

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 561**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2016** **E 19205420 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2024** **EP 3626262**

54 Título: **Vacuna de ADN dirigida a VEGFR-2 para terapia combinada**

30 Prioridad:

18.06.2015 EP 15001803

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
27.01.2025

73 Titular/es:

**VAXIMM AG (100.00%)
Hochbergerstrasse 60c
4057 Basel, CH**

72 Inventor/es:

LUBENAU, HEINZ

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 994 561 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna de ADN dirigida a VEGFR-2 para terapia combinada

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a una cepa atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética que comprende una proteína de unión a antígeno tumoral o una proteína de unión a antígeno del estroma tumoral sobre su superficie.

Antecedentes de la invención

- 10 El hallazgo de que los tumores pueden ser inmunogénicos ha conducido al desarrollo de una serie de inmunoterapias para el cáncer diseñadas para emplear el sistema inmunitario para eliminar selectivamente células malignas a la vez que preservan el tejido normal. Sin embargo, los beneficios de supervivencia de la vacunación contra antígenos tumorales solos siguen siendo modestos. Las vacunas anticancerosas se enfrentan a numerosos desafíos, siendo uno de ellos el microentorno inmunosupresor. La vasculatura tumoral anormal crea un microentorno hipóxico que polariza las células inflamatorias hacia la supresión inmunitaria. Por otra parte, los tumores alteran sistémicamente la proliferación, diferenciación y función de las células inmunitarias a través de la secreción de factores de crecimiento y citocinas.

- 15 Para la curación del cáncer, la erradicación completa de las células madre cancerosas tiene una importancia crucial. Los numerosos mecanismos de escape inmunitario de los tumores humanos siguen siendo un desafío importante en la inmunoterapia del cáncer. Por lo tanto, existe una gran necesidad de enfoques mejorados de terapia contra el cáncer, que no se hayan satisfecho hasta ahora.

El documento WO 2014/005683 divulga una cepa mutante atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína receptora de VEGF para su uso en inmunoterapia contra el cáncer, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer pancreático.

- 25 El documento WO 2014/173542 divulga una cepa atenuada de Salmonella que comprende una molécula de ADN recombinante que codifica la Proteína Tumoral de Wilms (WT1) para su uso en inmunoterapia contra el cáncer.

El documento WO 2013/09189 divulga un método para cultivar cepas de Salmonella typhi mutantes atenuadas que carecen de actividad galactosa epimerasa y que albergan una molécula de ADN recombinante.

Objetos de la invención

- 30 En vista de la técnica anterior, un objeto de la presente invención es proporcionar terapias novedosas contra el cáncer. Tales terapias novedosas ofrecerían ventajas importantes para mejorar las opciones de tratamiento para pacientes con cáncer.

Compendio de la invención

- 35 En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética que comprende una proteína de unión a antígeno tumoral o una proteína de unión a antígeno del estroma tumoral sobre su superficie.

- 40 Sorprendentemente, se descubrió que la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF aumenta fuertemente la eficacia de las terapias contra el cáncer que se basan en el empleo del sistema inmunitario del paciente, tal como el tratamiento con vacunas contra el cáncer que codifican antígenos tumorales o antígenos del estroma tumoral, el tratamiento con células T modificadas mediante ingeniería genética que están diseñadas para dirigirse a células tumorales, el tratamiento con anticuerpos biespecíficos diseñados para mediar el anclaje de células inmunitarias a células tumorales y el tratamiento con inhibidores del punto de control que tienen como objetivo prevenir la inhibición inducida por tumor de la proliferación de células T.

- 45 Sorprendentemente, se observó que la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF conduce a un aumento significativo de la infiltración del tumor por células T CD8⁺ y CD4⁺. Además, la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF puede conducir a un aumento en el número de células T CD8⁺ y CD4⁺ activadas y/o a una reducción en el número de células linfoides inmunosupresoras tales como células Treg. Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF mejora la eficacia de las inmunoterapias contra el cáncer al potenciar el acoplamiento de las células T en la erradicación del tumor. Se demostró que la combinación de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF con otros agentes anticancerosos, tales como células T modificadas mediante ingeniería genética, inhibidores de puntos de control, anticuerpos biespecíficos y vacunas de ADN que codifican antígenos tumorales o antígenos del estroma tumoral tiene

efectos sinérgicos sobre las respuestas de células T específicas de tumores y la supervivencia global.

5 En realizaciones particulares, el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, de al menos un inhibidor de punto de control, de al menos un anticuerpo biespecífico que presenta especificidad de unión por una proteína de superficie de células T y por un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, o de cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones particulares, la al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral se selecciona entre al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.

10 En realizaciones particulares, el al menos un inhibidor de punto de control se selecciona entre un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

La cepa atenuada de *Salmonella* y la al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* son de la especie *Salmonella* entérica.

La cepa atenuada de *Salmonella* y la al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* son *Salmonella typhi* Ty21a.

15 En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariótico, que comprende particularmente un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma.

20 En realizaciones particulares, VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden el gen de resistencia a antibiótico kanamicina, el ori de pMB1 y un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden la secuencia de ADN encontrada en SEQ ID NO 2.

25 En realizaciones particulares, el antígeno tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, mesotelina humana (MSLN) que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma y pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, y el antígeno del estroma tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP) humana.

30 En realizaciones particulares, la Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3, la mesotelina (MSLN) humana tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4, el CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5, y pp65 de CMV tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8.

