no tratadas servían como cultivo control. A las 12 h, 24 h y 48 h, las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI) para detectar el ADN total y se analizaron mediante citometría de flujo. Tal como se indica en la **Fig. 8**, las células tratadas con PSMA ADC se paralizaron en la fase G₂. Mediante post-tratamiento durante 48 h, el porcentaje de células con un conjunto duplicado de cromosomas era > 50% para los cultivos de PSMA ADC y 2% para cultivos no tratados. La paralización del ciclo celular requería la presencia de la toxina, en este caso MMAE, dado que sólo el 3% de las células tratadas con Acm no modificado se encontraban en la fase G₂/M a las 48 h. Los datos demuestran que el tratamiento de células de cáncer de próstata con MMAE ADCs conduce a una paralización en G₂/M y luego a la apoptosis de células diana.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PSMA DEVELOPMENT COMPANY, L.L.C.
 MA, Dangshe
 5 MADDON, Paul J.
 OLSON ; William C.
 DORONINA. Svetlana
 TOKI, Brian
 SENTER, Peter
 10
 <120> CONJUGADOS DE PSMA-ANTICUERPO –FÁRMACO
 <130> p0741.70008wo00
 15 <150> US 60/792.360
 <151> 14-04-2006
 <150> US 60/692.399
 <151> 20-06-2005
 20 <160> 33
 <170> PatentIn versión 3.1
 25 <210> 1
 <211> 750
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 1

 Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg
 1 5 10 15

 Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe
 20 25 30

 Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu
 35 40 45

 Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu
 50 55 60

35

40

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile
 65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile
 85 90 95

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His
 100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile
 115 120 125

Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe
 130 135 140

Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro
 145 150 155 160

Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr
 165 170 175

Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met
 180 185 190

Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val
 195 200 205

Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly
 210 215 220

Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly
 245 250 255

Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr
 260 265 270

Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly
 275 280 285

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys
 290 295 300

ES 2 440 482 T3

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg
305 310 315 320

Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn
325 330 335

Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val
340 345 350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro
355 360 365

Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly
370 375 380

Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg
385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile
405 410 415

Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr
420 425 430

Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala
435 440 445

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

Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu
465 470 475 480

Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser
485 490 495

Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile
500 505 510

Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu
515 520 525

Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn
530 535 540

Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu

545		550		555		560
Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val						
		565		570		575
Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val						
		580		585		590
Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala						
		595		600		605
Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr						
		610		615		620
Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr						
		625		630		635
Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser						
		645		650		655
Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu						
		660		665		670
Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg						
		675		680		685
His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser						
		690		695		700
Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp						
		705		710		715
Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala						
		725		730		735
Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala						
		740		745		750

- <210> 2
- <211> 7570
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Plásmido
- 10 <400> 2

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttcgg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggttgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccatttgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctaga 900
 ggtaccaagc ttggatctca ccatggagtt gggactgcgc tggggcttcc tcgttgcctc 960
 tttaaagagt gtccagtgtc aggtgcaatt ggtggagtct gggggaggcg tggtcacgcc 1020
 tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc gtctggattc gccttcagta gatatggcat 1080
 gcactgggtc cgccaggctc caggcaaggg gctggagtgg gtggcagtta tatggtatga 1140
 tggaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa 1200
 ttccaagaac acgcagtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gccgaggaca cggctgtgta 1260
 ttactgtgcg agaggcgggtg acttctctta ctactactat tacggtatgg acgtctgggg 1320
 ccaagggacc acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct 1380
 ggcaccctct agcaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tggtaagga 1440
 ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtgtg gaactcagge gccctgacca gcggcgtgca 1500
 caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctacgcagcg tggtgaccgt 1560
 gccctccagc agcttgggca ccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa 1620
 caccaagggtg gacaagagag ttggtgagag gccagcacag ggaggagggg tgtctgctgg 1680
 aagccaggct cagcgtcctt gcctggacgc atcccggcta tgcagtccca gtccagggca 1740

gcaaggcagg ccccgctctgc ctcttcaccc ggaggcctct gcccgcccca ctcatgctca 1800
 gggagaggggt cttctggctt tttccccagg ctctgggcag gcacaggcta ggtgccccta 1860
 acccaggccc tgcacacaaa ggggagagtg ctgggctcag acctgccaaag agccatatcc 1920
 gggaggaccc tgcacctgac ctaagcccaac cccaaaggcc aaactctcca ctccctcagc 1980
 tcggacacct tctctcctcc cagattccag taactcccaa tottctctct gcagagccca 2040
 aatcttgtga caaaactcac acatgcccaac cgtgcccagg taagccagcc caggcctcgc 2100
 cctccagctc aaggcgggac aggtgcccta gagtagcctg catccaggga caggcccccag 2160
 ccgggtgctg acacgtccac ctccatctct tctcagcac ctgaactcct ggggggaccg 2220
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 2280
 gtcacatgcy tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 2340
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 2400
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 2460
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcagaaaaac catctccaaa 2520
 gccaaagggt ggaccctggt ggtgagagg ccacatggac agaggccggc tcggcccacc 2580
 ctctgccctg agagtgaccg ctgtaccaac ctctgtccct acagggcagc ccgagaaacc 2640
 acagggtgac accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac 2700
 ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca 2760
 gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc 2820
 ctatagcaag ctacccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc 2880
 cgtgatgcat gaggtctctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg 2940
 taaatgagaa ttctcgagt ctagagggcc cgtttaaac ccgtgatcag cctcgactgt 3000
 gccctctagt tgccagccat ctgttgtttg cccctcccc gtgccttctc tgaccctgga 3060
 aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa attgcatgc attgtctgag 3120
 taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac agcaagggg aggattggga 3180
 agacaatagc aggcctgctg gggatgcggg gggctctatg gcttctgagg cggaaagaac 3240
 cagctggggc tctagggggg atccccacgc gccctgtagc ggcgcattaa gcgcggcggg 3300
 tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc ccgctccttt 3360
 cgttttcttc ccttcttctc tcgccacgtt cgcgggcttt ccccgtaag ctctaaatcg 3420
 gggcatccct ttaggggttc gatttagtgc ttacggcac ctgacccca aaaaacttga 3480
 ttaggggtgat ggttcaagta gtgggccatc gccctgatag acggttttcc gccctttgac 3540
 gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa cactcaaccc 3600

tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct attggttaaa	3660
aatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaatto tgtggaatgt gtgtcagtta	3720
gggtgtggaa agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca tgcattctca	3780
ttagtcagca accagggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa gtatgcaaag	3840
catgcattct aatttagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca tcccgccct	3900
aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt ttatttatgc	3960
agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag gcttttttgg	4020
aggcctaggc ttttgcaaaa agtccccggg agcttgata tccattttcg gatctgatca	4080
gcacgtgatg aaaaagcctg aactcaccgc gacgtctgtc gagaagtttc tgatcgaaaa	4140
gttcgacagc gtctccgacc tgatgcagct ctggaggggc gaagaatctc gtgctttcag	4200
cttcgatgta ggagggcgtg gatattgctt gcgggtaaatt agctgcgcgc atggtttcta	4260
caaagatcgt tatgtttatc ggcactttgc atcgccgcgc ctcccgattc cggaagtgt	4320
tgacattggg gaattcagcg agagcctgac ctattgcac tcccgccgtg cacagggtgt	4380
cacgttgcaa gacctgctg aaaccgaact gcccgctgtt ctgcagccgc tcgggaggc	4440
catggatgcg atcgctgcgc ccgatcttag ccagacgagc gggttcggcc cattcggacc	4500
gcaaggaatc ggtcaataca ctacatggcg tgatttcata tgcccgattg ctgatcccca	4560
tgtgtatcac tggcaaatc tgatggacga caccgtcagt gcgtccgtcg cgcaggctct	4620
cgatgagctg atgctttggg ccgaggactg cccgaagtc cggcacctcg tgcacgcgga	4680
tttcggctcc aacaatgtcc tgacggacaa tggccgcata acagcgtca ttgactggag	4740
cgaggcgatg ttccgggatt cccaatacga ggtcgccaac atcttcttct ggaggccgtg	4800
gttggttgt atggagcagc agacgcgcta ctccagcgc aggcattccg agcttgacg	4860
atcgccgcgc ctccgggcgt atatgctccg cattggtctt gaccaactct atcagagctt	4920
ggttgacggc aatttcgatg atgcagcttg ggccgagggt cgatgcgacg caatcgtccg	4980
atccggagcc gggactgtcg ggcgtacaca aatcgccgc agaagcgcgc ccgtctggac	5040
cgatggctgt gtagaagtac tcgccgatag tggaaccca cgcgccagca ctgctccgag	5100
ggcaaaggaa tagcacgtgc tacgagattt cgattccacc gccgccttct atgaaagggt	5160
gggcttcgga atcgttttcc gggacgcgc ctggatgac ctccagcgcg gggatctcat	5220
gctggagttc ttcccccacc ccaacttggt tattgcagct tataatgggt acaaataaag	5280
caatagcatc acaaatttca caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtgggtt	5340
gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta gctagagctt	5400

ggcgtaatca tggatcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca caattccaca 5460
 caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggg gcctaattgag tgagctaaact 5520
 cacattaatt gcgttgcgct cactgccgcg tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct 5580
 gcattaatga atcggccaac gcgoggggag aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc 5640
 ttctctgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca 5700
 ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg 5760
 agcaaaaggc cagcaaaagg ccagggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca 5820
 taggctccgc cccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa 5880
 cccgacagga ctataaagat accaggcggt tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc 5940
 tgttcgagcc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc 6000
 gctttctcaa tgcctacgct gtaggtatct cagttcgggt taggtogttc gctccaagct 6060
 gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg 6120
 tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag 6180
 gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg tacagagttc ttgaagtggg gccctaacta 6240
 cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg 6300
 aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtgggttttt 6360
 tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt 6420
 ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt tggatcatgag 6480
 attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat 6540
 ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc 6600
 tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac ctagttgcc tgactccccg tcgtgtagat 6660
 aactacgata cgggagggct taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc 6720
 acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgag 6780
 aagtggctct gcaactttat ccgctccat ccagtctatt aattggtgcc gggaagctag 6840
 agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttggt gccattgcta caggcatcgt 6900
 ggtgtcacgc tcgtogtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg 6960
 agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt 7020
 tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac tgcataattc 7080
 tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc 7140
 attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtaaa tacgggataa 7200
 taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacggt ctccggggcg 7260

aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctogtgcacc 7320
 caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag 7380
 gcaaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt 7440
 cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt 7500
 tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttcgcgcg acatttcocc gaaaagtgcc 7560
 acctgacgtc 7570

<210> 3
 <211> 7597
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

10 <400> 3

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 cgcgatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttaggggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttaagggggc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgocca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactcgcg ccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctaga 900
 ggtaccaagc ttggatctca ccatggggtc aacogccatc ctacccatgg agttggggct 960
 gcgctgggtt ctccctggtt ctcttttaag aggtgtccag tgtcaggtgc agctgggtga 1020

gtctggggga ggcgtggtec agcctgggag gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg 1080
attcaccttc agtaactatg tcatgcactg ggtccgccag gctccaggca aggggctgga 1140
gtgggtggca attatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg 1200
ccgattcacc atotccagag acaattccaa gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct 1260
gagagccgag gacacggctg tgtattactg tgoggggtgga tataactgga actacgagta 1320
ccactactac ggtatggacg tctggggcca agggaccacg gtcaccgtct cctcagcctc 1380
caccaagggc ccacgggtct tccccctggc accctctagc aagagcacct ctggggggcac 1440
agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa 1500
ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggct gtccctacagt cctcaggact 1560
ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agaöctacat 1620
ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc 1680
agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcctc 1740
ccggctatgc agtcccagtc cagggcagca aggcaggccc cgtctgcctc ttcacccgga 1800
ggcctctgcc cgcöccactc atgctcaggg agagggtctt ctggcttttt cccagggctc 1860
tgggcaggca caggctaggt gccctaacc caggccctgc acacaaaggg gcagggtgctg 1920
ggctcagacc tgccaagagc catatccggg aggaccctgc ccctgaccta agcccacccc 1980
aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg gacaccttct ctöctcccag attccagtaa 2040
ctcccaatct tctctctgca gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaacgt 2100
gcccaggtaa gccagcccag gcctcgccct ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag 2160
tagcctgcat ccagggacag gcccagccg ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc 2220
tcagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctct tcccccaaa aöccaaggac 2280
accctcatga tctcccgac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 2340
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 2400
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 2460
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 2520
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggtgga ccggtgggt gcgagggcca 2580
catggacaga ggcgggtcg gccaccctc tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc 2640
tgtöcctaca gggcagcccö gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat ccggggagga 2700
gatgaccaag aaccaggta gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgcacat 2760
cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg 2820
gctggactcc gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg 2880

gcagcagggg aacgttttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac 2940
 gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgagaatc ctcgagtcta gagggcccg 3000
 ttaaaccocg tgatcagcot cgaactgtgc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc 3060
 ctcccccg tg ccttcttga cctggaagg tgcactccc actgtccttt cctaataaaa 3120
 tgaggaaatt gcctgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg 3180
 gcaggacagc aagggggagg attggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg 3240
 ctctatggct tctgaggcgg aaagaaccag ctggggctct aggggggtatc cccacgcgcc 3300
 ctgtagcggc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact 3360
 tgccagcgcc ctagcgcccg ctcttttcgc tttcttccct tctttctcgc ccacgttcgc 3420
 cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg catcccttta gggttccgat ttagtgcttt 3480
 acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta ggggtgatgg tcaagtagtg ggccatcgcc 3540
 ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg ttctttaata gtggactctt 3600
 gttccaaact ggaacaacac tcaacctat ctccgtctat tcttttgatt tataagggat 3660
 tttggggatt tcggcctatt ggttaaaaaa tgagctgatt taacaaaaat ttaacgcgaa 3720
 ttaattctgt ggaatgtgtg tcagttaggg tgtggaagt cccaggtc cccaggcagg 3780
 cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg 3840
 ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc 3900
 gccctaact ccgccatcc cgccctaac tccgccagt tccgccatt ctccgcccc 3960
 tggctgacta attttttta tttatgcaga ggcgaggcc gcctctgcct ctgagctatt 4020
 ccagaagtag tgaggaggct ttttgagg cctagcttt tgcaaaaagc tccggggagc 4080
 ttgtatatcc attttcggat ctgatcagca cgtgatgaaa aagcctgaac tcacgcgcac 4140
 gtctgtcgag aagtttctga tcgaaaagt cgacagcgtc tccgacctga tgcagctctc 4200
 ggagggcgaa gaatctctg ctttcagctt cgatgtagga gggcgtggat atgtcctgcg 4260
 ggtaaatagc tgcgcgatg gttctacaa agatcgttat gtttatcggc actttgcac 4320
 ggccgcgtc ccgattccgg aagtgettga cattggggaa ttcagcgaga gcctgacct 4380
 ttgcatctcc cgcgtgcac aggggtgcac gttgcaagac ctgcctgaaa ccgaactgcc 4440
 cgctgttctg cagccggtcg cggaggccat ggatgogate gctggggccg atcttagcca 4500
 gacgagcggg ttcggcccat tcggaccgca aggaatcggc caatacacta catggcgtga 4560
 tttcatatgc gcgattgctg atccccatgt gtatcactgg caaactgtga tggacgacac 4620
 cgtcagtgcg tccgtcgcg aggcctcoga tgagctgatg ctttgggccg aggactgccc 4680

cgaagtcogg cacctcgtgc acgoggatth oggotccaac aatgtcotga cggacaatgg 4740
 ccgcataaca gcggteattg actggagcga ggcgatgttc ggggattccc aatacgaggt 4800
 cgccaacatc ttcttctgga ggccgtgggt ggcttgatg gagcagcaga cgcgctaact 4860
 cgagcggagg catccggagc ttgcaggatc gccgcggctc cgggcgtata tgctccgcat 4920
 tggctctgac caactctatc agagcttggg tgacggcaat ttogatgatg cagcttgggc 4980
 gcaggggtcga tgcgacgcaa tcgtccgatc cggagccggg actgtcgggc gtacacaaat 5040
 cgcccgacga agcgcggccg tctggaccga tggctgtgta gaagtactcg ccgatagtgg 5100
 aaaccgacgc ccagcactc gtccgagggc aaaggaatag cactgtctac gagatttcga 5160
 ttccaccgcc gccttctatg aaaggttggg ctccggaatc gttttccggg acgccggctg 5220
 gatgatectc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccaccca acttgtttat 5280
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 5340
 tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatgtctg 5400
 tataccgtcg acctctagct agagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg 5460
 aaattgttat ccgctcacia ttccacacia datacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 5520
 ctgggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaatggc ttgcgctcac tgcccgttt 5580
 ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg 5640
 cggtttgctg attgggcgct ctccgcttc ctgcctcact gactcgtctg gctcggctgt 5700
 tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 5760
 aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 5820
 aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgccc cctgacgagc atcacaaaaa 5880
 tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaacc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 5940
 ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgacctg ccgcttacg gatacctgtc 6000
 cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag 6060
 ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg ttcagcccga 6120
 ccgctgcgcc ttatccggt actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttata 6180
 gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag ggggtgctac 6240
 agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 6300
 cgtctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaca 6360
 aaccaccgct ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 6420
 aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 6480
 ctacagttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 6540

```

aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 6600
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat 6660
agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 6720
cagtgcctga atgataccgc gagaccacgc ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa 6780
ccagccagcc ggaagggcgc agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca 6840
gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 6900
cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 6960
cagctccggt tccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 7020
ggttagctcc ttcggctctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 7080
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa gatgottttc 7140
tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 7200
ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgt 7260
catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 7320
cagttcgatg taaccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 7380
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aatgccgcg aaaaaggga taaggcgac 7440
acggaaatgt tgaatactca tactottcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 7500
ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 7560
tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtc 7597

```

<210> 4
 <211> 7579
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

<400> 4

```

gacggatcgg gagatctccc gatccoctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agccatata 300

```

tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tgcctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttocaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctcaactatag ggagacccaa gctggctaga	900
ggtaccaagc ttggatctca ccatggagtt gggacttagc tgggttttcc tcgttgctct	960
tttaagaggt gtccagtgtc aggtccagct ggtggagtct gggggaggcg tggtcagcc	1020
tgggaggtcc ctgagaactc cctgtgcagc gtctggattc accttcagta gctatggcat	1080
gcaactgggtc cgccaggctc caggcaaggg gctggactgg gtggcaatta tttggcatga	1140
tggaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa	1200
ttccaagaag acgctgtacc tgcaaatgaa cagtttgaga gccgaggaca cggctgtgta	1260
ttactgtgcg agagcttggg cctatgacta cggtgactat gaatactact tcggtatgga	1320
cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctctcagcc tccaccaagg gcccatcggt	1380
cttccccctg gcacctcta gcaagagcac ctctgggggc acagcggccc tgggctgcct	1440
ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg aactcaggcg ccctgaccag	1500
cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga ctctactccc tcagcagcgt	1560
ggtgaccgtg cctccagca gcttgggcac ccagacctac atctgcaacg tgaatcacia	1620
gccagcaac accaagggtg acaagagagt tggtagagg ccagcacagg gagggagggt	1680
gtctgtgga agccaggctc agcgtcctg cctggacgca tcccggctat gcagtcccag	1740
tccagggcag caaggcaggc ccggtctgcc tcttcacccg gaggcctctg cccgccccac	1800
tcatgctcag ggagagggtc ttctggcttt ttccccaggc totgggcagg cacaggctag	1860
gtgcccctaa cccaggccct gcacacaaag gggcagggtc tgggctcaga cctgccaaga	1920
gccatatccg ggaggaccct gccctgacc taagcccacc ccaaaggcca aactctccac	1980
tccctcagct cggacacctt ctctcctccc agattccagt aactcccaat cttctctctg	2040
cagagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgccacc gtgccagggt aagccagccc	2100
aggcctcgcc ctccagctca aggcgggaca ggtgccctag agtagcctgc atccagggac	2160

agggcccagc cgggtgctga caggtccacc tccatctctt cctcagcacc tgaactcctg 2220
 gggggaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccg 2280
 acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 2340
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 2400
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 2460
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 2520
 atctccaaag ccaaagggtg gaccogtggg gtgcgagggc cacatggaca gaggccggct 2580
 cggcccaccc tctgccctga gagtgaccgc tgtaccaacc tctgtcccta cagggcagcc 2640
 ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggag gagatgacca agaaccaggt 2700
 cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag 2760
 caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagccctccc gtgctggact ccgacggctc 2820
 cttcttcttc tatagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 2880
 ctcctgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccaactac acgcagaaga gcctctccct 2940
 gtctccgggt aaatgagaat tcctcgagtc tagagggccc gtttaaacc gctgatcagc 3000
 ctcgactgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttctt 3060
 gaccctggaa ggtgccactc ccaactgtct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 3120
 ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg ggggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga 3180
 ggattgggaa gacaatagca ggcctgctgg ggatgcgggtg ggcctctatgg cttctgaggc 3240
 ggaaagaacc agctggggct ctagggggta tccccacgog ccctgtagcg gcgcattaa 3300
 cgcggcggggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgttaca cttgccagcg ccctagcgcc 3360
 cgctcctttc gctttcttcc cttcctttct cgcacgttc gccggctttc ccctcaagc 3420
 tctaaatcgg ggcctccctt tagggttccg atttagtget ttaaggcacc tcgaccccaa 3480
 aaaacttgat taggggtgat gttaacgtag tgggcoatcg ccctgataga cggtttttcg 3540
 ccctttgacg ttggagtcca cgttctttta tagtggaactc ttgttccaaa ctggaacaac 3600
 actcaacct atctcggtct attcttttga ttataaaggg attttgggga ttctggccta 3660
 ttgggttaaaa aatgagctga ttttaacaaa atttaacgog aattaattct gtggaatgtg 3720
 tgtcagttag ggtgtggaag gtccccaggc tccccaggca ggcagaagta tgcaaagcat 3780
 gcatctcaat tagtcagcaa ccagggtgtg aaagtcccca ggctccccag caggcagaag 3840
 tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc aacctagtc ccgcccctaa ctcgcccac 3900
 cccgccccta actccgcca gttccgcca ttctccgccc catggctgac taattttttt 3960

tatttatgca gaggccgagg cgcctctgc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg 4020
 cttttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa gctcccggga gcttgtatat ccattttcgg 4080
 atctgatcag cacgtgatga aaaagcctga actcaccgag acgtctgtcg agaagtttct 4140
 gatcgaaaag ttcgacagcg tctccgacct gatgcagctc tcggagggcg aagaatctcg 4200
 tgctttcagc ttcgatgtag gagggcgtag atatgtcctg cgggtaaata gctgcgccga 4260
 tggtttctac aaagatcgtt atgtttatcg gcactttgca tcggccgcgc tcccgattcc 4320
 ggaagtgcct gacattgggg aattcagcga gaggctgacc tattgcatct cccgcctgac 4380
 acaggggtgc acgttgcaag acctgcctga aaccgaactg cccgctgttc tgcagccggt 4440
 cgcggaggcc atggatgcga tcgctgcggc cgatcttagc cagacgagcg ggttcggccc 4500
 attcggaccg caaggaatcg gtcaatacac tacatggcgt gatttcatat gcgcgattgc 4560
 tgatccccat gtgtatcact ggcaaaactgt gatggacgac accgtcagtg cgtccgtcgc 4620
 gcaggctctc gatgagctga tgctttgggc caggagactgc ccgaagtcc ggcacctcgt 4680
 gcacgcggat ttcggctcca acaatgtcct gacggacaat ggccgcataa cagcggctcat 4740
 tgactggagc gaggcgatgt tcggggattc ccaatacagag gtccccaaca tcttctctcg 4800
 gaggcctggg ttggcttgta tggagcagca gacgcgtac ttcgagcggga ggcattccgga 4860
 gcttgcaagg tcgccgcggc tcggggcgta tatgctccgc attgggtcttg accaactota 4920
 tcagagcttg gttgacggca atttcgatga tgcagcttg ggcagggtc gatgcgacgc 4980
 aatcgtccga tcgggagccg ggactgtcgg gcgtacacaa atcgcccgca gaagcgcggc 5040
 cgtctggacc gatggctgtg tagaagtaact cgcgatagt ggaaaccgac gcccagcac 5100
 tcgtccgagg gcaaaggaat agcacgtgt acgagatttc gattccaccg ccgccttota 5160
 tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg 5220
 ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc caacttgttt attgcagctt ataattggtta 5280
 caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca tttttttcac tgattcttag 5340
 ttgtgggttg tccaaactca tcaatgtatc ttatcatgtc tgtataccgt cgaccttag 5400
 ctagagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg tgaaattggt atccgctcac 5460
 aattccacac aacatacagc ccggaagcat aaagtgtaaa gcctgggggtg cctaattgagt 5520
 gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgccgctt ttccagtcgg gaaacctgtc 5580
 gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggag 5640
 ctcttcgctt tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcgggtgc ggcgagcgg 5700
 atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa 5760
 gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaacgt aaaaaggccg cgttgctggc 5820

gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatacaaaa aatcgacgct caagtcagag 5880
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcggtt cccctggaa gctccctcgt 5940
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgccttcc tcccttcggg 6000
aagcgtggcg ctttctcaat gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg aggtcgttcg 6060
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cggttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg 6120
taactatcgt cttgagtcca acccggttaag aacgactta tcgccactgg cagcagccac 6180
tggtaacagg attagcagag cgagggtatgt aggcgggtgt acagagttct tgaagtgggtg 6240
gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt 6300
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaacaccg ctggtagcgg 6360
tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc 6420
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt 6480
ggtcattgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt 6540
taaataatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag 6600
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt togttcaccc atagttgcct gaactcccg 6660
cgtgtagata actacgatac gggagggtt accatctggc cccagtgcgt caatgatacc 6720
gcgagaccca cgctcacgg ctccagattt atcagcaata aaccagccag ccggaagggc 6780
cgagcgcaga agtggctctg caactttatc cgcctccatc cagtctatta attggtgcg 6840
ggaagctaga gtaagtagtt cgcaggttaa tagtttgcc aacgttggtt ccattgctac 6900
aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgttttg tatggcttca ttcagctccg gttcccaacg 6960
atcaaggcga gttacatgat ccccatggt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcgggtcc 7020
tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtggtatca ctcattggtta tggcagcaat 7080
gcataattct ctactgtca tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc 7140
aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt tgcctctgcc cggcgtcaat 7200
acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg ctcattcattg gaaaacgttc 7260
ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaaccac 7320
tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa 7380
aacaggaagg caaatgccg caaaaaagg aataaggcg acacggaaat gttgaatact 7440
catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag gggtattgtc tcatgagcgg 7500
atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gtccgcgcga catttccccg 7560
aaaagtgcc cctgacgtc 7579

<211> 7558
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Plásmido

<400> 5
 gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttaggggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtaagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccc ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 780
 gttaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gottatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900
 ggtaccaagc ttggatocca ccatgggggc aacggtcatc ctgcctctcc tctggctgt 960
 tctccaagga gtctgtgccg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc 1020
 oggggagttc ctgaagatct cctgtaaggg ttctggatac agctttacca gttactggat 1080
 cggctgggtg cgcagatgc ccgggaaagg cctggagtgg atggggatca tctatcctgg 1140
 tgactctgat accagatata gcccgtcctt ccaaggccag gtcaccatct cagccgacaa 1200
 gtccatcagc accgcctacc tgcagtggag cagcctgaag gcctcggaca ccgcatgta 1260
 ttactgtgog agacggatgg cagcagctgg cccctttgac tactggggcc agggaaccct 1320
 ggtcacgctc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctag 1380
 caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga 1440

accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc	1500
tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag	1560
cttgggcacc cagacctaca tctgcaaagt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga	1620
caagagagtt ggtgagaggc cagcacaggg agggaggggtg tctgctggaa gccaggctca	1680
gcgctcctgc ctggacgcct cccggctatg cagtcccagt ccagggcagc aaggcaggcc	1740
ccgtctgcct cttcaccocg aggcctctgc ccgccccact catgctcagg gagagggctct	1800
tctggctttt tcccaggct ctgggcagge acaggctagg tgcccctaac ccaggccctg	1860
cacacaaagg ggcagggtgct gggctcagac ctgccaagag ccatatccgg gaggaccctg	1920
cccctgacct aagcccaccc caaaggccaa actotccact ccctcagctc ggacaccttc	1980
tctcctccca gattccagta actcccaatc ttctctctgc agagcccaaa tottgtgaca	2040
aaactcacac atgcccacog tgcccaggta agccagccca ggcctcgccc tccagctcaa	2100
ggcgggacag gtgccttaga gtagcctgca tccagggaca ggcccagcc ggggtgctgac	2160
acgtccacct ccctctcttc ctccagacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcttc	2220
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgcgtg	2280
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg	2340
gaggtgcata atgccaagac aaagccgogg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	2400
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggttgaatg gcaaggagta caagtgcagg	2460
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggtggg	2520
accogtgggg tgogagggcc acatggacag aggcgggctc ggcccaccct ctgccctgag	2580
agtgaccgt gtaccaacct ctgtccctac agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac	2640
cctgccccca tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa	2700
aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa	2760
ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct	2820
caccgtggac aagagcagggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg tgatgcatga	2880
ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatgagaatt	2940
cctcgagtct agagggcccg tttaaaoccc ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg	3000
ccagccatct gttgtttgcc cctccccctg gccttccttg accctggaag gtgccactcc	3060
cactgtcctt tcctaataaa atgaggaaat tgcctgcctg tgtctgagta ggtgtcattc	3120
tattctgggg ggtgggggtg ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag	3180
gcatgctggg gatgcgggtg gctctatggc ttctgaggcg gaaagaacca gctggggctc	3240

tagggggtat	ccccacgcgc	cctgtagcgg	cgcatthaagc	gcggcgggtg	tggtgggttac	3300
gcgcagcgtg	accgctacac	ttgccagcgc	cctagcgcgc	gtccctttcg	ctttcttccc	3360
ttcctttctc	gccacgttcg	ccggctttcc	cogtcaagct	ctaaatcggg	gcatcccttt	3420
agggttccga	tttagtgott	tacggcacct	cgaccccaaa	aaacttgatt	agggtgatgg	3480
ttcacgtagt	gggccatcgc	cctgatagac	ggtttttcgc	cctttgacgt	tgaggtccac	3540
gttctttaat	agtggactct	tgttccaaac	tggaacaaca	ctcaacccta	tctcgggtcta	3600
ttcttttgat	ttataaggga	ttttggggat	ttcggcctat	tggttaaaaa	atgagctgat	3660
tttaacaaaa	tttaacgcga	attaattctg	tggaatgtgt	gtcagttagg	gtgtggaaag	3720
tcccaggct	ccccaggcag	gcagaagtat	gcaaagcatg	catctcaatt	agtcagcaac	3780
cagggtgtga	aagtccccag	gtccccagc	aggcagaagt	atgcaaagca	tgcatctcaa	3840
ttagtacga	accatagtc	cgcccctaac	tccgccatc	ccgccctaa	ctccgccag	3900
ttccgcccat	tctccgcccc	atggctgact	aatTTTTTTT	atttatgcag	aggccgaggc	3960
cgcctctgcc	tctgagctat	tccagaagta	gtgaggaggc	ttttttggag	gcctaggctt	4020
ttgcaaaaag	ctcccgggag	cttgtatato	catttttcgga	tctgatcagc	acgtgatgaa	4080
aaagcctgaa	ctcaccgcga	cgtctgtcga	gaagtttctg	atcgaaaagt	tcgacagcgt	4140
ctccgacctg	atgcagctct	cggagggcga	agaatctcgt	gctttcagct	tcgatgtagg	4200
agggcgtgga	tatgtcctgc	gggtaaaatag	ctgcgcgat	ggtttctaca	aagatcgtta	4260
tgtttatcgg	cactttgcat	cggccgcgct	cccgattccg	gaagtgcctg	acattgggga	4320
attcagcgag	agcctgaact	attgcatctc	ccgccgtgca	cagggtgtca	cgttgcaaga	4380
cctgcctgaa	accgaaactgc	ccgctgttct	gcagccggtc	gcggaggcca	tggtatgcgat	4440
cgtgcggcc	gatcttagcc	agacgagcgg	gttcggccca	ttcggaccgc	aagggaatcgg	4500
tcaatacact	acatggcgtg	atttcatatg	cgogattgct	gatcccatg	tgtatcactg	4560
gcaaactgtg	atggacgaca	ccgtcagtgc	gtccgtccgc	caggctctcg	atgagctgat	4620
gctttgggcc	gaggactgcc	ccgaagtccg	gcacctcgtg	cacgcggatt	tcggctccaa	4680
caatgtcctg	acggacaatg	gccgcataac	agcggtcatt	gactggagcg	aggcgatggt	4740
cggggattcc	caatacgagg	tcgccaacat	cttctttctg	aggccgtggt	tggtctgtat	4800
ggagcagcag	acgcgctact	tcgagcggag	gcatccggag	cttgacggat	cgccgcggct	4860
ccgggcgtat	atgctccgca	ttggtcttga	ccaactctat	cagagcttgg	ttgacggcaa	4920
tttcgatgat	gcagcttggg	cgcagggtcg	atgcgaogca	atcgtccgat	ccggagccgg	4980
gactgtcggg	cgtacacaaa	tcgcccgcag	aagcgcggcc	gtctggaccg	atggctgtgt	5040
agaagtactc	gccgatagtg	gaaaccgacg	ccccagcact	cgtccgaggg	caaaggaata	5100

gcacgtgcta cgagatttcg attccaccgc cgccttcctat gaaagggttg gcttcggaat 5160
cgttttccgg gacgcgggct ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt 5220
cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 5280
aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 5340
caatgtatct tatcatgtct gtataccgtc gacctctagc tagagcttgg cgtaatcatg 5400
gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacagac 5460
cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaaacta cattaattgc 5520
gttgcgctca ctgcccgtt tccagtcggg aaacctgtcg tgccagctgc attaatgaat 5580
cggccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattgggcgc tcttcgctt cctcgctcac 5640
tgactcgctg cgtcgggtcg ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg 5700
aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca 5760
gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc 5820
ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact 5880
ataaagatac caggcgtttc ccctggaag ctccctcgtg cgtctctctg ttcogaccct 5940
gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcaatg 6000
ctcagctgt aggtatctca gttcgggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca 6060
cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc cttatccggg aactatcgtc ttgagtccaa 6120
cccggttaaga cagcacttat cgcactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc 6180
gaggatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag 6240
aaggacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg 6300
tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca 6360
gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacgggggc 6420
tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag 6480
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata 6540
tgagtaaaact tggctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat 6600
ctgtctattt cgttcaccca tagttgcctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg 6660
ggagggttta ccatctggcc ccagtgtgc aatgataccg cgagaccac gctcaccggc 6720
tcagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggctcctgc 6780
aactttatcc gcctccatcc agtotattaa ttgttgccgg gaagctagag taagtagttc 6840
gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc 6900

gtcgttttggg atggcttcat tcagctccgg ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgatc 6960
 ccccatgttg tgcaaaaaag cggtttagctc cttcgggtcct ccgacgttg tcagaagtaa 7020
 gttggccgca gtgttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat 7080
 gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac totgagaata 7140
 gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtaata cgggataata ccgcgccaca 7200
 tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggogaa aactctcaag 7260
 gatcttaccg ctgttgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc 7320
 agcatctttt actttcacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc 7380
 aaaaaaggga ataaggcgga cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata 7440
 ttattgaagc atttatcagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta 7500
 gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttccccga aaagtgccac ctgacgtc 7558