35 En realizaciones particulares, la cepa atenuada de *Salmonella* se administra simultáneamente a, o antes de dicho agente anticanceroso adicional, es decir, simultáneamente a, o antes de dicha al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, dicho al menos un inhibidor de punto de control, dicha al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética y/o dicho al menos un anticuerpo biespecífico.

40 En realizaciones particulares, el tratamiento está acompañado por quimioterapia, radioterapia o terapia biológica contra el cáncer. Particularmente, la cepa atenuada de *Salmonella* se administra antes o durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia o la terapia biológica contra el cáncer. En otras realizaciones particulares, la cepa atenuada de *Salmonella* se administra antes y durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia o la terapia biológica contra el cáncer.

45 En realizaciones particulares, la cepa atenuada de *Salmonella* y la al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* se administran por vía oral.

En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona entre cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón,

cáncer de ovario, mesotelioma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino.

5 En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella comprende de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 , lo más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC).

En realizaciones particulares, el tratamiento es inmunoterapia individualizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión de y/o la respuesta pre-inmunitaria contra dicho antígeno tumoral en un paciente.

10 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF, en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariótico, que comprende particularmente un promotor de CMV.

20 En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma.

En realizaciones particulares, VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1.

25 En realizaciones particulares, la composición farmacéutica es para su uso como medicamento, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer.

Descripción detallada de la invención

La presente invención puede entenderse más fácilmente mediante la referencia a la siguiente descripción detallada de la invención y los ejemplos incluidos en la misma.

30 En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética que comprende una proteína de unión a antígeno tumoral o una proteína de unión a antígeno del estroma tumoral sobre su superficie.

35 Las proteínas receptoras de VEGF son tirosina quinasas receptoras específicas de células endoteliales que pueden unirse al ligando factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que provoca que se dimericen y se activen a través de transfosforilación. La familia de factores de crecimiento de VEGF (Kd 75-760 pM) abarca 6 miembros de la familia, VEGF-A (también conocido como VEGF) a E y PLGF (factor de crecimiento placentario, también conocido como PGF o PIGF-2). Los factores de crecimiento VEGF regulan el crecimiento y diferenciación de múltiples componentes del sistema vascular, especialmente vasos sanguíneos y linfáticos. Existen tres subtipos principales de VEGFR, VEGFR-1 (o FLT1), VEGFR-2 (o KDR, FLK1) y VEGFR-3 (o FLT4). Los receptores de VEGF unidos a membrana tienen una porción extracelular que consiste en 7 dominios de tipo inmunoglobulina, una única región transmembrana y una porción intracelular que contiene un dominio tirosina quinasa dividido. Los transcritos de VEGFR dan lugar también a variantes de corte y empalme alternativas que codifican proteínas receptoras de VEGF solubles.

45 De acuerdo con la invención, la cepa de Salmonella atenuada funciona como el portador bacteriano de la molécula de ADN recombinante que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF para el suministro de dicha molécula de ADN recombinante a una célula diana. Tal vector de suministro que comprende una molécula de ADN que codifica un antígeno heterólogo, tal como una proteína receptora de VEGF - un antígeno del estroma tumoral, se denomina vacuna de ADN.

50 En el contexto de la presente invención, el término "vacuna" se refiere a un agente que es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto tras la administración. Una vacuna puede prevenir, mejorar o tratar preferiblemente una enfermedad.

La cepa de Salmonella atenuada viva de acuerdo con la presente invención porta de forma estable una molécula de ADN recombinante que codifica una proteína receptora de VEGF. Se puede utilizar como vehículo para el suministro oral de esta molécula de ADN recombinante.

La inmunización genética podría ser ventajosa sobre la vacunación convencional. El ADN diana puede detectarse durante un periodo de tiempo considerable, actuando así como un depósito del antígeno. Los motivos de secuencia en algunos plásmidos, como las islas de GpC, son inmunoestimuladores y pueden funcionar como adyuvantes fomentados por la inmunoestimulación debida a LPS y otros componentes bacterianos.

- 5 Los vectores de Salmonella atenuados vivos producen sus propios factores inmunomoduladores tales como lipopolisacáridos (LPS) *in situ* que pueden constituir una ventaja sobre otras formas de administración tales como la microencapsulación. Por otra parte, la vacuna de mucosa según la presente invención tiene un modo de acción intralinfática, que demuestra ser beneficiosa. Después de la ingestión de la vacuna atenuada de acuerdo con la presente invención, los macrófagos y otras células en las placas de Peyer del intestino son invadidos por las bacterias modificadas. Estas células fagocíticas absorben las bacterias. Debido a sus mutaciones atenuantes, las bacterias de la cepa Ty21 de *S. typhi* no son capaces de persistir en estas células fagocíticas, sino que mueren en este momento. Las moléculas de ADN recombinante se liberan y posteriormente se transfieren al citosol de las células inmunitarias fagocíticas, ya sea a través de un sistema de transporte específico o por fuga endosomal. Finalmente, las moléculas de ADN recombinante entran en el núcleo, donde se transcriben, conduciendo a la expresión masiva de la proteína receptora de VEGF en el citosol de las células fagocíticas. Las células infectadas experimentan apoptosis, se cargan con el antígeno receptor de VEGF, y son recogidas y procesadas por el sistema inmunitario del intestino. Las señales de peligro de la infección bacteriana sirven como un fuerte adyuvante en este proceso, conduciendo a una fuerte respuesta de células T CD8+ específicas de antígeno diana y anticuerpo a nivel de compartimentos tanto sistémicos como mucosos. La respuesta inmunitaria alcanza su máximo aproximadamente diez días después de la vacunación. La falta de respuesta anti-portador permite el refuerzo con la misma vacuna muchas veces.