<210> 6
 <211> 7576
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

10 <400> 6
 gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gottgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttaggggttag gcgttttgcg ctgcttcgag atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 ccgcgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacocca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggag 780

gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgottactg gottatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga	900
ggtaaccaagc ttggatctca ccatggagtt tgggctgtgc tggattttcc tcgttgcctc	960
tttaagaggt gtccagtgtc aggtgcagct ggtggagtct gggggaggcg tgggccagcc	1020
tgggaggtcc ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcatta gctatggcat	1080
gcactgggtc cgccaggctc caggcaaggg gctggagtgg gtggcagta tatcatatga	1140
tggaagtaat aaatactatg cagactccgt gaagggccga ttcaccatct ccagagacaa	1200
ttccaagaac acgctgtatc tgcaaatgaa cagcctgaga gctgaggaca cggctgtgta	1260
ttactgtgcg agagtattag tgggagcttt atattattat aactactacg ggatggacgt	1320
ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctacgcctcc accaagggcc catcggtctt	1380
ccccctggca ccctctagca agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt	1440
caaggactac ttccccgaac cgggtgacgg gtctgtggaac tcaggcgccc tgaccagcgg	1500
cgtgcacacc ttcccggtcgc tcctacagtc ctcaggactc tactccctca gcagcgtggt	1560
gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc tgcaacgtga atcacaagcc	1620
cagcaacacc aagggtggaca agagagttgg tgagaggcca gcacaggag ggagggtgtc	1680
tgctggaagc caggctcagc gctcctgcct ggacgcctcc cggctatgca gtcccagtc	1740
agggcagcaa ggcaggcccc gtctgcctct tcaccggag gcctctgccc gccccactca	1800
tgctcaggga gagggtcttc tggctttttc ccaggctct gggcaggcac aggctagggtg	1860
cccctaacce aggcctgca cacaagggg cagggtgctg gctcagacct gccaagagcc	1920
atatecggga ggaccctgcc cctgacctaa gccacccca aaggccaaac totccactcc	1980
ctcagctcgg acaccttctc tcctoccaga ttccagtaac tcccaatctt ctctotgcag	2040
agcccaaato ttgtgacaaa actcacacat gccacogtg ccaggtaag ccagcccagg	2100
cctcgccctc cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt agcctgcato cagggacagg	2160
ccccagccgg gtgctgacac gtccacctcc atctcttctc cagcacctga actcctgggg	2220
ggaccgtcag tcttctctct cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc	2280
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	2340
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac	2400
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gotgaatggc	2460
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatoga gaaaaccatc	2520
tccaaagcca aagggtggac ccgtggggtg cgagggccac atggacagag gccggctcgg	2580

cccaccctct gccctgagag tgaccgctgt accaacctct gtccctacag ggcagccccc 2640
 agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggctcag 2700
 cctgacctgc ctgggtcaaag gctttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa 2760
 tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg aaggctcctt 2820
 cttoctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtg cagcagggga aogtcttctc 2880
 atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc 2940
 tccgggtaaa tgagaattcc tcgagtctag agggcccgtt taaacccgct gatcagcctc 3000
 gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccggtc cttocttgac 3060
 cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaaat gaggaaattg catcgcatthg 3120
 totgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga 3180
 ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt ctgaggcgga 3240
 aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc 3300
 ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcgccgc 3360
 tctttctgct ttcttccctt cctttctcgc caggttcgac ggctttcccc gtcaagctct 3420
 aaatcggggc atcccttttag ggttccgatt tagtgettta cggcacctcg accccaaaaa 3480
 acttgattag ggtgatgggt cagctagtgg gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc 3540
 tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact 3600
 caaccctatc tcggtctatt cttttgattt ataagggtt ttggggattt cggcctattg 3660
 gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcgaat taattctgtg gaatgtgtgt 3720
 cagttagggt gtggaaagtc cccaggctcc ccaggcaggc agaagtatgc aaagcatgca 3780
 tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag gcagaagtat 3840
 gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc cgcctatccc 3900
 gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgcccctt ggctgaacta ttttttttat 3960
 ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt 4020
 ttttgagggc ctaggctttt gcaaaaagct ccggggagct tgtatatcca ttttcggatc 4080
 tgatcagcac gtgatgaaaa agcctgaact caccgcgacg tctgtcgaga agtttctgat 4140
 cgaaaagttc gacagcgtct ccgacctgat gcagctctcg gagggcgaag aatctcgtgc 4200
 tttcagcttc gatgtaggag ggcgtggata tgtcctgcgg gtaaatagct gcgcgatgg 4260
 tttctacaaa gatcggttatg tttatcggca ctttgcatcg gccgcgctcc cgattccgga 4320
 agtgcttgac attggggaat tcagcgagag cctgacctat tgcatctccc gccgtgcaca 4380
 ggggtgtcag ttgcaagacc tgccgtgaaac cgaactgccc gctgttctgc agcgggtcgc 4440

ggaggccatg gatgogatcg ctgcgggccga tcttagccag acgagcgggt tcggccatt 4500
 cggaccgcaa ggaatcggtc aatacactac atggcgtgat ttcatatgcg cgattgctga 4560
 tccccatgtg tatcactggc aaactgtgat ggacgacacc gtcagtgcgt ccgtcgogca 4620
 ggctctcgat gagctgatgc tttggggccga ggaactgcccc gaagtccggc acctcgtgoa 4680
 cgcggaatttc ggctccaaca atgtcctgac ggacaatggc cgcataacag cggtcattga 4740
 ctggagcgag gcgatgttcg gggattccca atacgaggtc gccaacatct tcttctggag 4800
 gccgtgggtg gcttgtatgg agcagcagac gcgctaactc gagcggaggc atccggagct 4860
 tgcaggatcg ccgcggctcc gggcgatat gctccgcatt ggtcttgacc aactctatca 4920
 gagcttggtt gacggcaatt tcgatgatgc agcttgggcy cagggtcgat gcgacgcaat 4980
 cgtccgatcc ggagccggga ctgtcgggcy tacacaaatc gcccgagaa gcgcggcgt 5040
 ctggaccgat ggctgtgtag aagtactcgc cgatagtga aaccgacgcc ccagcactcg 5100
 tccgagggca aaggaatagc acgtgctacg agatttcgat tccaccgccg cctctatga 5160
 aaggttgggc ttcggaatcg tttccggga cgcggctg atgacctcc agcgcgggga 5220
 totcatgctg gagttcttcg cccaccccaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia 5280
 ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagtgtg 5340
 tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta tcatgtctgt ataccgtcga cctctagcta 5400
 gagcttggcg taatcatggt catagctgtt tctgtgtga aattgttate cgtccacaa 5460
 tccacacaac atacgagccg gaagcataaa gtgtaaagcc tggggtgcct aatgagtga 5520
 ctaactcaca ttaattgcgt tgcgtcact gccgccttc cagtccggaa acctgctgtg 5580
 ccagctgcat taatgaatcg gccaacgcgc ggggagaggc gggttgcgta ttgggcgctc 5640
 ttccgcttcc tcgctcactg actcgtgctg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc 5700
 agctcactca aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa 5760
 catgtgagca aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgcgtggcgtt 5820
 tttccatagg ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgaagctcaa gtcagagggtg 5880
 gcgaaaccgc acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct acctcgtgcg 5940
 ctctctgtt ccgacctgc cgttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcggaag 6000
 cgtggcgctt tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc 6060
 caagctgggc tgtgtgcacg aacccccgt tcagcccgac cgtgcgcct tatccggtaa 6120
 ctatcgtctt ggtccaacc cgtgaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg 6180
 taacaggatt agcagagcga ggtatgtagg cgggtgtaca gagttcttga agtggtggcc 6240

taactacggc tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac 6300
 ottcggaana agagttggta gctcttgatc cggcaaaaa accaccgctg gtagcgggtg 6360
 tttttttgtt tgcaagcagc agattacgog cagaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt 6420
 gatcttttct acggggtctg acgctcagtg gaacgaaaa tcacgttaag ggatttttgt 6480
 catgagatta tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttta 6540
 atcaatotaa agtatatatg agtaaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga 6600
 ggcacctatc tcagcgatct gtctatttctg ttcattccata gttgcctgac tccccgtcgt 6660
 gtagataact acgatacggg agggccttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgog 6720
 agaccacgc tcaccggctc cagatttctc agcaataaac cagccagccg gaagggccga 6780
 gcgcagaagt ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga 6840
 agctagagta agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg 6900
 catcgtgggtg tcacgctcgt cgtttgggtat ggcttcattc agctccggtt cccaacgatc 6960
 aaggcgagtt acatgatccc ccatgttggtg caaaaaagcg gttagctcct tcggctcctc 7020
 gatcgttggtc agaagtaagt tggccgcagt gttatcactc atgggttatgg cagcactgca 7080
 taattctctt actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggtg agtactcaac 7140
 caagtcattc tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccgg cgtcaatacg 7200
 ggataatacc gcgccacata gcagaacttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc 7260
 ggggcgaaaa ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcg 7320
 tgcacccaac tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac 7380
 aggaaggcaa aatgcgcgaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat 7440
 actcttctt tttcaatatt attgaagcat ttatcagggg tattgtctca tgagcggata 7500
 catatttgaa tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa 7560
 agtgccacct gacgtc 7576

<210> 7
 <211> 7561
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

<400> 7

gacggatcgg gagatctccc gatccccctat ggtcgactct cagtacaato tgcctctgatg 60

cgcgatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgtttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtagcccc cctattgacg tcaatgaagg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggtttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatcga ctcactatag ggagacccaa gctggctaga 900
 ggtaccggat ctccacatgg agttggggct gagctgggtt ttccctcgtt ctcttttaag 960
 aggtgtccag tgtcaggagc agctgggtga gtctggggga ggctgtgtcc agcctgggag 1020
 gtccctgaga ctctcctgtg cagcgtctgg attcaccttc agtacctatg gcattgactg 1080
 ggtccgccag gctccaggca aggggctgga gtgggtggca gttacatggc atgatggaag 1140
 taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg ccgattcacc atctccagag acaactocaa 1200
 gaacacgctg tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggctg tgtattactg 1260
 tgcgagagga ggagtgggag caacttacta ctactactac ggtatggacg tctggggcca 1320
 agggaccacg gtcaccgctc cctcagcctc caccaagggc ccatcggctt tccccctggc 1380
 accctctagc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg ggctgcctgg tcaaggacta 1440
 cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc ctgaccagcg gcgtgcacac 1500
 cttcccggct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc agcagcgtgg tgaccgtgcc 1560
 ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg aatcacaagc ccagcaaac 1620
 caaggtggac aagagagttg gtgagaggcc agcacaggga gggagggtgt ctgctggaag 1680
 ccaggctcag cgctcctgcc tggacgcctc ccggtatgac agtcccagtc cagggcagca 1740
 aggcaggccc cgtctgcctc ttcacccgga ggcctctgcc cgcgccactc atgctcaggg 1800
 agagggtcct ctggcttttt cccaggctc tgggcaggca caggctaggt gccccctaacc 1860

caggccctgc acacaaaggg gcaggtgctg ggctcagacc tgccaagagc catatccggg 1920
 aggaccctgc ccctgaccta agcccacccc aaaggccaaa ctctccactc cctcagctcg 1980
 gacacottct ctctcccag attccagtaa ctcccaatct tctctctgca gagcccaaat 2040
 cttgtgacaa aactcacaca tgcccacogt gccaggtaa gccagcccag gctcgcct 2100
 ccagctcaag gcgggacagg tgccctagag tagcctgcat ccagggacag gcccagccg 2160
 ggtgctgaca cgtccacctc catctcttcc tcagcacctg aactcctggg gggaccgtca 2220
 gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctccggac ccctgaggtc 2280
 acatgcgtgg tgggtggacgt gagccaogaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 2340
 gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 2400
 taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 2460
 aagtgaagg tctccaacaa agccctccca gcccctatcg agaaaaaccat ctccaaagcc 2520
 aaaggtggga ccggtggggg gcgagggcca catggacaga ggccggctcg gccaccctc 2580
 tgccctgaga gtgaccgtg taccaacctc tgtccctaca gggcagcccc gagaaccaca 2640
 ggtgtacacc ctgcccccat ccggggagga gatgaaccaag aaccaggtca gctgacctg 2700
 cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctggag tgggagagca atgggcagcc 2760
 ggagaacaac tacaagacca cgcctccctg gctggactcc gacggctcct tcttctcta 2820
 tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aacgtcttct catgctcgt 2880
 gatgcatgag gctctgcaca accactaac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa 2940
 atgactcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgtgatca gcctcgactg tgccttctag 3000
 ttgccagcca tctgtgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac 3060
 tcccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 3120
 ttctattctg gggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag 3180
 caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg 3240
 ctctagggg tatccccacg cgcctgtag cggcgatta agcgcgcggt gtgtggtggt 3300
 tacgcgcagc gtgaccgcta caottgccag cgcctagcg ccgctcctt togtttctt 3360
 ccottcctt ctgcacagc togcgggtt tcccgtcaa gctctaaatc ggggcatccc 3420
 tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga 3480
 tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga cgttgagtc 3540
 cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggt 3600
 ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct 3660
 gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga 3720

aagtccccag	ggtccccagg	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	3780
aaccagggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	3840
caattagtc	gcaaccatag	tcccgcctct	aactccgccc	atcccgcctc	taactccgccc	3900
cagttccgccc	cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	tttattttatg	cagaggccga	3960
ggccgcctct	gcctctgagc	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	4020
cttttgcaaa	aagctcccg	gagcttgat	atccattttc	ggatctgac	agcacgtgat	4080
gaaaaagcct	gaactcaccg	cgacgtctgt	cgagaagttt	ctgatcgaaa	agttcgacag	4140
cgtctccgac	ctgatgcagc	tctcggaggg	cgaagaatct	cgtgctttca	gcttcgatgt	4200
aggagggcgt	ggatatgtcc	tgccggtaaa	tagctgcgcc	gatggtttct	acaaagatcg	4260
ttatgtttat	cggcactttg	catcgccgc	gctcccagatt	ccggaagtgc	ttgacattgg	4320
ggaattcagc	gagagcctga	cctattgcat	ctcccgcctg	gcacagggtg	tcacgttgca	4380
agacctgcct	gaaaccgaac	tgccgcctgt	tctgcagccg	gtcgcggagg	ccatggatgc	4440
gatcgtgcg	gccgatctta	gccagacgag	cgggttcggc	ccattcggac	cgcaagggaat	4500
cggtaataac	actacatggc	gtgatttcat	atgcgcgatt	gctgatcccc	atgtgtatca	4560
ctggcaaaact	gtgatggacg	acaccgtcag	tgcgtccgtc	gcgcaggctc	tcgatgagct	4620
gatgctttgg	gccgaggact	gccccgaagt	ccggcacctc	gtgcacgcgg	atttcggctc	4680
caacaatgtc	ctgacggaca	atggccgcat	aacagcggtc	attgactgga	gcgaggcgat	4740
gttcggggat	tcccataacg	aggtcgccaa	catcttcttc	tggaggccgt	ggttggttg	4800
tatggagcag	cagacgcgct	acttcgagcg	gaggcatccg	gagcttgag	gatcgcgcg	4860
gctccggggc	tatatgctcc	gcattggtct	tgaccaactc	tatcagagct	tggttgacgg	4920
caatttcgat	gatgcagctt	gggcgcaggg	tcgatgcgac	gcaatcgtcc	gatccggagc	4980
cgggactgtc	gggcgtacac	aaatcgcccc	cagaagcgcg	gccgtctgga	ccgatggctg	5040
tgtagaagta	ctcgcgcgata	gtggaaaccg	acgccccagc	actcgtccga	gggcaaagga	5100
atagcaogtg	ctacgagatt	tcgattccac	cgccgccttc	tatgaaaggt	tgggcttcgg	5160
aatcgttttc	cgggacgcgc	gctggatgat	cctccagcgc	ggggatctca	tgctggagtt	5220
cttcgcccac	occaaacttg	ttattgcagc	ttataatgg	tacaaataaa	gcaatagcat	5280
cacaaatttc	acaaataaag	catttttttc	actgcattct	agttgtgggt	tgtccaaact	5340
catcaatgta	tcttatcatg	tctgtatacc	gtcgacctct	agctagagct	tggcgtaatc	5400
atggatcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	acaattccac	acaacatacg	5460
agccggaagc	ataaagtgt	aagcctgggg	tgctaataga	gtgagctaac	tcacattaat	5520

tgcgttgccg tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg 5580
 aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcgggtt gcgtattggg cgctcttccg cttectcgct 5640
 cactgaactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gggcgagcgg gtatcagctc actcaaaggc 5700
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 5760
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 5820
 cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg 5880
 actataaaga taccaggcgt ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac 5940
 cctgccgctt accggatacc tgtcgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca 6000
 atgctcacgc ttaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt 6060
 gcacgaaccc ccggttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgatc 6120
 caaccgggta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag 6180
 agcgagggtat gtaggcgggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 6240
 tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 6300
 tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa 6360
 gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg 6420
 gtotgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggtt ttggtcata gattatcaaa 6480
 aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 6540
 atatgagtaa acttgggtotg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 6600
 gatctgtcta tttcgttcat ccatagttgc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 6660
 acgggagggc ttaccatctg gcccagtg cgcattgata cgcgcagacc cacgctcacc 6720
 ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggcc 6780
 tgcaacttta tccgcctcca tccagcttat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 6840
 ttgcgcagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg 6900
 ctgctgctt ggtaggtct cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 6960
 atccccatg ttgtgcaaaa aagcggtag ctcttcgggt cctccgatcg ttgtcagaag 7020
 taagttggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 7080
 catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga 7140
 atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgtea atacgggata atacgcgcgc 7200
 acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 7260
 aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgatc 7320
 ttcagcatct tttactttca ccagcgttcc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaatgc 7380

cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca 7440
 atattattga agcatttata agggttattg totcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 7500
 ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 7560
 c 7561

<210> 8
 <211> 6082
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

<400> 8

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaato tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgog atgtacgggc cagatatagc cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccataa gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc goctggcatt 540
 atgccagta catgacctta tgggacttcc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catgggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctaga 900
 aagcttggat ctccaccatga gggtcctgc tcagtcctg ggactcctgc tgctctggct 960
 ccagatacc agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt 1020
 aggagacaga gtcaccatca cttgccgggc gagtcagggc attagcaatt atttagcctg 1080
 gtatcagcag aaaacagggg aagttcctaa gttcctgac tatgaagcat ccactttgca 1140

atcaggggtc ccatctcggt tcagtggcgg tggatctggg acagatttca ctctcaccat 1200
 cagcagcctg cagcctgaag atgttgcaac ttattactgt caaaattata acagtgcccc 1260
 attcactttc ggccctggga ccaaagtggg tatcaaacga actgtggctg caccctctgt 1320
 cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgctagcg ttgtgtgcoct 1380
 gctgaataac ttctatccoa gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca 1440
 atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct 1500
 cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga 1560
 agtcacccat cagggcctga gctcgcccg cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta 1620
 ggaattcgcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gctcgcactg 1680
 tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg 1740
 aaggtgccac tcccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1800
 gtaggtgtca ttctattctg gggggtggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1860
 aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaagaa 1920
 ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatca agcgcggcgg 1980
 gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgcag cgccctagcg cccgctcctt 2040
 tcgctttctt cccttccttt ctgcgcagc tcgcggcctt tccccgtcaa gctctaaatc 2100
 ggggcatccc tttaggggtc cgatttagtg ctttaaggca cctcgacccc aaaaaacttg 2160
 attaggggtga tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggttttt cgcccttga 2220
 cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc 2280
 ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattgggtta 2340
 aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt 2400
 aggggtgtga aagtccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2460
 attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2520
 gcatgcatct caattagtea gcaaccatag tcccgccct aactccgccc atcccgcccc 2580
 taactccgac cagttccgac cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2640
 cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2700
 gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccg gagcttgtat atccatttcc ggatctgac 2760
 aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 2820
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 2880
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgccc ggttcttttt gtcaagaccg 2940
 acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 3000

cgacggggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgctac tgaagcggga agggactggc 3060
tgotattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct cctgccgaga 3120
aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3180
cattcgacca ccaagcgaac catcgcatcg agcgagcacg tactcggatg gaagccggtc 3240
ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3300
ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 3360
gcttgccgaa tatcatgggtg gaaaatggcc gctttttctg attcatcgac tgtggccggc 3420
tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac ccgtgatatt gctgaagagc 3480
ttggcggcga atgggctgac cgtttcctcg tgctttacgg tatcgccgct ccgatttcg 3540
agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc tggggttcga 3600
aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcaogagat ttcgattcca ccgcgcctt 3660
ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggaacgc ggctggatga tcctccagcg 3720
cggggatctc atgctggagt tcttcgccca ccccaacttg tttattgcag ottataatgg 3780
ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 3840
tagttgtggg ttgtccaaac tcataaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 3900
tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 3960
cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatt 4020
agtgaactaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccg gctttccagt cgggaaacct 4080
gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcc aacgcggggg agaggcgggt tgcgtattgg 4140
gcgctcttcc gcttctcgc tcactgaactc gctgcgctcg gctgttcggc tgcggcgagc 4200
ggatatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4260
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4320
ggcggttttt cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4380
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4440
cgtgcgctct cctgttcgga cctgcgctc taccggatac ctgtccgctt ttctccctc 4500
gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctgagttcgg tgtaggtcgt 4560
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag cccgaccgct gcgccttctc 4620
cggtaactat cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 4680
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 4740
gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 4800

agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4860
 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 4920
 tcctttgata ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 4980
 tttggtcatt agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaat aaaaatgaag 5040
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat 5100
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 5160
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 5220
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5280
 ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgctcc atccagtcta ttaattgttg 5340
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 5400
 tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca 5460
 acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggta gtccttcgg 5520
 tcctccgata gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcaatcatgg ttatggcagc 5580
 actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta 5640
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctott gcccggcgtc 5700
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5760
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 5820
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 5880
 aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 5940
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 6000
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc 6060
 ccgaaaagtg ccacctgacg tc 6082

<210> 9
 <211> 6082
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

<400> 9

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggctcgt gagtagtgcg 120

cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgacoga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgog atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgccatt gacgtcaata atgaogtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggg aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtaogccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggog 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900
 aagcttgat ctacccatga gggccccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctctgttt 960
 cccaggtgcc agatgtgaca tccagatgac ccagtctcca tcctcactgt ctgcatctgt 1020
 aggagacaga gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggc attaccaatt atttagcctg 1080
 gtttcagcag aaaccagga aagcccctaa gtcccttctc tatgctgcat ccagtttgca 1140
 aagtgggggc ccatcaaagt tcagcggcag tggatctggg acagatttca gtctcaccat 1200
 cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttattactgc caacagtata atagttaccc 1260
 gatcaccttc ggccaaggga cagactgga gattaaacga actgtggctg caccatctgt 1320
 cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgctagcg ttgtgtgcct 1380
 gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtgata acgccctoca 1440
 atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct 1500
 cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaagctct acgcctgcga 1560
 agtcacccat cagggcctga gctcgcccg cacaagagc ttcaacaggg gagagtgtta 1620
 ggaattcgog gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgactg 1680
 tgccctctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc ogtgccttcc ttgacctgg 1740
 aagggtgccac tcccactgtc ctttcctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1800
 gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1860
 aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa 1920

ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg 1980
 gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta caattgccag cgccctagcg cccgctcctt 2040
 tcgctttctt ccttcctttt ctgcgcacgt tcgcgggctt tccccgtcaa gctctaaato 2100
 ggggcacccc tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 2160
 attaggggtga tgggtcacgt agtggggccat cgccctgata gacgggtttt cgccctttga 2220
 cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tottgttcca aactggaaca aactcaacc 2280
 ctatctoggt ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tattggtaa 2340
 aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt 2400
 aggggtgtgga aagtcaccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2460
 attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2520
 gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgcctt aaactccgcc atcccgcccc 2580
 taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2640
 cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2700
 gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccg gagcttgat atccattttt ggatctgatc 2760
 aagagacagg atgaggatcg ttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 2820
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggtgct 2880
 ctgatgccgc cgtgttcggc ctgtcagcgc aggggcgccc gggtcttttt gtcaagaccg 2940
 acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg tggctggcca 3000
 cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga agggactggc 3060
 tgcatttggg cgaagtgcg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgc cctgccgaga 3120
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgcc 3180
 cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagacagc tactcggatg gaagccggtc 3240
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3300
 ccaggctcaa ggcgcgcag cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcot 3360
 gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 3420
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt gctgaagagc 3480
 ttggcggoga atgggctgac cgcttctctg tgctttacgg tatcgccgct cccgattcgc 3540
 agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttctctg agcgggactc tggggttcga 3600
 aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttgattcca ccgcgcctt 3660
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggcgggatga tcctocagcg 3720
 cggggatctc atgctggagt tcttcgccc ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 3780

ttacaaataa agcaatagca tcacaaatth cacaataaaa gcattttttt cactgcattc 3840
 tagttgtggt ttgtccaaac toatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 3900
 tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 3960
 cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaattg 4020
 agtgagctaa ctacacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct 4080
 gtctgcccag ctgcattaat gaatcgcca acgcgcggg agaggcggtt tgcgtattgg 4140
 gcgctcttcc gcttccctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtctgttcggc tgcggcgagc 4200
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4260
 aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4320
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4380
 gaggtggcga aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4440
 cgtgcgctct cctgttccga cctgcgcgt taccgatac ctgtccgcct ttctcccttc 4500
 gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcac ctgtaggtat ctgagttcgg ttaggtcgt 4560
 tgcctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc cccggttcag ccgcaccgt gcgccttctc 4620
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccggg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 4680
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg 4740
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgcgaagcc 4800
 agttacottc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4860
 cgggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 4920
 tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaagggat 4980
 tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc ctttttaaatt aaaaatgaag 5040
 ttttaaatac atctaaagta tataatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat 5100
 cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc 5160
 cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat 5220
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga ttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5280
 ggccgagcgc agaagtggc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg 5340
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacggtt ttgccattgc 5400
 tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggatgggt tcattcagct ccggttccca 5460
 acgatcaagg cgagttacat gatccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg 5520
 tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtggtt tcaactcatg ttatggcagc 5580

actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta 5640
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 5700
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5760
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 5820
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcacc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 5880
 aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa ggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 5940
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 6000
 cggatacata ttggaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc 6060
 ccgaaaagtg ccacctgacg tc 6082

<210> 10
 <211> 6082
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

10 <400> 10

gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600
 tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
 actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc 720
 aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg 780
 gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
 ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga 900

aagcttggat ctcaccatga gggtcocctgc tcagctcctg gggctcctgc tgcctctgtt 960
cccaggtgcc agatgtgaca tccagatgac ccagctctca tctcactgt ctgcatctgt 1020
aggagacaga gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggc attagccatt atttagcctg 1080
gtttcagcag aaaccaggga aagccocctaa gtccctgac tatgctgcat ccagtttgca 1140
aagtggggtc ccatcaaagt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat 1200
cagcagccta cagcctgaag attttgcaac ttattactgc caacagtata atagtttccc 1260
gtcactttc ggccggaggga ccaaggtgga gatcaaacga actgtggctg caccatctgt 1320
cttcacttcc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgctagcg ttgtgtgcct 1380
gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca 1440
atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct 1500
cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga 1560
agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta 1620
ggaattcgcg gccgctcgag tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgactg 1680
tgccctctag ttgccagcca tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg 1740
aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaataaaaatgagga aattgcatcg cattgtctga 1800
gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg 1860
aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa 1920
ccagctgggg ctctaggggg tatccccacg cgcctgtag cggcgcatca agcgcggcgg 1980
gtgtgggtgt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccttagcg ccgctcctt 2040
tcgctttctt ccttccctt ctgcacagct tcgcggctt tcccgtcaa gctctaaatc 2100
ggggcatccc tttaggggtc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 2160
attaggtgta tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgccttttga 2220
cgttgagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc 2280
ctatctcggt ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggc tattgggtta 2340
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt 2400
aggggtgtgga aagtcaccag gctcccccag caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca 2460
attagtcagc aaccagggtg ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa 2520
gcatgcatct caattagtca gcaaccatag tcccgccct aactcggccc atcccgcccc 2580
taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg 2640
cagaggccga ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg 2700

gaggcctagg cttttgcaaa aagctcccgg gagcttgat atccatttgc ggatctgac 2760
 aagagacagg atgaggatcg ttctgcatga ttgaacaaga tggattgcac gcaggttctc 2820
 cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca atcggctgct 2880
 ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggggccgc ggttcttttt gtcaagaccg 2940
 acctgtccgg tgccctgaat gaactgcagg acgaggcagc ggggctatcg tggctggcca 3000
 cgacgggctg tccttgccga gctgtgctcg acgttgtaac tgaagcggga agggactggc 3060
 tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcacc tcacctgct cctgcgaga 3120
 aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg gctacctgc 3180
 cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcagcagc tactcggatg gaagccggtc 3240
 ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc gaactgttcg 3300
 ccaggctcaa ggcgcgcagc cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat ggcgatgcct 3360
 gcttgccgaa tatcatgggt gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac tgtggccggc 3420
 tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac cgtgatatt gctgaagagc 3480
 ttggcggcga atgggctgac cgttctctcg tgctttacgg tatcgccgct ccgattcgc 3540
 agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttctctcg agcgggactc tggggttcga 3600
 aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca ccgcgcctt 3660
 ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt cggggacgcc ggctggatga tctccagcg 3720
 cggggatctc atgctggagt tcttggccca ccccaacttg tttattgcag cttataatgg 3780
 ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataaa gcattttttt cactgcattc 3840
 tagttgtggg ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat gtctgtatac cgtcgacctc 3900
 tagctagagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gttatccgct 3960
 cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg gtgcctaatt 4020
 agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctactgccc gctttccagt cgggaaacct 4080
 gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcgggt tgcgtattgg 4140
 gcgctcttc gcttctctgc tcaactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4200
 ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4260
 aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4320
 ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4380
 gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4440
 cgtgcgctct cctgttccga ccctgcgct tactcggatac ctgtccgct ttctcccttc 4500
 gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcaattcgg ttaggtcgt 4560

tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct ggccttatac 4620
 cggtaactat cgtcttgagt ccaaccoggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 4680
 cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tottgaagtg 4740
 gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 4800
 agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 4860
 cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 4920
 tcctttgatc tttctacgg ggtctgacgc tcagtggaaac gaaaactcac gtttaagggat 4980
 tttggctcatg agattatcaa aaaggatott caoctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 5040
 ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctc gacagttaac aatgcttaat 5100
 cagtgaaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgaactccc 5160
 cgtcgtgtag ataactaoga tacgggaggg cttaccatct ggcccagtg ctgcaatgat 5220
 accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag 5280
 ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg 5340
 ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc 5400
 tacaggcacc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtaggct tcattcagct ccggttccca 5460
 acgatcaagg cgagttacat gatcccccac gttgtgcaaa aaagcggtta gctccttcgg 5520
 tcctccgacg gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgta tcactcatgg ttatggcagc 5580
 actgcataat tctcttactg tcatgccacc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta 5640
 ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc 5700
 aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg 5760
 ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc 5820
 cactcgtgca cccaactgat cttcagcacc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc 5880
 aaaaacagga aggcataatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatgttgaat 5940
 actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag 6000
 cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttcgc gcacatttcc 6060
 ccgaaaagtg ccacctgacg tc 6082