En el contexto de la presente invención, el término "atenuada" se refiere a una cepa bacteriana de virulencia reducida en comparación con la cepa bacteriana parental, que no alberga la mutación atenuante. Las cepas bacterianas atenuadas han perdido preferiblemente su virulencia, pero han conservado su capacidad para inducir inmunidad protectora. La atenuación se puede conseguir mediante la delección de diversos genes, incluyendo los genes de virulencia, reguladores y metabólicos. Las bacterias atenuadas se pueden encontrar de manera natural o se pueden producir artificialmente en el laboratorio, por ejemplo, mediante adaptación a un nuevo medio o cultivo celular o se pueden producir mediante tecnología de ADN recombinante. La administración de aproximadamente 10^{11} UFC de la cepa atenuada de Salmonella según la presente invención produce preferiblemente salmonelosis en menos de 5%, más preferiblemente menos de 1%, lo más preferiblemente menos de 1 ‰ de sujetos.

En el contexto de la presente invención, el término "comprende" o "que comprende" significa "que incluye, pero no se limita a". Se pretende que el término sea abierto, para especificar la presencia de cualquier característica, elemento, número entero, etapa o componente indicado, pero no para excluir la presencia o adición de una o más características, elementos, números enteros, etapas, componentes o grupos de los mismos. El término "que comprende" incluye por tanto los términos más restrictivos "que consiste en" y "que consiste esencialmente en". En una realización, el término "que comprende" como se emplea a lo largo de la solicitud y en particular dentro de las reivindicaciones puede reemplazarse por el término "que consiste en".

La molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF es adecuadamente una molécula de ADN recombinante, es decir, una construcción de ADN modificada mediante ingeniería genética, compuesta preferiblemente por piezas de ADN de diferente origen. La molécula de ADN puede ser un ácido nucleico lineal, o preferiblemente, un plásmido de ADN circular generado introduciendo un marco de lectura abierto que codifica una proteína receptora de VEGF en un plásmido vector de expresión.

En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión" se refiere a una unidad de ácido nucleico que comprende al menos un marco de lectura abierto (ORF) bajo el control de secuencias reguladoras que controlan su expresión. Los casetes de expresión pueden mediar preferiblemente la transcripción del marco de lectura abierto incluido que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, tal como la proteína receptora de VEGF, en una célula diana. Los casetes de expresión comprenden típicamente un promotor, al menos un marco de lectura abierto y una señal de terminación de la transcripción.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, de al menos un inhibidor de punto de control, de al menos un anticuerpo biespecífico que presenta especificidad de unión por una proteína de superficie de células T y por un antígeno tumoral o por un antígeno del estroma tumoral, o de cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones particulares, el al menos un anticuerpo biespecífico muestra especificidad de unión por un antígeno tumoral seleccionado entre CD19, EpCAM, HER2, EGFR, CEA, CD33, EphA2 y MCSP.

En realizaciones particulares, la al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética comprende al menos una proteína de unión a antígeno tumoral sobre su superficie celular, en donde el antígeno tumoral se selecciona entre CEA, FBP, GD2, GD3, Her2-neu, MAGE-A1, MSLN, PSCA, PSMA.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende adicionalmente la administración de una vacuna de ADN adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, en particular de una cepa atenuada

adicional de *Salmonella* que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.

5 En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de dos cepas atenuadas adicionales de *Salmonella* que codifican cada una un antígeno tumoral.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de un inhibidor de punto de control.

10 En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de una cepa atenuada adicional de *Salmonella* que codifica un antígeno tumoral y un inhibidor de punto de control.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de una célula T modificada mediante ingeniería genética.

15 En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de una célula T modificada mediante ingeniería genética y un inhibidor de punto de control.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de un anticuerpo biespecífico.

En realizaciones particulares, la administración de la cepa atenuada de *Salmonella* que codifica una proteína receptora de VEGF se combina con la administración de un anticuerpo biespecífico y un inhibidor de punto de control.

20 En realizaciones particulares, la al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral se selecciona entre al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.

25 En realizaciones particulares, el al menos un inhibidor de punto de control se selecciona entre un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.

30 En realizaciones particulares, la cepa atenuada de *Salmonella* y la al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* son de la especie *Salmonella* entérica. Los derivados atenuados de *Salmonella* entérica son vehículos atractivos para el suministro de antígenos heterólogos al sistema inmunitario de los mamíferos, ya que las cepas de *S. entérica* se pueden suministrar potencialmente a través de vías mucosas de inmunización, es decir, por vía oral o nasal, lo que ofrece ventajas de simplicidad y seguridad en comparación con la administración parenteral. Además, las cepas de *Salmonella* provocan fuertes respuestas inmunitarias humorales y celulares a nivel de los compartimentos tanto sistémicos como mucosos. Los costes de preparación de lotes son bajos y las formulaciones de vacunas bacterianas vivas son altamente estables. La atenuación se puede conseguir mediante la delección de diversos genes, incluyendo los genes de virulencia, reguladores y metabólicos.

35 Se ha demostrado que varias cepas de *Salmonella typhimurium* atenuadas mediante mutaciones *aro* son vehículos de suministro seguros y eficaces para antígenos heterólogos en modelos animales.