<210> 11
 <211> 6085
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

<400> 11

gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg	60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg	120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc	180
ttagggtttag gcgttttgcg ctgcttcgog atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt	240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata	300
tggagttccg cgttacataa ottacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc	360
cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccaata gggactttcc	420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt	480
atcatatgcc aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt	540
atgccagta catgaacctt tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca	600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga	900
aagcttggat ctccacatga gggccccgc tcagcttctc ttccttctgc tactctggct	960
cccagatacc actggaggaa tagtgatgac gcagtctcca gccaccctgt ctgtgtctcc	1020
aggggaaaga gccaccctct cctgcaggac cagtcagagt attggctgga acttagcctg	1080
gtaccaacag aaacctggcc aggcctccag gctcctcatc tatgggtgcat cttccaggac	1140
cactggtatc ccagccaggt tcagtggcag tgggtctggg acagagttca ctctcaccat	1200
cagcagcctg cagtctgaag attctgcagt ttattactgt cagcattatg ataactggcc	1260
catgtgcagt tttggccagg ggaccgagct ggagatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc	1320
tgtcttcac cctccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcta gcgttgtgtg	1380
cctgctgaat aactctatc ccagagaggg caaagtacag tggaagggtg ataacgccct	1440
ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag	1500
cctcagcagc acctgaacg tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg	1560
cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg	1620
ttaggaattc gcggccgctc gagtctagag ggcccgttta aaccgcgtga tcagcctcga	1680

ctgtgccttc tagttgccag ccattctgttg tttgcccctc ccccggtgcct tccttgaccc	1740
tggaaggtgc cactcccact gtcccttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc	1800
tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca ggacagcaag ggggaggatt	1860
gggaagacaa tagcaggcat gctgggggatg cgggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa	1920
gaaccagctg gggctctagg gggatatccc acgcgccctg tagcggcgca ttaagcgcg	1980
cgggtgtggt gggtacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgcccgtc	2040
ctttcgcttt ctcccttcc tttctcgcca cgttcgccgg ctttcccgt caagctctaa	2100
atcggggcat cccttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac cccaaaaaac	2160
ttgattaggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagaagggt tttcgccctt	2220
tgacgttga gtccacgttc tttaatagtg gactcttggt ccaaaactga acaacactca	2280
accctatctc ggtctattct tttgatttat aagggtttt ggggatttcg gcctattggt	2340
taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaatta attctgtgga atgtgtgtca	2400
gtaggggtgt ggaaagtccc caggctcccc aggcaggcag aagtatgcaa agcatgcac	2460
tcaattagtc agcaaccagg tgtggaaagt cccaggtc cccagcaggc agaagtatgc	2520
aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca tagtcccgcc cctaactccg cccatccgc	2580
ccctaactcc gccagttcc gccattctc cgcccatgg ctgactaatt ttttttattt	2640
atgcagaggc cgaggccgcc tctgcctctg agctattcca gaagtagtga ggaggctttt	2700
ttggaggcct aggccttttgc aaaaagctcc cgggagcttg tatatccatt ttcggatctg	2760
atcaagagac aggatgaggä togtttcgca tgattgaaca agatggattg cacgcagggt	2820
ctccggccgc ttgggtggag aggcatttcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct	2880
gctctgatgc cgcgtgttc cggctgtcag cgcagggggc cccggttctt tttgtcaaga	2940
ccgacctgtc cgggtgcctg aatgaactgc aggaagaggc agcgcggcta tcgtggctgg	3000
ccacgacggg cgttccttgc gcagctgtgc togacgttgt cactgaagcg ggaagggact	3060
ggctgctatt gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg	3120
agaaagtatc catcatggct gatgcaatgc ggcgggtgca tacgcttgat ccggctacct	3180
gccattoga ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcg atggaagccg	3240
gtcttgctga tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt	3300
tcgccaggct caaggcgcgc atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg	3360
cctgcttgcc gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc	3420
ggctgggtgt ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccgtgat attgctgaag	3480

agcttgggcg cgaatgggct gaccgcttcc tegtgttta cggtatcgcc gctcccgatt 3540
 cgcagcgcac cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgagcggga ctctgggggt 3600
 cgaaatgacc gaccaagcga cgcaccaact gccatcacga gatttcgatt ccaccgcgc 3660
 cttctatgaa aggttgggct tcggaatcgt tttccgggac gccggctgga tgatctcca 3720
 gcgcggggat ctcatgctgg agttcttgc ccacccaac ttgtttattg cagcttataa 3780
 tggttacaaa taaagcaata gcacacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 3840
 ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtctgta taccgtcgac 3900
 ctctagctag agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 3960
 gctcacaatt ccacacaaca taagagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 4020
 atgagtgagc taactcacat taattgogtt gcgctcactg ccgctttcc agtcgggaaa 4080
 cctgtogtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 4140
 tgggcgctct tccgcttcc cgcctcactga ctgcctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg 4200
 agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4260
 aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagc aacgtaaaa aggcgcggtt 4320
 gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgtcaag 4380
 tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 4440
 cctogtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttacggga tacctgtccg ctttctccc 4500
 ttccgggaagc gtggcggttt ctcaatgctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt 4560
 cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccggtt cagcccgacc gctgcgcctt 4620
 atccggtaac tatcgtcttg agtccaacce ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 4680
 agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtagge ggtgctacag agttcttgaa 4740
 gtgggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa 4800
 gccagttacc ttccgaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg 4860
 tagcggtggt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaag gatctcaaga 4920
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 4980
 gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 5040
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt 5100
 aatcagttag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 5160
 ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgtgcaat 5220
 gataccgca gacccaogct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5280
 aaggcccgag cgcagaagtg gtcctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 5340

ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat 5400
 tgctacaggo atogtgggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctcgggttc 5460
 ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttgtgc aaaaaagcgg ttagctcctt 5520
 cggctcctcg atogttgtca gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcaactca tggttatggc 5580
 agcactgcat aattctotta ctgtcatgcc atcogtaaga tgcttttctg tgactgggtga 5640
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc 5700
 gtcaatacgg gataatacog cgccacatag cagaacttta aaagtgtcga tcattggaaa 5760
 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta 5820
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 5880
 agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg 5940
 aatactcata ctcttctttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcaggggtt attgtctcat 6000
 gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 6060
 tccccgaaaa gtgccacctg acgtc 6085

<210> 12
 <211> 6097
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Plásmido

10 <400> 12

gacggatcgg gagatctccc gatccoctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
 ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
 cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
 ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatagc cgttgacatt 240
 gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata 300
 tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
 ccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
 attgacgtca atgggtggac tatttacgggt aaactgocca cttggcagta catcaagtgt 480
 atcatatgcc aagtaacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
 atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca 600

tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg	660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc	720
aaaatcaacg ggaactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg caaatgggcg	780
gtaggcgtgt acgggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca	840
ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga	900
aagcttggtat ctacccatga gggtccttgc tcagctcctg gggctgctaa tgctctggat	960
acctggatcc agtgcagata ttgtgatgac ccagactcca ctctctctgt ccgtcacccc	1020
tggacagccg gcctccatct cctgcaagtc tagtcagagc ctctgcata gtgatggaaa	1080
gacctttttg tatttggtatc tgcagaagcc aggccagcct ccacagctcc tgatctatga	1140
ggtttccaac cggttctctg gagtgccaga taggttcagt ggcagcgggt cagggacaga	1200
tttcacactg aaaatcagcc ggggtggagc tgaggatgtt gggctttatt actgcatgca	1260
aagtatacag cttccgctca ctttcggcgg agggaccaag gtggagatca aacgaactgt	1320
ggctgcacca tctgtcttca tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc	1380
tagcgttggtg tgccctgctga ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaagt	1440
ggataacgcc ctccaatcgg gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga	1500
cagcacctac agcctcagca gcacctgac gctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa	1560
agtctacgcc tgcgaagtca cccatcaggg cctgagctcg ccggtcacaa agagcttcaa	1620
caggggagag tgtaggaat tcgcggccgc tcgagcttag agggcccgtt taaacccgct	1680
gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccgtgc	1740
cttctttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg	1800
catcgcatthg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca	1860
agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgctgggga tgcggtgggc tctatggctt	1920
ctgaggcggg aagaaccagc tggggctcta gggggtatcc ccaogcgccc tgtagcggcg	1980
cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgc	2040
tagcgcgcgc tcttttcgct ttcttccctt cctttctcgc cactttcgcc ggctttcccc	2100
gtcaagctct aaatcggggc atcccttttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg	2160
acccccaaaa acttgattag ggtgatgggt cactgtagtg gccatcgccc tgatagacgg	2220
tttttcgccc tttagcgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg	2280
gaacaacact caaccctatc togggtotatt cttttgattt ataagggtt ttggggattt	2340
cggcctattg gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgogaat taattctgtg	2400
gaatgtgtgt cagttagggg gtggaaagtc ccaggctcc ccaggcaggc agaagtatgc	2460

aaagcatgca tctcaattag tcagcaacca ggtgtggaaa gtccccaggc tccccagcag 2520
 gcagaagtat gcaaagcatg catctcaatt agtcagcaac catagtcccg cccctaactc 2580
 cgcccatccc gccctaact ccgcccagtt ccgcccattc tccgccccat ggctgactaa 2640
 ttttttttat ttatgcagag gccgaggccg cctctgcctc tgagctattc cagaagtagt 2700
 gaggaggcctt ttttggaggc ctaggccttt gcaaaaagct cccgggagct tgtatatcca 2760
 ttttcggatc tgatcaagag acaggatgag gatcgtttcg catgattgaa caagatggat 2820
 tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac 2880
 agacaatcgg ctgctctgat gccgccgtgt tccggtgtc agcgcagggg cggccggttc 2940
 tttttgtcaa gaccgacctg tccggtgccc tgaatgaact gcaggacgag gcagcgcggc 3000
 tatcgtggct ggccacgacg gcggttcctt gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag 3060
 cgggaaggga ctggctgcta ttgggcgaag tgccggggca ggatctcctg tcatctcacc 3120
 ttgctcctgc cgagaaagta tccatcatgg ctgatgcaat gcggcggtcg catacgcttg 3180
 atccggctac ctgcccattc gaccaccaag cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc 3240
 ggatggaagc cggctcttgc gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcgc 3300
 cagccgaact gttcgccagg ctcaaggcgc gcatgccga cggcgaggat ctcgctcgtga 3360
 cccatggcga tgcttgettg ccgaatatca tgggtggaaa tggccgcttt tctggattca 3420
 tcgactgtgg ccggtcgggt gtggcgacc gctatcagga catagcgttg gctaccctg 3480
 atattgctga agagcttggc ggcgaaatgg ctgaccgctt cctcgtgctt tacggtatcg 3540
 ccgctccga ttgcgagcgc atcgcttct atcgcttct tgacgagttc ttctgagcgg 3600
 gactctgggg ttcgaaatga ccgaccaagc gacgccaac ctgccatcac gagatttcga 3660
 ttccaccgcc gccttctatg aaagggttgg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg 3720
 gatgatctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttcttc gcccaacca acttgtttat 3780
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 3840
 tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcact aatgtatctt atcatgtctg 3900
 tataccgtcg acctctagct agagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg 3960
 aaattgttat ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc 4020
 ctgggggtgc taatgagtga gctaactcac attaatgctg ttgcgctcac tggccgcttt 4080
 ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg 4140
 cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc gctcggctcgt 4200
 tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat ccacagaatc 4260

```

aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa 4320
aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgaagagc atcacaaaaa 4380
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc 4440
ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt toogaccctg ccgcttaccg gatacctgtc 4500
cgccctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcaatgc tcacgctgta ggtatctcag 4560
ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccgga 4620
ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaaagc acgacttatc 4680
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac 4740
agagttcttg aagtgggtgc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat ttggtatctg 4800
cgctctgtg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggg agctcttgat ccggcaaaca 4860
aaccacccgt ggtagcgggt gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa 4920
aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa 4980
ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt 5040
aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt ggtctgacag 5100
ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctacgcgctc tgtctatttc gttcatccat 5160
agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc 5220
cagtgtgca atgataccgc gagacccacg ctacccggct ccagatttat cagcaataaa 5280
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggctctgca actttatccg cctccatcca 5340
gtctattaat tggtgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa 5400
cgttggttgc attgctacag gcatcgtggg gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt 5460
cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc 5520
ggttagctoc ttcggtcttc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact 5580
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccacccgtaa gatgcttttc 5640
tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg 5700
ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct 5760
catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc 5820
cagttcgatg taaccactc gtgcacocaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag 5880
cgttttotggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa taaggcgac 5940
acggaaatgt tgaatactca tactcttctt ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg 6000
ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt 6060
tccgcgcaca tttcccggaa aagtgcaccc tgacgtc 6097

```

<211> 6094
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Plásmido

<400> 13

```

gacggatcgg gagatctccc gatccoctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg      60
ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtggt ggaggctcgt gagtagtgcg      120
cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gottgacoga caattgcatg aagaatctgc      180
ttagggttag gcgttttgcg ctgcttcgog atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt      240
gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacgggggc attagttcat agcccatata      300
tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccggc tggctgaccg cccaacgacc      360
cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc      420
attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt      480
atcatatgcc aagtagccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt      540
atgccagta catgacctta tgggaacttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca      600
tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg      660
actcacgggg atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc      720
aaaatcaacg ggactttcca aaatgtogta acaactccgc ccattgacg caaatgggcy      780
gtaggcgtgt acgggtggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaaccca      840
ctgcttactg gcttatogaa attaatacga ctactatag ggagacccaa gctggctaga      900
aagcttggat ctcccatgg tgttgacagc ccaggtcttc atttctctgt tactctggat      960
ctctggtgcc tacggggaca tcgtgatgac ccagtctcca gactccctgg ctgtgtctct     1020
gggcgagagg gccaccatca actgcaagtc caaccagagt gtcttacaca gctccaacaa     1080
taagaactat ttagcttggg accagcagaa accaggacag cctcctaaat tgctcattta     1140
ttgggcatte ctccgggaat cgggggtecc tgaccgcttc agtggcagcg ggtctgggac     1200
agatttcact ctcccatca gcagcctgca ggotgaagat gtggcagttt attactgtca     1260
ccaatattat totactttat atactttcgg cggagggacc aaggtagaga tcaaacgaac     1320
ygtggctgca ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac     1380
    
```

10

15

tgctagcgtt	gtgtgcctgc	tgaataactt	ctatcccaga	gaggccaaag	tacagtggaa	1440
ggtggataac	gccctccaat	cgggtaactc	ccaggagagt	gtcacagagc	aggacagcaa	1500
ggacagcacc	tacagcctca	gcagcacccct	gacgctgagc	aaagcagact	acgagaaaca	1560
caaagtctac	gcctgcgaag	tcacccoatca	gggcctgagc	tcgcccgtca	caaagagctt	1620
caacagggga	gagtgttagg	cggccgctcg	agtctagagg	gcccgtttta	acccgctgat	1680
cagcctcgac	tgtgccttct	agttgccagc	catctgttgt	ttgcccctcc	cccgtgcctt	1740
ccttgacccct	ggaagggtgc	actcccactg	tcctttccta	ataaaatgag	gaaattgcat	1800
cgcattgtct	gagtaggtgt	cattctattc	tgggggggtg	ggtggggcag	gacagcaagg	1860
gggaggattg	ggaagacaat	agcaggcatg	ctggggatgc	ggtgggctct	atggcttctg	1920
aggcggaaag	aaccagctgg	ggctctaggg	ggtatcccca	cggccctgtg	agcggcgcac	1980
taagcgcggc	gggtgtggtg	gttacgcgca	gcgtgaccgc	tacacttgcc	agcgccttag	2040
cgcgcctctc	tttcgctttc	ttcccttctc	ttctcgccac	gttcgcgggc	tttcccgcgc	2100
aagctctaaa	tcggggcatc	cctttagggt	tccgatttag	tgctttacgg	cacctcgacc	2160
ccaaaaaact	tgattagggg	gatggttcac	gtagtggggc	atcgccctga	tagacggttt	2220
ttcgcccttt	gacgttgagg	tcacagttct	ttaatagtgg	actcttggtc	caaactggaa	2280
caacactcaa	ccctatctcg	gtctattctt	ttgatttata	agggattttg	gggatttcgg	2340
cctattgggt	aaaaaatgag	ctgatttaac	aaaaatttaa	cgcgaattaa	ttctgtggaa	2400
tgtgtgtcag	ttaggggtgt	gaaagtcccc	aggctcccca	ggcaggcaga	agtatgcaaa	2460
gcatgcatct	caattagtca	gcaaccagg	gtggaaagtc	cccaggctcc	ccagcaggca	2520
gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccat	agtcccgcgc	ctaactccgc	2580
ccatcccgc	cctaactccg	cccagttccg	ccatttctcc	gccccatggc	tgactaattt	2640
tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	ctgcctctga	gctattccag	aagtagtgag	2700
gaggcttttt	tggaggccta	ggcttttgca	aaaagctccc	gggagcttgt	atatccattt	2760
tcggatctga	tcaagagaca	ggatgaggat	cgtttcgcat	gattgaacaa	gatggattgc	2820
acgcagggtc	tcggcccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	2880
caatoggctg	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcagggggcg	ccggttcttt	2940
ttgtcaagac	cgacctgtcc	ggtgccctga	atgaactgca	ggacgaggca	gcgaggctat	3000
cgtggctggc	cacgacgggc	gttccttgcg	cagctgtgct	cgacgttgtc	actgaagcgg	3060
gaagggactg	gctgctattg	ggcgaagtgc	cggggcagga	tctcctgtca	tctcaccttg	3120
ctcctgcccga	gaaagtatcc	atcatggctg	atgcaatgcg	gcggctgcat	acgcttgatc	3180
cggctaactg	cccattcgac	caccaagcga	aacatcgcat	cgagcgagca	cgtaactcga	3240

tggaagccgg tcttgatgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgcgcag 3300
 ccgaactgtt cgcagggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgaggatctc gtgctgaccc 3360
 atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg 3420
 actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata 3480
 ttgctgaaga gcttgccggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg 3540
 ctcccgatcc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgagcgggac 3600
 tctggggttc gaaatgaccg accaagcgac gcccaacctg ccatcacgag atttcgattc 3660
 caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggtgggat 3720
 gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccocaaact tgtttattgc 3780
 agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcaacaata aagcattttt 3840
 ttcaactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttata atgtctgtat 3900
 accgtcgacc tctagctaga gcttggcgta atcatggtca tagctgtttc ctgtgtgaaa 3960
 ttgttatccg ctcaaatcc cacacaacat acgagccgga agcataaagt gtaaagcctg 4020
 ggggtgcctaa tgagttagct aactcacatt aattgcgttg cgtcactgc ccgctttcca 4080
 gtgcggaaac ctgtcgtgcc agctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagagggcg 4140
 tttgcgtatt gggcgtctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgttcg 4200
 gctgcggcga gcgttatcag ctcaactcaa ggccgtaata cggttatcca cagaatcagg 4260
 ggataacgca ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa 4320
 ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc aaaaaaatcg 4380
 acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc 4440
 tggaagctcc ctgctgcgct ctctgttcc gacctgccc cttaaccgat acctgtccgc 4500
 ctttctccct tcgggaagcg tggcgctttc tcaatgctca cgtgtaggt atctcagttc 4560
 ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa cccccgttc agcccgacgg 4620
 ctgcgcctta tccggttaact atcgtcttga gtccaacccg gtaagacacg acttatcgcc 4680
 actggcagca gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggag gtgctacaga 4740
 gttcttgaag tgggtgccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtatctgcgc 4800
 tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tottgatccg gcaaacaaac 4860
 caccgctggt agcgttggtt tttttgtttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg 4920
 atctcaagaa gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc 4980
 acgttaaggg attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa 5040

ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta 5100
 ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt 5160
 tgccctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag 5220
 tgotgcaatg ataccgagag acccacgctc accgggtcca gatttatcag caataaacca 5280
 gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgcct ccattccagtc 5340
 tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt 5400
 tggttgccatt gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag 5460
 ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttggtgca aaaaagcggc 5520
 tagctccttc ggtcctccga tcgttgctcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcaatcat 5580
 gggttatggca gcactgcata attctcttac tgctatgcca tccgtaagat gcttttctgt 5640
 gactggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagtgat atgcggcgac cgagttgctc 5700
 ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat 5760
 cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag 5820
 ttcgatgtaa cccactcgtg caccctaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt 5880
 ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg 5940
 gaaatgttga atactcatac tcttctcttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta 6000
 ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaataaa taggggttcc 6060
 gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctga cgtc 6094

<210> 14

5 <211> 481

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NheI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 14

ggatctcacc atggagttgg gactgcgctg gggcttcctc gttgctcttt taagaggtgt 60
 ccagtgtcag gtgcaattgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct 120
 gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcgc cttcagtaga tatggcatgc actgggtccg 180
 ccaggtccca ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tggtatgatg gaagtaataa 240
 atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac 300

15

gcagtatctg caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag 360
 aggcgggtgac ttctcttaact actactatta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac 420
 ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctag 480
 c 481

5 <210> 15
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

10

15 <210> 16
 <211> 463
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

20 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NbeI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 16

ggatctcacc atgaggggtcc ctgctcagct cctgggactc ctgctgctct ggctcccaga 60
taccagatgt gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga 120
cagagtcacc atcacttgcc gggcgagtc gggcattagc aattatttag cctgggtatca 180
gcagaaaaca gggaaagtcc ctaagttcct gatctatgaa gcattocactt tgcaatcagg 240
ggctcccatct cgggttcagt ggggtggatc tgggacagat ttcaactotca ccatcagcag 300
cctgcagcct gaagatgttg caacttatta ctgtcaaaat tataacagt gcccattcac 360
tttcggccct gggaccaaag tggatatcaa acgaactgtg gctgcaccct ctgtcttcat 420
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgct agc 463

<210> 17
<211> 127
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18
<211> 508
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

<223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NbeI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 18
 ggatctcacc atgggggtcaa ccgccatcct caccatggag ttggggctgc gctgggttct 60
 cctcgttgct cttttaagag gtgtccagtg tcaggtgcag ctggtggagt ctgggggagg 120
 cgtggtccag cctgggaggt ccctgagact ctctgtgca gcgtctggat tcacottcag 180
 taactatgtc atgcactggg tccgccaggc tccaggcaag gggctggagt ggggtggcaat 240
 tatatggtat gatggaagta ataaatacta tgcagactcc gtgaagggcc gattcaccat 300
 ctccagagac aattccaaga acacgtgta tctgcaaatg aacagcctga gagccgagga 360
 cacggctgtg tattactgtg cgggtggata taactggaac tacgagtacc actactacgg 420
 tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc 480
 atcgggtcttc cccctggcac cctctagc 508

<210> 19
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Met Glu Leu Gly Leu Arg Trp Val Leu Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Asn Tyr Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Tyr Glu Tyr His Tyr Tyr
 115 120 125
 Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

<210> 20
 <211> 463

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

- 5 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NbeI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 20

```

ggatctcacc atgaggggtcc ccgctcagct cctgggggtc ctgctgctct gtttcccagg      60
tgccagatgt gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga      120
cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtc gggcattacc aattatttag cctgggtttca      180
gcagaaacca gggaaagccc ctaagtccct tatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg      240
ggccccatca aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcagttctca ccatcagcag      300
cctgcagcct gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt acccgatcac      360
cttcggccaa gggacacgac tggagattaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat      420
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgct agc                        463

```

10

<210> 21
<211> 127
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens

<400> 21

```

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Pro
1              5              10              15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
                20              25              30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
                35              40              45

Ile Thr Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
                50              55              60

Lys Ser Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65              70              75              80

Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile Ser
                85              90              95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn

```

		100		105		110	
	Ser Tyr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys						
		115		120		125	
5	<210> 22 <211> 490 <212> ADN <213> Secuencia Artificial <220>						
10	<223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NbeI (pesado) o NheI (ligero)						
	<400> 22						
	ggatctcacc atggagttgg gacttagctg ggttttcctc gttgctcttt taagaggtgt					60	
	ccagtgtcag gtccagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct					120	
	gagactctcc tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtagc tatggcatgc actgggtccg					180	
	ccaggctcca ggcaaggggc tggactgggt ggcaattatt tggcatgatg gaagtaataa					240	
	atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaagac					300	
	gctgtacctg caaatgaaca gtttgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag					360	
	agcttggggc tatgactacg gtgactatga atactacttc ggtatggacg tctggggcca					420	
	agggaccacg gtcaccgtct cctcagcctc caccaagggc ccatcggtct tccccctggc					480	
15	accctctagc					490	
	<210> 23 <211> 145 <212> PRT <213> Homo sapiens						
20	<400> 23						
	Met Glu Leu Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly						
	1 5 10 15						
	Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln						
	20 25 30						
	Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe						
	35 40 45						
	Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu						
	50 55 60						

Asp Trp Val Ala Ile Ile Trp His Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Lys
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Trp Ala Tyr Asp Tyr Gly Asp Tyr Glu Tyr
115 120 125

Tyr Phe Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser
145

- 5 <210> 24
<211> 463
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 10 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NheI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 24

ggatctcacc atgaggggtcc ctgctcagct cctgggggtc ctgctgctct gtttcccagg 60

tgccagatgt gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga 120

cagagtcacc atcacttgct gggcgagtc gggcattagc cattatttag cotggtttca 180

gcagaaacca gggaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg 240

ggtcccatca aagttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaacttca ccatcagcag 300

cctacagcct gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt tcccgctcac 360

tttcggcgga gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat 420

cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgct agc 463

- 15 <210> 25
<211> 127
<212> PRT
20 <213> Homo sapiens
<400> 25

Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Pro

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

<210> 26
 <211> 469
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NbeI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 26

ggatcccacc atgggggtcaa ccgtcatcct cgcctctctc ctggctgttc tccaaggagt	60
ctgtgccgag gtgcagctgg tgcagtctgg agcagaggtg aaaaagcccg gggagtctct	120
gaagatctcc tgtaagggtt ctggatacag ctttaccagt tactggatcg gctgggtgcg	180
ccagatgccc gggaaaggcc tggagtggat ggggatcatc tatcctggtg actotgatac	240
cagatacagc ccgtccttcc aaggccaggt caccatctca gccgacaagt ccatcagcac	300
cgcctacctg cagtggagca gcctgaaggc ctgggacacc gccatgtatt actgtgcgag	360
acggatggca gcagctggcc cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc	420
ctcagcctcc accaaggggcc catcggtctt cccctgggca ccctctagc	469

<210> 27
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
Met Gly Ser Thr Val Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly
1 5 10 15
Val Cys Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30
Pro Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe
35 40 45
Thr Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser
65 70 75 80
Pro Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser
85 90 95
Thr Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met
100 105 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Met Ala Ala Ala Gly Pro Phe Asp Tyr Trp
115 120 125
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 28
5 <211> 466
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

10 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NbeI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 28
ggatctcacc atgaggggtcc ccgctcagct tctcttcctt ctgctactct ggctcccaga 60
taccactgga ggaatagtga tgacgcagtc tccagccaac ctgtctgtgt ctccagggga 120
aagagccacc ctctcctgca ggaccagtca gagtattggc tggaacttag cctggtaacca 180
acagaaacct ggccaggctc ccaggctcct catctatggc gcatcttcca ggaccactgg 240
tatcccagcc aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttactctca ccatcagcag 300
cctgcagtct gaagattctg cagtttatta ctgtcagcat tatgataact ggcccatgtg 360
cagttttggc caggggaccg agctggagat caaacgaact gtggctgcac catctgtctt 420
catcttcccc ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gctagc 466

15 <210> 29
<211> 128

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

5

```

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

```

<210> 30
<211> 487
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>

10

15 <223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglIII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme por clonación 3'XbaI/NheI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 30

20

```

ggatctcacc atggagtttg ggctgtgctg gattttcctc gttgctcttt taagaggtgt      60
ccagtgtcag gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtccct      120
gagactctcc tgtgcagcct ctggattcac cttcattagc tatggcatgc actgggtccg      180
ccaggctcca ggcaaggggc tggagtgggt ggcagttata tcatatgatg gaagtaataa      240
atactatgca gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac      300

```

gctgtatctg caaatgaaca gcctgagagc tgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag 360
 agtattagtg ggagctttat attattataa ctactacggg atggacgtct ggggccaagg 420
 gaccacgggc accgtctcct cagcctccac caagggccca tcggctcttc ccctggcacc 480
 ctctagc 487

<210> 31
 <211> 144
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31

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

<210> 32
 <211> 478
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<223> Incluye el empalme por clonación BamHI/BglII, péptido señal, región V, parte de la región C y empalme
 20 por clonación 3'XbaI/NheI (pesado) o NheI (ligero)

<400> 32

```

ggatctcacc atgagggtcc ctgctcagct cctggggctg ctaatgctct ggatacctgg      60
atccagtgca gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca      120
gcgggcctcc atctcctgca agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagacctt      180
tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgagggttc      240
caacogggttc tctggagtgc cagatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac      300
actgaaaatc agccgggtgg aggctgagga tgttgggctt tattactgca tgcaaagtat      360
acagcttccg ctcactttcg ggggagggaac caagggtggag atcaaacgaa ctgtggctgc      420
accatctgtc ttcacttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgctagc      478

```

<210> 33
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33

```

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

```

REIVINDICACIONES

1.- Un conjugado anticuerpo-fármaco, que comprende:

un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une un antígeno prostático específico de membrana (PSMA), conjugado a monometilauristatina norefedrina o monometilauristatina fenilalanina, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco tiene una selectividad por células PC3 a células C4-2 o LNCaP de al menos 250, y 3 ó 4 moléculas de monometilauristatina norefedrina o monometilauristatina fenilalanina están conjugadas al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo.

2.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a:

- (a) PSMA;
- (b) un dominio extracelular de PSMA; o
- (c) a un epítipo conformacional de PSMA.

3.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es codificado por una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que es al menos 90, 95, 97, 98 ó 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en: AB-PG1-XG1-006, AB-PGI-XG1-026 y anticuerpos que comprenden:

(a) una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2 y 3, y

(b) una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8 y 9, o

(c) una región variable de la cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 14 y 18, y

(d) una región variable de la cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 16 y 20.

4.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es AB-PGI-XG1-006, AI3-PGI-XG1-026 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

5.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se selecciona del grupo que consiste en:

(a) anticuerpos que comprenden una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 2 y 3, y una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 8 y 9, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos;

(b) anticuerpos que comprenden una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 8, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y

(c) anticuerpos que comprenden una cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 3, y una cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 9, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y

(d) anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 14 y 18, y una región variable de la cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de nucleótidos recogidas como SEQ ID NOs: 16 y 20, y

fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y

(e) anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 14, y una región variable de la cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 16, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos; y

(f) anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena pesada codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 18, y una región variable de la cadena ligera codificada por una molécula de ácido nucleico que comprende la región o regiones codificadoras de una secuencia de nucleótidos recogida como SEQ ID NO: 20, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

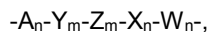
6.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo es IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE o tiene un dominio constante y/o variable de inmunoglobulina de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD o IgE.

7.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, humanizado, humano, recombinante, quimérico, biespecífico o multiespecífico.

8.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el fragmento de unión a antígeno es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fv o un fragmento que contiene CDR3.

9.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde la selectividad por células PC-3 a células C4-2 o LNCaP es al menos 500, 1000, 2500, 6000 ó 13.000.

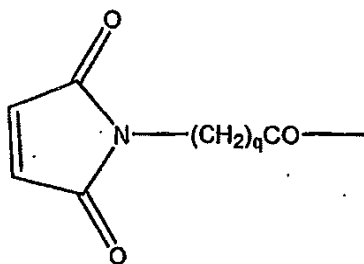
10.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde la monometilauristatin norefredina o monometilauristatin fenilalanina está conjugada al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo con un compuesto de la fórmula:



en donde A es una unidad acilo carboxílica; Y es un aminoácido; Z es un aminoácido; X y W son cada uno un espaciador auto-inmolativo; n es un número entero de 0 ó 1; y m es un número entero de 0 ó 1, 2, 3, 4, 5 ó 6.

11.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde A es

(a)



en que q es 1-10,

(b) 4-(N-succinimidometil)ciclohexano-1-carbonilo,

(c) m-succinimidobenzoilo,

(d) 4-(p-succinimidofenil)-butirilo,

(e) 4-(2-acetamido)benzoilo,

(f) 3-tiopropionilo,

(g) 4-(1-tioetil)-benzoilo,

(h) 6-(3-tiopropionilamido)-hexanoilo, o

(i) maleimida-caproilo.

12.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde Y es alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptófano o prolina.

13.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde Z es lisina, lisina protegida con acetilo o formilo, arginina, arginina protegida con tosilo o grupos nitro, histidina, ornitina, ornitina protegida con acetilo o

formilo, o citrulina.

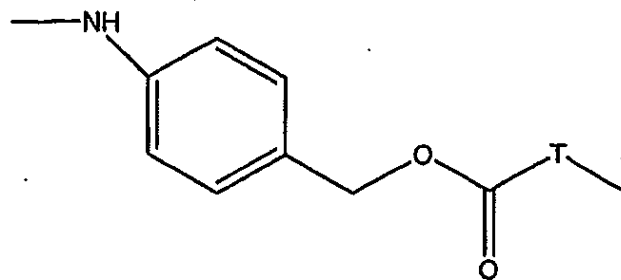
14.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde Y_m-Z_m es valina-citrulina.

5 15.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde Y_m-Z_m es una secuencia de proteínas que es selectivamente escindible por una proteasa.

16.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde X es:

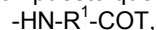
(a) un compuesto que tiene la fórmula

10



en que T es O, N o S;

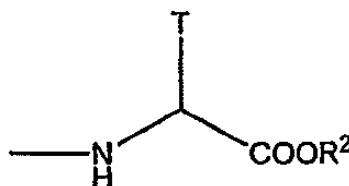
(b) un compuesto que tiene la fórmula



15

en que R^1 es alquilo C_1-C_5 , T es O, N o S;

(c) un compuesto que tiene la fórmula



en que T es O, N o S, R^2 es H o alquilo C_1-C_5 ;

(d) p-aminobencilcarbamoiloxi;

20

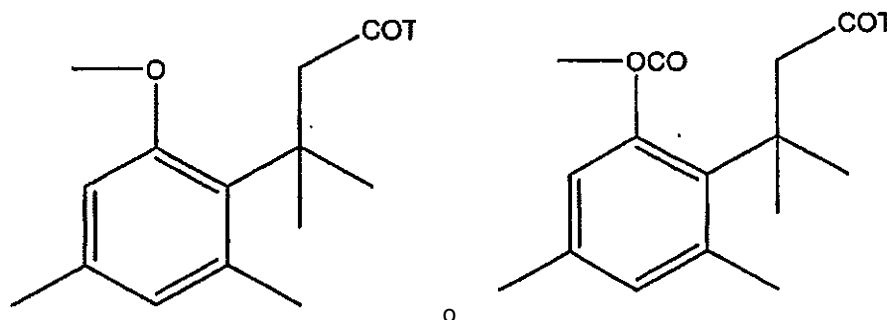
(e) alcohol p-aminobencílico;

(f) carbamato de p-aminobencilo;

(g) p-aminobenciloxicarbonilo; o

(h) ácido γ -aminobutírico; ácido α,α -dimetil- γ -aminobutírico o ácido β,β -dimetil- γ -aminobutírico.

25 17.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 10, en donde W es



en que T es O, S o N.

30 18.- El conjugado anticuerpo-fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 10-17, en donde m y n son 0.