40 En realizaciones particulares, la cepa atenuada de *Salmonella* y la al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella* son *Salmonella typhi* Ty21a. La cepa Ty21a de *S. typhi* atenuada viva es el componente activo de Typhoral L[®], también conocido como Vivotif[®] (fabricado por Berna Biotech Ltd., Crucell Company, Suiza). Actualmente es la única vacuna oral viva autorizada contra la fiebre tifoidea. Esta vacuna se ha probado extensamente y ha demostrado ser segura con respecto a la toxicidad en el paciente, así como la transmisión a terceros (Wahdan et al., J. Infectious Diseases 1982, 145:292-295). La vacuna está autorizada en más de 40 países y se ha utilizado en millones de individuos, incluyendo miles de niños, para vacunación profiláctica contra la fiebre tifoidea. Tiene un registro de seguimiento de seguridad sin parangón. No hay datos disponibles que indiquen que Ty21a de *S. typhi* puede entrar sistémicamente en el torrente sanguíneo. La cepa vacunal viva atenuada Ty21a de *Salmonella typhi* permite así un direccionamiento específico del sistema inmunitario en el intestino, al tiempo que es segura y bien tolerada. El número de Autorización de Marketing de la Typhoral L[®] es PL 15747/0001 con fecha 16 de diciembre de 1996. Una dosis de vacuna contiene al menos 2×10^9 unidades formadoras de colonias viables de Ty21a de *S. typhi* y al menos 5×10^9 células no viables de Ty21a de *S. typhi*.

50 Esta vacuna viva oral bien tolerada contra la fiebre tifoidea se obtuvo mediante mutagénesis química del producto aislado bacteriano virulento de tipo salvaje *S. typhi* Ty2 y alberga una mutación de pérdida de función en el gen *galE* que da como resultado su incapacidad para metabolizar galactosa. La cepa bacteriana atenuada tampoco es capaz de reducir el sulfato a sulfuro, lo que la diferencia de la cepa Ty2 de *Salmonella typhi* de tipo salvaje. Con respecto a sus características serológicas, la cepa Ty21a de *Salmonella typhi* contiene el antígeno O9 que es un polisacárido de la membrana externa de la bacteria y carece del antígeno O5 que a su vez es un componente característico de

Salmonella typhimurium. Esta característica serológica apoya la razón de incluir la prueba respectiva en un panel de pruebas de identidad para la liberación de lotes.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariótico, que comprende particularmente un promotor de CMV. En el contexto de la presente invención, el término "casete de expresión eucariótico" se refiere a un casete de expresión que permite la expresión del marco de lectura abierto en una célula eucariota. Se ha demostrado que la cantidad de antígeno heterólogo requerida para inducir una respuesta inmunitaria adecuada puede ser tóxica para la bacteria y puede dar como resultado la muerte celular, la sobreatenuación o la pérdida de expresión del antígeno heterólogo. El uso de un casete de expresión eucariótico que no se expresa en el vector bacteriano sino sólo en la célula diana puede superar este problema de toxicidad y la proteína expresada normalmente muestra un patrón de glicosilación eucariótico.

Un casete de expresión eucariótico comprende secuencias reguladoras que son capaces de controlar la expresión de un marco de lectura abierto en una célula eucariota, preferiblemente un promotor y una señal de poliadenilación. Los promotores y las señales de poliadenilación incluidos en las moléculas de ADN recombinante comprendidas por la cepa atenuada de *Salmonella* de la presente invención se seleccionan preferiblemente para que sean funcionales dentro de las células del sujeto a inmunizar. Los ejemplos de promotores adecuados, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen, pero no se limitan a, promotores de citomegalovirus (CMV), tales como el promotor temprano inmediato de CMV fuerte, Virus 40 de Simio (SV40), Virus de Tumor Mamario de Ratón (MMTV), Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), tales como el promotor de Repetición Terminal Larga (LTR) de VIH, virus de Moloney, Virus de Epstein Barr (EBV), y del Virus del Sarcoma de Rous (RSV), el promotor de CAG sintético compuesto por el elemento potenciador temprano de CMV, el promotor, el primer exón y el primer intrón del gen de beta-actina de pollo y el aceptor de corte y empalme del gen de beta globina de conejo, así como promotores de genes humanos tales como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana, y metalotioneína humana. En una realización particular, el casete de expresión eucariótico contiene el promotor de CMV. En el contexto de la presente invención, el término "promotor de CMV" se refiere al promotor fuerte inmediato-temprano de citomegalovirus.

Los ejemplos de señales de poliadenilación adecuadas, especialmente para la producción de una vacuna de ADN para seres humanos, incluyen, pero no se limitan al sitio de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BGH), señales de poliadenilación de SV40 y señales de poliadenilación de LTR. En una realización particular, el casete de expresión eucariótico incluido en la molécula de ADN recombinante comprendida por la cepa atenuada de *Salmonella* de la presente invención comprende el sitio de poliadenilación de BGH.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del antígeno tumoral heterólogo o gen de antígeno del estroma tumoral, como promotor y señal de poliadenilación, también pueden incluirse otros elementos en la molécula de ADN recombinante. Tales elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede ser, por ejemplo, el potenciador de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y potenciadores virales tales como los de CMV, RSV y EBV.

Las secuencias reguladoras y codones son generalmente dependientes de la especie, por lo que, para maximizar la producción de proteínas, las secuencias reguladoras y codones se seleccionan preferiblemente para que sean eficaces en la especie que se va a inmunizar. El experto en la técnica puede producir moléculas de ADN recombinante que son funcionales en una especie objeto dada.