19.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, que es AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonil-monometilauristatin norefredina, AB-PG1-XG1-006-maleimida caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxicarbonil-monometilauristatin fenilalanina, AB-PG1-XG1-006-maleimida-caproil-monometilauristatin fenilalanina, AB-PG1-XG1-006-maleimida-caproil-valina-citrulina-p-carbamato de

35

aminobencilo-monometilauristatin norefedrina, AB-PG1-XG1-006-maleimida-caproil-valina-citrulina-p-carbamato de aminobencilo-monometilauristatin fenilalanina, AB-PG1-XG1-026-maleimida-caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin norefedrina, AB-PG1-XG1-026-maleimida-caproil-valina-citrulina-p-aminobenciloxycarbonil-monometilauristatin fenilalanina o AB-PG1-XG1-026-maleimida-caproil-monometilauristatin fenilalanina.

20.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco une una célula tumoral, preferiblemente una célula de tumor de próstata.

21.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco une células endoteliales de la neovasculatura de un tumor, no requiere de una lisis celular para unirse a PSMA, conduce a una paralización del ciclo celular y/o inhibe el crecimiento de células que expresan PSMA.

22.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco media en el exterminio de células específico de células que expresan PSMA con una CI_{50} de:

(a) menor que 1×10^{-10} , 1×10^{-11} o 1×10^{-12} M;

(b) 11-, 42-, 60- o -65 - 208×10^{-12} M; o

(c) 11, 42, 60 u 83×10^{-12} M.

23.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en donde el conjugado anticuerpo-fármaco, cuando se administra a ratones con un régimen de q4d x 6 a una dosis de 6 mg/kg resulta una tasa de curación de al menos 20%, 30%, 40% o 50%.

24.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, unido a un marcador, preferiblemente un marcador fluorescente, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, un marcador activo de resonancia magnética nuclear, un marcador luminiscente o un marcador cromóforo.

25.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, envasado en forma liofilizada o acuosa.

26.- El conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, en una forma estéril.

27.- Una composición que comprende:

(a) el conjugado anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable; o

(b) una combinación de dos o más conjugados anticuerpo-fármaco diferentes de acuerdo con la reivindicación 1 y un vehículo, excipiente o estabilizador farmacéuticamente aceptable.

28.- La composición de la reivindicación 27 que comprende, además, un agente antitumoral, un agente inmunoestimulante, un inmunomodulador, corticosteroides o una combinación de los mismos.

29.- La composición de la reivindicación 28, en donde el agente antitumoral es un agente citotóxico, un agente que actúa sobre la neovasculatura del tumor o una combinación de los mismos, preferiblemente docetaxel.

30.- La composición de la reivindicación 28, en donde el inmunomodulador es una citoquina, quimioquina, adyuvante o una combinación de los mismos.

31.- La composición de la reivindicación 28, en donde el agente inmunoestimulante es interleuquina-2, α -interferón, γ -interferón, factor α de necrosis tumoral, un oligonucleótido inmunoestimulante o una combinación de los mismos.

32.- La composición de la reivindicación 28, en donde el corticosteroide es prednisona o hidrocortisona.

33.- Una composición, que comprende:

uno o más conjugados anticuerpo-fármaco de la reivindicación 1, y uno o más anticuerpos anti-PSMA no conjugados.

34.- Un conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA, en donde el conjugado se ha de poner en contacto con la célula que expresa PSMA.

35.- Un conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 34, en donde la célula que expresa PSMA es una

célula de tumor de próstata, una célula de la neovasculatura de un tumor no prostático, una célula andrógeno-dependiente o una célula andrógeno-independiente.

- 5 36.- Un conjugado anticuerpo-fármaco según la reivindicación 34, en donde, en dicho método, la célula que expresa PSMA se ha de poner adicionalmente en contacto con un agente antitumoral, un agente inmunoestimulante, un inmunomodulador, corticosteroide o una combinación de los mismos.
- 10 37.- Un método *ex vivo* para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA, que comprende poner en contacto la célula que expresa PSMA con una cantidad de un conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, eficaz para inhibir el crecimiento de la célula que expresa PSMA.
- 15 38.- Un método según la reivindicación 37, en el que la célula que expresa PSMA es una célula de tumor de próstata, una célula de la neovasculatura de un tumor no prostático, una célula andrógeno-dependiente o una célula andrógeno-independiente.
- 39.- Un método según la reivindicación 37, que comprende, además, poner en contacto la célula que expresa PSMA con un agente antitumoral, un agente inmunoestimulante, un inmunomodulador, corticosteroide o una combinación de los mismos.
- 20 40.- Un conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera una de las reivindicaciones 1-23, para uso en un método de efectuar la paralización del ciclo celular en una célula que expresa PSMA, en el que el conjugado se ha de poner en contacto con la célula que expresa PSMA.
- 25 41.- Un conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para uso en un método para tratar el cáncer, opcionalmente cáncer de próstata, o un cáncer no prostático, y dicho cáncer no prostático, opcionalmente, es cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de riñones, sarcoma, cáncer de mama, cáncer de cerebro, carcinoma neuroendocrino, cáncer de colon, cáncer testicular o melanoma.
- 30 42.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 41, en donde, en dicho método, otro agente terapéutico se ha de co-administrar para tratar el cáncer, en donde la co-administración se ha de realizar antes, durante o después de la administración del conjugado anticuerpo-fármaco.
- 35 43.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 42, en donde el otro agente terapéutico es un agente antitumoral, un agente inmunoestimulante, un inmunomodulador, corticosteroide o una combinación de los mismos.
- 40 44.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA según la reivindicación 36, un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 43, o un método según la reivindicación 39, en donde el agente antitumoral es un agente citotóxico, un agente que actúa sobre la neovasculatura del tumor o una combinación de los mismos y, preferiblemente, docetaxel.
- 45 45.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA según la reivindicación 36, un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 43, o un método según la reivindicación 39, en donde el inmunomodulador es una citoquina, quimioquina, adyuvante o una combinación de los mismos.
- 50 46.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA según la reivindicación 36, un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 43, o un método según la reivindicación 39, en donde el agente inmunoestimulante es interleuquina-2, α -interferón, γ -interferón, factor α de necrosis tumoral, un oligonucleótido inmunoestimulante o una combinación de los mismos.
- 55 47.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA según la reivindicación 36, un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 43, o un método según la reivindicación 39, en donde el corticosteroide es prednisona o hidrocortisona.
- 60 48.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según la reivindicación 42, en donde el agente terapéutico es una vacuna, preferiblemente una vacuna que inmuniza contra PSMA.

49.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa PSMA según la reivindicación 44, o un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para tratar el cáncer según una cualquiera de las reivindicaciones 42-44, en donde, en dicho método, se ha de administrar todavía otro agente terapéutico, preferiblemente prednisona.

50.- Un conjugado anticuerpo-fármaco según cualquiera de las reivindicaciones 1-23, para uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor, en donde dicho conjugado se ha de poner en contacto con células que expresan PSMA de la neovascularización del tumor, para inhibir con ello el crecimiento del tumor.

51.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor según la reivindicación 50, en donde, en dicho método, las células que expresan PSMA se han de poner en contacto, adicionalmente, con un agente antitumoral, un agente inmunoestimulante, un inmunomodulador, corticosteroide o una combinación de los mismos.

52.- Un conjugado anticuerpo-fármaco para uso en un método para inhibir el crecimiento de un tumor según la reivindicación 51, en donde:

(a) el agente antitumoral es un agente citotóxico, un agente que actúa sobre la neovascularización del tumor o una combinación de los mismos;

(b) el inmunomodulador es una citoquina, quimioquina, adyuvante o una combinación de los mismos; y/o

(c) el agente inmunoestimulante es interleuquina-2, α -interferón, γ -interferón, factor α de necrosis tumoral, oligonucleótidos inmunoestimulantes o una combinación de los mismos.

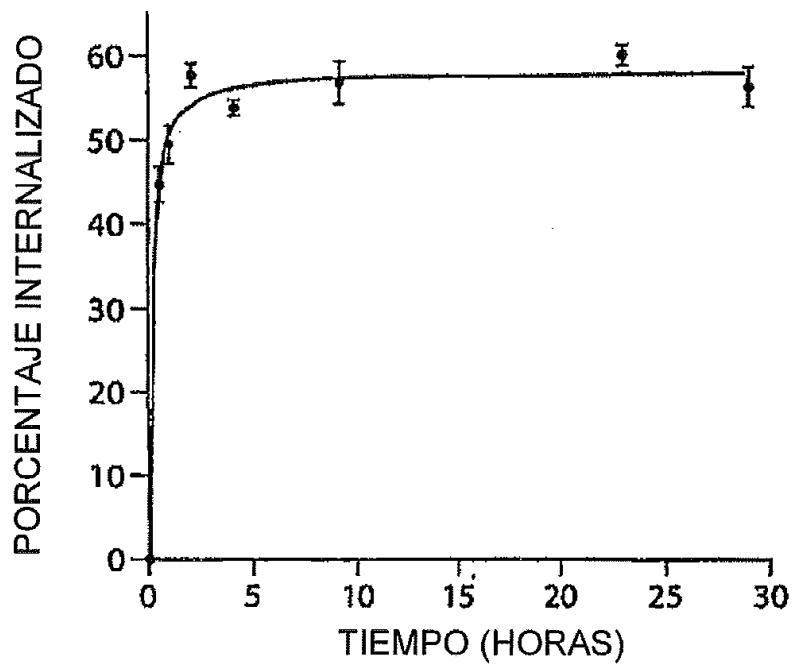


Fig. 1A

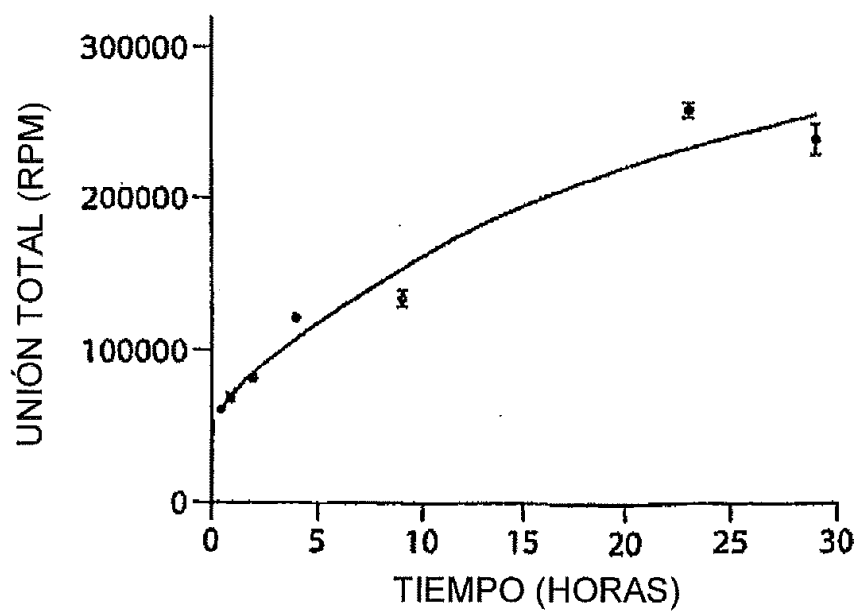
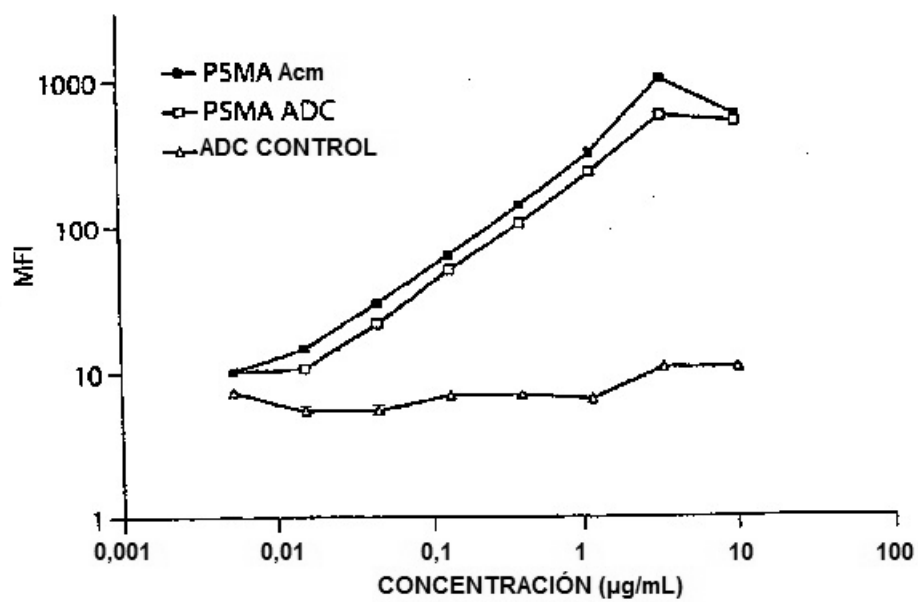


Fig. 1B

**Fig. 2**

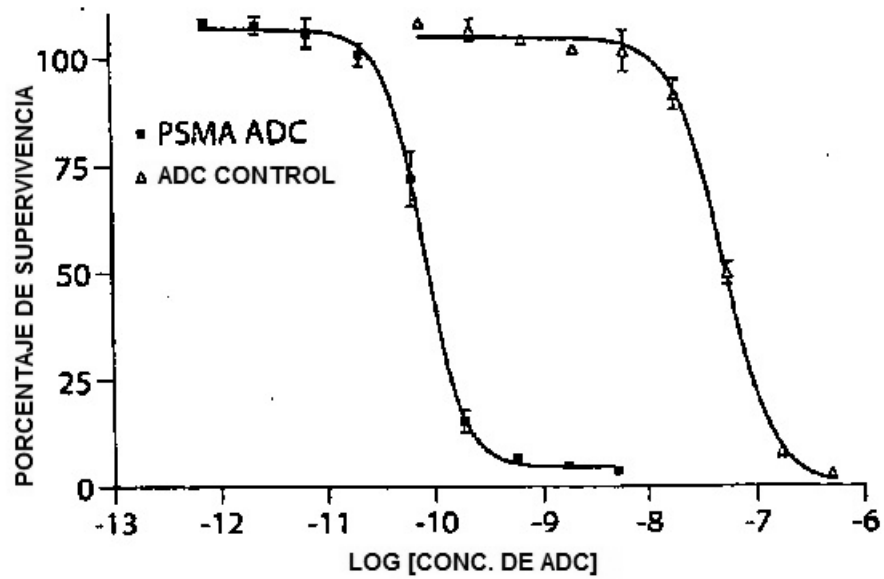


Fig. 3A

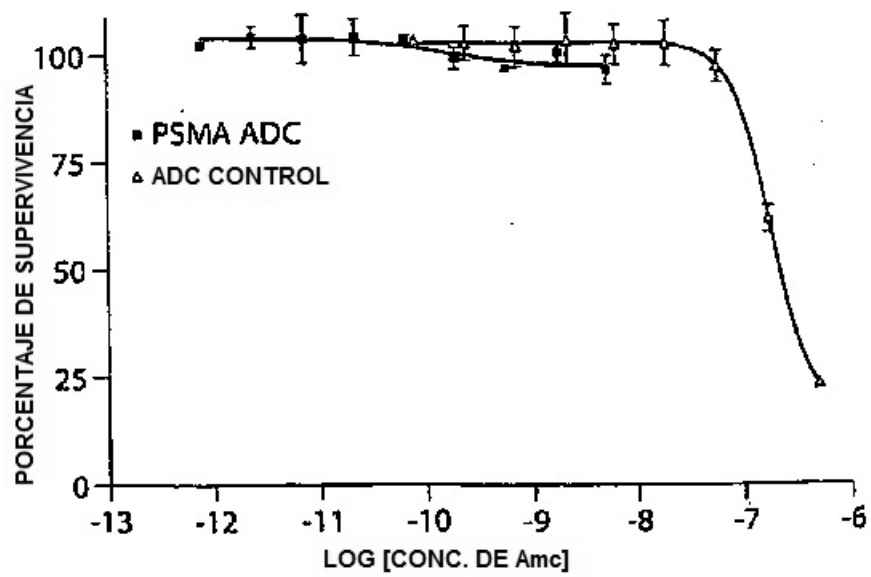


Fig. 3B

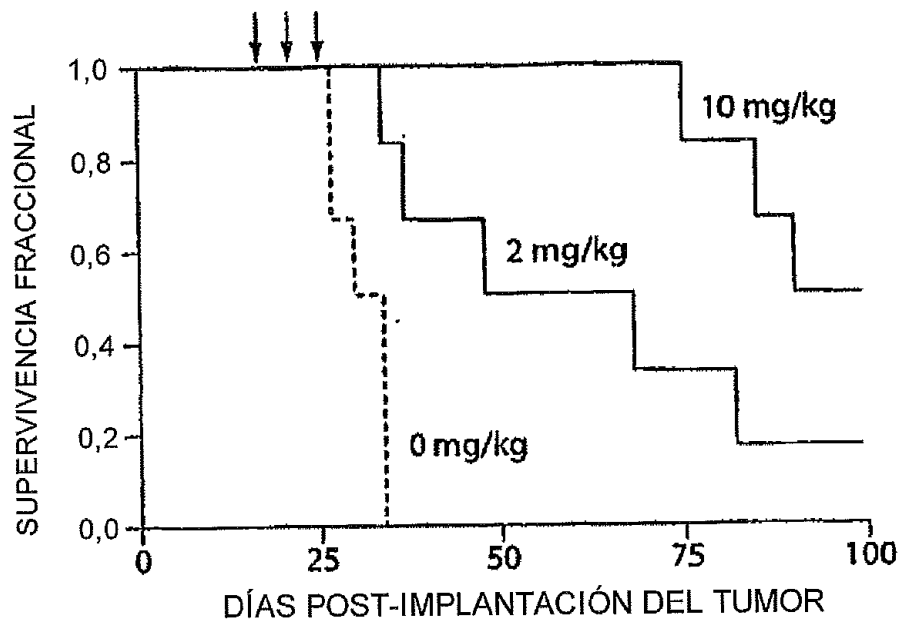


Fig. 4A

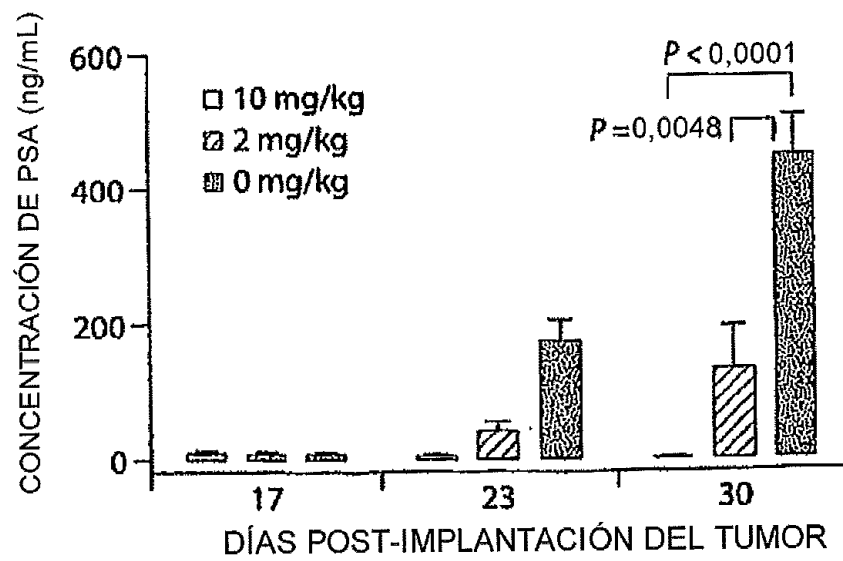
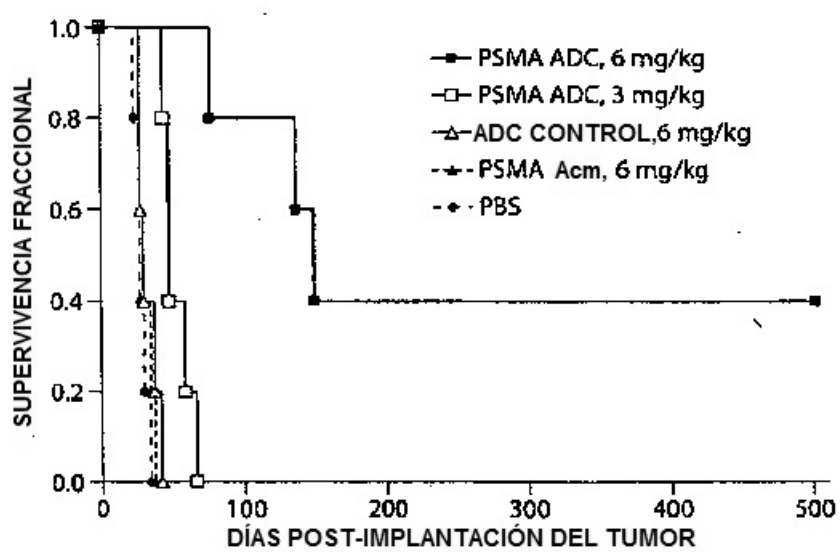


Fig. 4B

**Fig. 5**

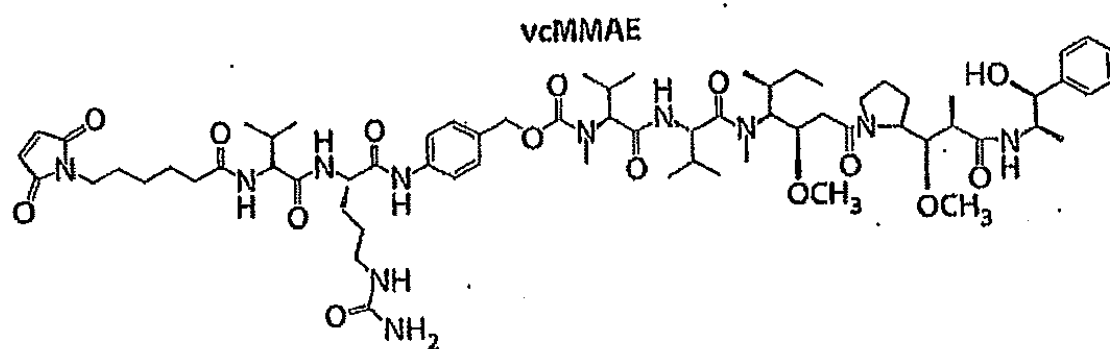


Fig. 6A

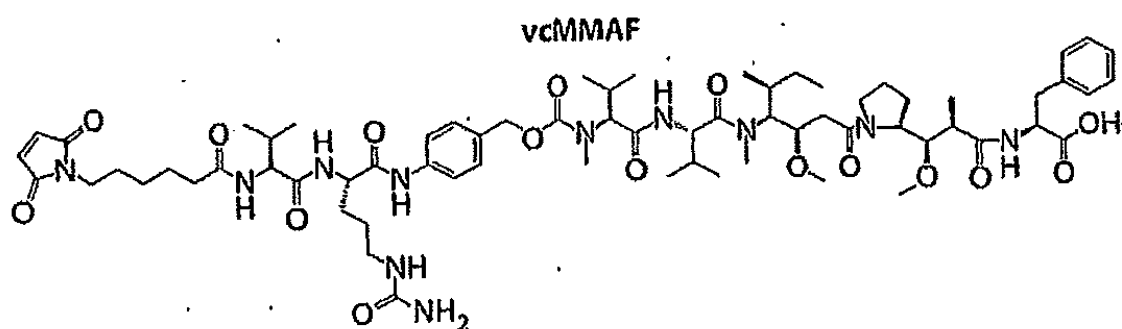


Fig. 6B

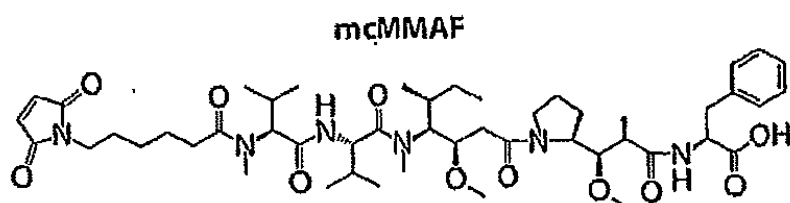


Fig. 6C

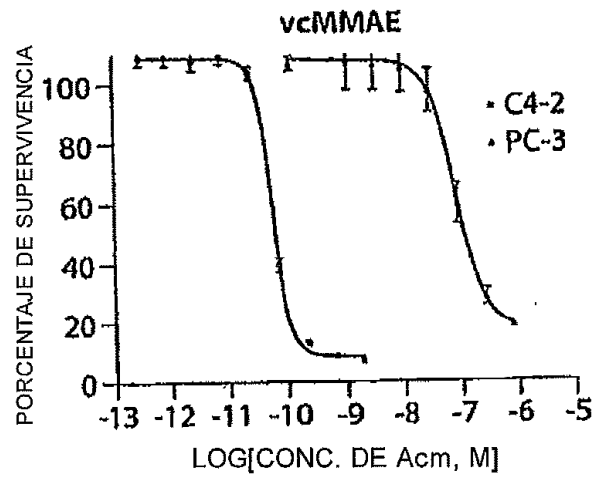


Fig. 7A

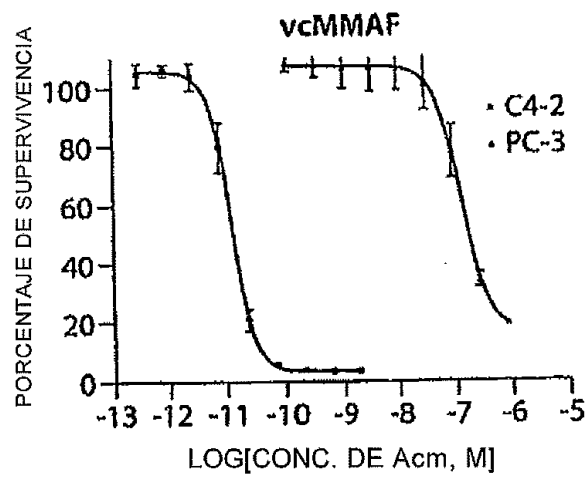


Fig. 7B

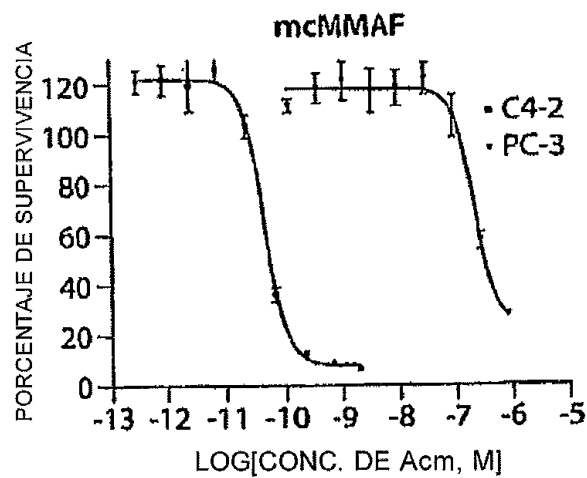


Fig. 7C

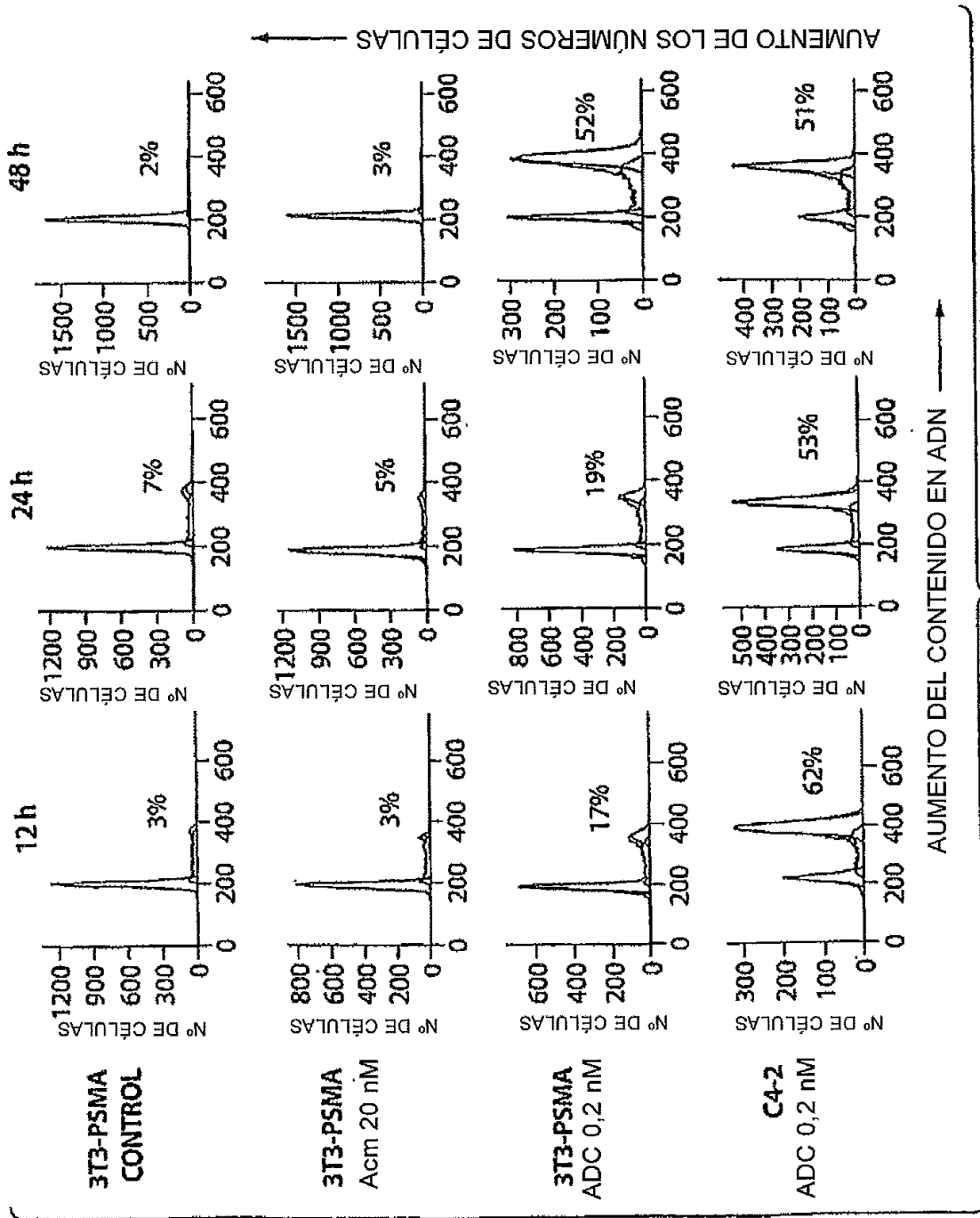


Fig. 8

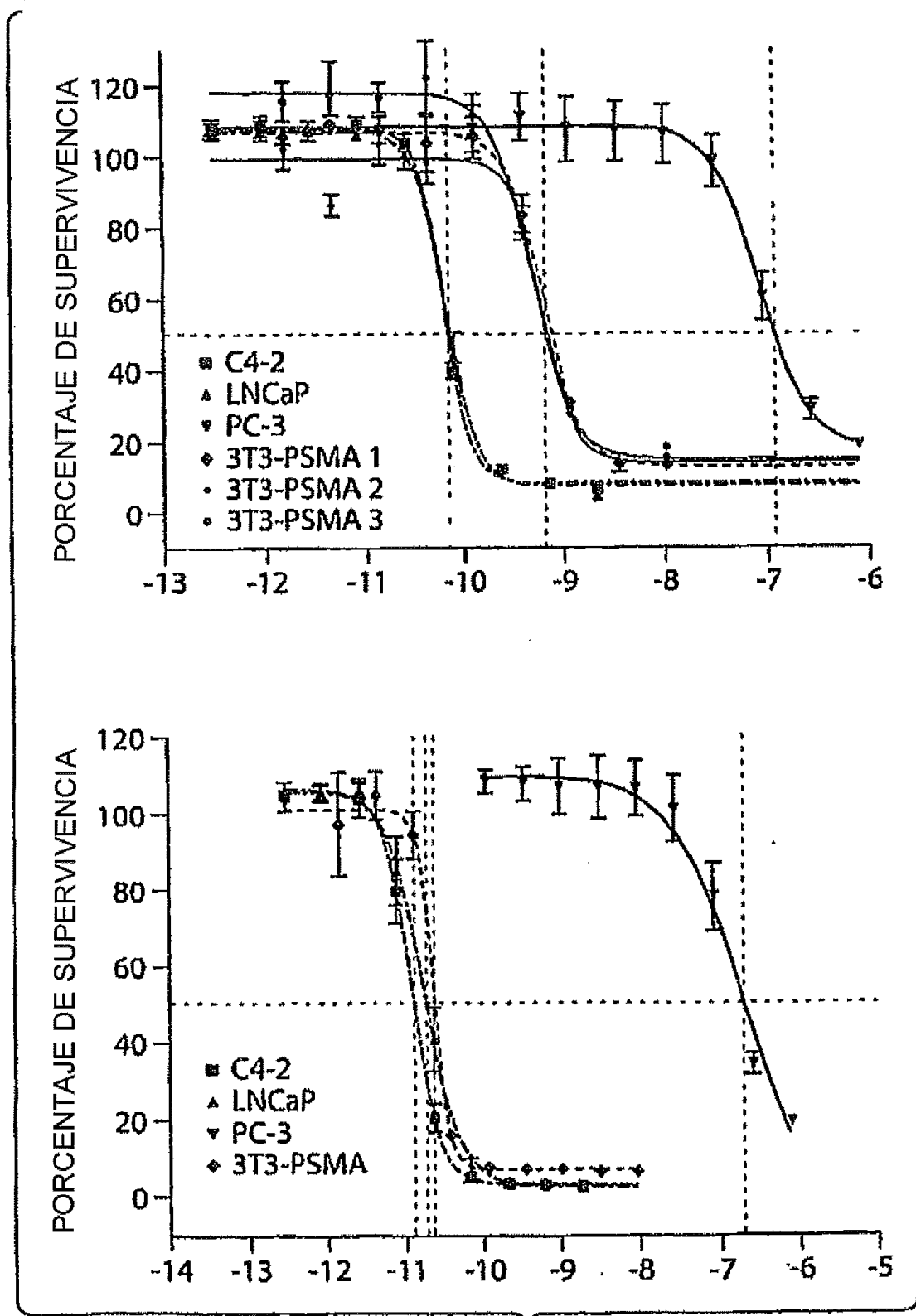


Fig. 9