En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma.

Parece que VEGFR-2, también conocido como receptor que contiene dominio de inserción de quinasa (KDR), media casi todas las respuestas celulares conocidas a VEGF. Por ejemplo, el papel de VEGF en la angiogénesis parece estar mediado a través de la interacción de esta proteína con VEGFR-2. VEGFR-2 es un receptor de alta afinidad de 200-230 kDa de peso molecular, de 1356 aminoácidos de largo para VEGF, así como para VEGF-C y VEGF-D. Identificado en seres humanos a través del escrutinio de ADNc endotelial para receptores de tirosina quinasa, VEGFR-2 comparte el 85% de identidad de secuencia con la quinasa 1 de hígado fetal de ratón (Flk-1) descubierta previamente. VEGFR-2 se expresa normalmente en precursores endoteliales y hematopoyéticos, así como en células endoteliales, células madre hematopoyéticas nacientes y el estroma del cordón umbilical. Sin embargo, en la vasculatura adulta quiescente, el ARNm de VEGFR-2 parece estar regulado por disminución.

El dominio extracelular de VEGFR-2 contiene 18 sitios de glicosilación potenciales conectados a N. El VEGFR-2 se sintetiza inicialmente como una proteína de 150 kDa y se glicosila rápidamente a una forma intermedia de 200 kDa, y después se glicosila adicionalmente a una velocidad más lenta a una proteína madura de 230 kDa que se expresa sobre la superficie celular.

En este contexto, los términos "aproximadamente" o "de manera aproximada" significan de 80% a 120%, alternativamente de 90% a 110%, incluyendo de 95% a 105% de un valor o intervalo dado.

En el contexto de la presente invención, el término "proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de

identidad de secuencia con una proteína dada (la proteína de referencia) se refiere a una proteína que puede diferir en la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína de referencia. La proteína puede ser de origen natural, p. ej., una versión mutante de una proteína de tipo salvaje, p. ej., una versión mutante de una proteína receptora de VEGF de tipo salvaje, o un homólogo de una especie diferente, o una proteína modificada mediante ingeniería genética, p. ej., una proteína receptora de VEGF modificada mediante ingeniería genética. Se sabe que el uso de codones es diferente entre especies. Por lo tanto, cuando se expresa una proteína heteróloga en una célula diana, puede ser necesario, o al menos útil, adaptar la secuencia de ácido nucleico al uso de codones de la célula diana. Los métodos para diseñar y construir derivados de una proteína dada son bien conocidos por cualquier experto en la técnica.

La proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una proteína dada puede contener una o más mutaciones que comprenden una adición, una delección y/o una sustitución de uno o más aminoácidos en comparación con la proteína de referencia dada. De acuerdo con la enseñanza de la presente invención, dichos aminoácidos suprimidos, añadidos y/o sustituidos pueden ser aminoácidos consecutivos o pueden intercalarse a lo largo de la longitud de la secuencia de aminoácidos de la proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una proteína de referencia dada. De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, se puede añadir, eliminar y/o sustituir cualquier número de aminoácidos, siempre que la identidad de la secuencia de aminoácidos con la proteína de referencia sea al menos aproximadamente 80% y la proteína mutada sea inmunogénica. Preferiblemente, la inmunogenicidad de la proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con una proteína de referencia de una secuencia de aminoácidos dada se reduce en menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 5% o menos de 1% en comparación con la proteína de referencia de la secuencia de aminoácidos dada, medida mediante ELISA. Los métodos para diseñar y construir homólogos de proteína y para probar tales homólogos para determinar su potencial inmunogénico son bien conocidos por cualquier experto en la técnica. En realizaciones particulares, la identidad de secuencia con la proteína de referencia es al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90% o lo más particularmente al menos aproximadamente 95%. Los métodos y algoritmos para determinar la identidad de secuencia que incluyen la comparación de una proteína parental y su derivado que tiene delecciones, adiciones y/o sustituciones con respecto a una secuencia parental, son bien conocidos por el experto con un conocimiento práctico normal en la técnica. A nivel de ADN, las secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la proteína receptora de VEGF pueden diferir en mayor medida debido a la degeneración del código genético.

En realizaciones particulares, VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori de pMB1 y un promotor de CMV. En realizaciones particulares, la molécula de ADN recombinante se obtiene de plásmido de expresión pVAX1™ disponible comercialmente (Invitrogen, San Diego, California). Este vector de expresión se modificó reemplazando el origen de replicación pUC de alto número de copias por el origen de replicación pMB1 de bajo número de copias de pBR322. La modificación de bajo número de copias se realizó con el fin de reducir la carga metabólica y hacer la construcción más estable. El esqueleto del vector de expresión generado se denominó pVAX10.

En realizaciones particulares, la molécula de ADN y la molécula de ADN adicional comprenden la secuencia de ADN encontrada en SEQ ID NO 2 (esqueleto del vector pVAX10).

La inserción del ORF que codifica la proteína receptora de VEGF con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 9 en esta cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 (documento WO 2013/091898). El plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 se representa esquemáticamente en la Figura 16. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.VR2-1 se denomina VXM01 (documento WO 2013/091898).

La inserción del ORF humano, truncado, que codifica WT1 con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 10 en la cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.hWT1. El plásmido de expresión pVAX10.hWT1 se representa esquemáticamente en la Figura 17. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.hWT1 se denomina VXM06 (documento WO 2014/173542).

La inserción de MSLN humano que codifica el ORF con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 11 en la cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.hMSLN. El plásmido de expresión pVAX10.hMSLN se representa esquemáticamente en la Figura 18. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.hMSLN se denomina VXM04.

La inserción del ORF que codifica el CEA humano con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 12 en la cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.hCEA. El plásmido de expresión pVAX10.hCEA se representa esquemáticamente en la Figura 19. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.hCEA

se denomina VXM08.

La inserción del ORF que codifica pp65 de CMV con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 13 en la cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_1. El plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_1 se representa esquemáticamente en la Figura 20. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_1 se denomina VXM65_1.

La inserción del ORF que codifica pp65 de CMV con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 14 en la cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_2. El plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_2 se representa esquemáticamente en la Figura 21. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_2 se denomina VXM65_2.

La inserción del ORF que codifica pp65 de CMV con la secuencia de ácido nucleico encontrada en SEQ ID NO 15 en la cadena principal del vector de expresión a través de *NheI/XhoI* proporcionó el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_3. El plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_3 se representa esquemáticamente en la Figura 22. La vacuna de ADN que comprende la cepa Ty21a de *Salmonella* atenuada que alberga el plásmido de expresión pVAX10.CMVpp65_3 se denomina VXM65_3.

En realizaciones particulares, el antígeno tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, Mesotelina (MSLN) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma y pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, y el antígeno del estroma tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en Proteína de Activación de Fibroblastos (FAP) humana.

En realizaciones particulares, la Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3, la Mesotelina (MSLN) humana tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4, CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5, y pp65 de CMV tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6, o SEQ ID NO 7, o SEQ ID NO 8.

La mesotelina es una glicoproteína de la superficie celular de 40 kDa presente en células mesoteliales normales y expresada en exceso en varios tumores humanos, incluyendo mesotelioma y adenocarcinoma de ovario y pancreático. El gen de mesotelina codifica una proteína precursora de 71 kDa que se procesa para producir una proteína de desprendimiento de 31 kDa denominada factor potenciador de megacariocitos (MPF) y el fragmento de mesotelina unido a células de 40 kDa. Se demostró que la mesotelina mostraba actividad formadora de colonias de megacariocitos en presencia de interleucina-3. La mesotelina es un antígeno de diferenciación tumoral presente a niveles bajos en un conjunto restringido de tejidos adultos normales, tales como mesotelio, pero expresada en exceso de manera aberrante en una amplia variedad de tumores humanos incluyendo mesoteliomas, cánceres de ovario y pancreático, carcinomas de células escamosas del cuello uterino, cabeza y cuello, vulva, pulmón y esófago, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas endometriales, sarcomas sinoviales bifásicos, tumores desmoplásicos de células redondas pequeñas y adenocarcinomas gástricos. La función biológica normal de la Mesotelina es desconocida. Los estudios en ratones con el gen de mesotelina inactivado no revelaron fenotipo detectable, y tanto los ratones macho como los hembra produjeron descendientes sanos. Estudios en cáncer pancreático sugieren que la mesotelina desempeña un papel en la tumorigénesis aumentando la proliferación celular, migración y poblaciones celulares en fase S. Además, hay evidencia de que la mesotelina es una proteína inmunogénica. Debido a su perfil de expresión, sus funciones oncogénicas y su potencial inmunogénico, el antígeno tumoral mesotelina es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

El gen 1 del tumor de Wilms (WT1) codifica un factor de transcripción de dedos de cinc implicado en la proliferación y diferenciación celulares. La proteína WT1 contiene cuatro motivos de dedos de cinc en el extremo C-terminal y un dominio de unión a ADN rico en prolina/glutamina en el extremo N-terminal. Se han caracterizado bien variantes de transcritos múltiples, resultantes del corte y empalme alternativo en dos exones codificantes. WT1 desempeña un papel esencial en el desarrollo del sistema urogenital y está implicado en la proliferación y diferenciación celulares. El gen WT1 se aisló como el gen responsable de un neoplasma renal infantil, tumor de Wilms. Se expresa altamente en una amplia variedad de neoplasias malignas, incluyendo varios tipos de neoplasias malignas hematológicas y varios tumores sólidos. Por el contrario, la expresión tisular normal de WT1 en adultos está restringida a gónadas, útero, riñón, mesotelio y células progenitoras en diversos tipos de tejidos. WT-1 afecta negativamente a la diferenciación y promueve la proliferación de células progenitoras. Además, WT1 expresado en exceso es inmunogénico; se han

observado células T específicas de WT1, así como anticuerpos anti-WT1 de IgG en pacientes con cáncer. Debido a su perfil de expresión, sus funciones oncogénicas y su potencial inmunogénico, el antígeno tumoral WT1 es un candidato prometedor para el desarrollo de vacunas contra el cáncer.

5 En realizaciones particulares, WT1 está truncada. En realizaciones particulares, se elimina el dominio de dedos de cinc de WT1. En realizaciones particulares, la WT1 truncada tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3.

10 El dominio de dedos de cinc en el extremo C-terminal de WT1 comprende cuatro motivos de dedos de cinc. WT1 truncada de la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3 representa los aminoácidos 1 a 371 de UniProt ref P19544-7. La delección del dominio de dedos de cinc minimiza el riesgo de reactividad cruzada inmunológica con otros factores de transcripción que contienen dedos de cinc. Además, WT1 truncada que carece del dominio de dedos de cinc tiene un potencial inmunogénico mayor que WT1 de longitud completa. Además, la delección de los motivos de dedos de cinc, que son esenciales para la unión al ADN, anula el potencial oncogénico de WT1, minimizando así el riesgo de oncogénesis.

15 La proteína del tegumento pp65 de CMV es una proteína inmunodominante principal del citomegalovirus humano (CMV). La función biológica de pp65 de CMV no está clara, pero se cree que está implicada en la regulación del ciclo celular. La pp65 de CMV es una proteína nucleotrópica que muestra actividad proteína quinasa, que es capaz de unirse a la quinasa 1 de tipo polo (PLK-1).

La pp65 de HCMV se expresa en más de 90% de especímenes de glioblastoma, pero no en el cerebro normal circundante. Esta proteína viral es por tanto un candidato prometedor como diana específica de tumores para el desarrollo de nuevas inmunoterapias contra el cáncer.

20 La proteína pp65 de CMV contiene dos señales de localización nuclear (NLS) bipartitas en los aminoácidos 415 a 438 y los aminoácidos 537 a 561 cerca del extremo carboxi y un sitio de unión a fosfato relacionado con su actividad quinasa en la lisina 436. La mutación de la lisina en la posición 436 a asparragina y la delección de los aminoácidos 537 a 561 da como resultado una proteína sin actividad quinasa y una localización nuclear notablemente reducida. Esta proteína mutante presenta inmunogenicidad inalterada.

25 En realizaciones particulares, la pp65 de CMV tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6. SEQ ID NO 6 representa la secuencia de aminoácidos de pp65 de CMV humano de tipo salvaje.

En otras realizaciones particulares, la pp65 de CMV tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 7. SEQ ID NO 7 representa la secuencia de aminoácidos de pp65 de CMV humano, que alberga la mutación K436N con respecto a pp65 de CMV humano de tipo salvaje de SEQ ID NO 6.

30 En otras realizaciones particulares, la pp65 de CMV tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 8. SEQ ID NO 8 representa la secuencia de aminoácidos de una versión truncada de pp65 de CMV de SEQ ID NO 7, que carece de la segunda NLS (secuencia de localización nuclear) más C-terminal (es decir, los aminoácidos 537 a 561 de pp65 de CMV de SEQ ID NO 7).

35 El antígeno carcinoembrionario (CEA) (también conocido como CEACAM5 y CD66e) es un miembro de una familia de glicoproteínas ancladas a la superficie celular de glicosil fosfatidil inositol (GPI) altamente relacionadas implicadas en la adhesión celular. El CEA se produce normalmente en el tejido gastrointestinal durante el desarrollo fetal; la expresión de proteínas finaliza antes del nacimiento. Por lo tanto, el CEA está presente normalmente sólo a niveles muy bajos en la sangre de adultos sanos. Sin embargo, los niveles séricos se elevan en algunos tipos de cáncer, en particular carcinoma colorrectal, sirviendo así como marcador tumoral. Los niveles de CEA también pueden aumentar en carcinoma gástrico, carcinoma pancreático, carcinoma pulmonar, carcinoma de mama y carcinoma medular de tiroides, así como algunas afecciones no neoplásicas como colitis ulcerosa, pancreatitis, cirrosis, EPOC, enfermedad de Crohn e hipotiroidismo.

40 En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella se administra simultáneamente a, o antes de, dicho agente anticanceroso adicional, es decir, simultáneamente a, o antes de, dicha al menos una vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, dicho al menos un inhibidor de punto de control, dicha al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética y/o dicho al menos un anticuerpo biespecífico.

En el contexto de la presente invención, el término "simultáneamente a" significa la administración de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF y el al menos un agente anticanceroso adicional el mismo día, más particularmente en el plazo de 12 horas, más particularmente en el plazo de 2 horas.

50 En realizaciones particulares, la administración de la cepa de Salmonella atenuada que codifica una proteína receptora de VEGF y el al menos un agente anticanceroso adicional se produce en ocho semanas consecutivas, más particularmente en tres a seis semanas consecutivas. La cepa de Salmonella atenuada de acuerdo con la presente invención y el al menos un agente anticanceroso adicional se pueden administrar por la misma vía o por vías diferentes.

55 En realizaciones particulares, el tratamiento está acompañado por quimioterapia, radioterapia o terapia biológica contra el cáncer. Para la curación del cáncer, puede ser esencial la erradicación completa de las células madre

cancerosas. Para una eficacia máxima, puede ser beneficiosa una combinación de diferentes enfoques terapéuticos.

En el contexto de la presente invención, el término "terapia biológica contra el cáncer" se refiere a la terapia contra el cáncer que implica el uso de sustancias derivadas de organismos vivos o versiones producidas en laboratorio de tales sustancias. Los enfoques de terapia biológica contra el cáncer incluyen la administración de citocinas inmunoestimuladoras.

Los agentes quimioterapéuticos que se pueden utilizar combinados con la cepa mutante atenuada de Salmonella de la presente invención pueden ser, por ejemplo: gemcitabina, amifostina (etiol), cabazitaxel, cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, docetaxel, mecloretamina, estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), doxorubicina lipo (doxil), ácido folínico, gemcitabina (gemzar), daunorrubicina, daunorrubicina lipo (daunoxoma), procarbazona, cetozonazol, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo (5-FU), vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxótero), aldesleucina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, camptotecina, CPT-11, 10-hidroxi-7-etil-camptotecina (SN38), dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiurea, ifosfamida, idarrubicina, mesna, interferón alfa, interferón beta, irinotecán, mitoxantrona, topotecán, leuprolida, megestrol, melfalán, mercaptopurina, oxaliplatino, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo y combinaciones de los mismos.

Los agentes quimioterapéuticos más preferidos de acuerdo con la invención son cabazitaxel, carboplatino, oxaliplatino, cisplatino, ciclofosfamida, docetaxel, gemcitabina, doxorubicina, paclitaxel (taxol), irinotecán, vincristina, vinblastina, vinorelbina, ácido folínico, 5-fluorouracilo y bleomicina, especialmente gemcitabina.

Particularmente, la cepa atenuada de Salmonella se administra antes o durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia o la terapia biológica contra el cáncer. En otras realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella se administra antes y durante el ciclo de tratamiento con quimioterapia o radioterapia o la terapia biológica contra el cáncer.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella se administran por vía oral. La administración oral es más sencilla, segura y más cómoda que la administración parenteral. Sin embargo, debe observarse que la cepa atenuada de Salmonella de la presente invención también se puede administrar por cualquier otra vía adecuada. Preferiblemente, se administra una dosis terapéuticamente eficaz al sujeto, y esta dosis depende de la aplicación particular, el tipo de tumor maligno, el peso del sujeto, la edad, el sexo y el estado de salud, la manera de administración y la formulación, etc. La administración puede ser única o múltiple, según se requiera.

La cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral se pueden proporcionar en forma de una solución, una suspensión, un producto liofilizado, una cápsula con recubrimiento entérico o cualquier otra forma adecuada. Típicamente, la cepa atenuada de Salmonella se formula como solución bebible. Esta realización ofrece la ventaja de una mejor adaptabilidad al paciente. Preferiblemente, la solución bebible comprende medios para neutralizar ácidos gástricos al menos en un cierto grado, es decir, para llevar el pH del jugo gástrico más cerca de un pH de 7. Preferiblemente, la solución bebible es una suspensión tamponada que comprende la cepa atenuada de Salmonella según la presente invención. En una realización particular, la suspensión tamponada se obtiene suspendiendo la cepa atenuada de Salmonella en un tampón adecuado, que contiene preferiblemente 2,6 g de hidrogenocarbonato sódico, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidratada y 100 ml de agua potable.

El al menos un agente anticanceroso adicional seleccionado entre al menos un inhibidor de punto de control, al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética y al menos un anticuerpo biespecífico que presenta especificidad de unión para una proteína de superficie de células T y para un antígeno tumoral o para un antígeno del estroma tumoral se administra preferentemente en la formulación galénica aprobada del producto comercial.

En realizaciones particulares, el cáncer se selecciona entre cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, mesotelioma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino.

La cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF junto con otro agente anticanceroso, tal como al menos un inhibidor de puntos de control, anticuerpo biespecífico, célula T modificada mediante ingeniería genética y vacuna de ADN que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral muestran sorprendentemente efectos sinérgicos sobre respuestas de células T y/o supervivencia global a dosis relativamente bajas de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF. De manera similar, las vacunas de ADN que comprenden una cepa atenuada de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral son sorprendentemente eficaces a dosis relativamente bajas. La administración de dosis bajas de vacunas bacterianas vivas minimiza el riesgo de excreción y, por tanto, de transmisión a terceras partes.

En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella comprende de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^{11} , particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^{10} , más particularmente de aproximadamente 10^6 a aproximadamente

10⁹, más particularmente de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10⁸, lo más particularmente de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC).

En realizaciones particulares, la dosis única tanto de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF como de la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral son esencialmente las mismas, comprendiendo ambas dosis únicas de aproximadamente 10⁵ a aproximadamente 10¹¹, particularmente de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10¹⁰, más particularmente de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10⁹, más particularmente de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10⁸, lo más particularmente de aproximadamente 10⁶ a aproximadamente 10⁷ unidades formadoras de colonias (UFC). En realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF es de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces menor que la dosis única de la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral. En otras realizaciones particulares, la dosis única de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF es de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces mayor que la dosis única de la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.

En este contexto, los términos "aproximadamente" o "de manera aproximada" significan dentro de un factor de 3, alternativamente dentro de un factor de 2, incluyendo dentro de un factor de 1,5 de un valor o intervalo dados.

En realizaciones particulares, el tratamiento es inmunoterapia individualizada contra el cáncer que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión de, y/o la respuesta pre-inmunitaria contra, dicho antígeno tumoral en un paciente. El patrón de expresión de antígeno tumoral y/o estromal del paciente y/o las respuestas pre-inmunitarias del paciente contra antígenos tumorales y/o estromales se pueden evaluar en una primera etapa, por ejemplo, mediante diagnóstico complementario que se dirige al patrón de antígeno tumoral y/o estromal específico del paciente. Dependiendo del patrón de expresión del antígeno tumoral y/o estromal del paciente o las respuestas pre-inmunitarias del paciente contra antígenos tumorales y/o estromales, la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF se puede administrar combinada con una o más vacunas contra el cáncer basadas en Salmonella typhi Ty21a adicionales adecuadas que comprenden sistemas de expresión eucarióticos.

Puede ser favorable, dependiendo de la aparición de posibles efectos secundarios, incluir el tratamiento con antibióticos o agentes antiinflamatorios.

Si se producen acontecimientos adversos que se asemejan a reacciones de hipersensibilidad mediadas por histamina, leucotrienos o citocinas, están disponibles opciones de tratamiento para fiebre, anafilaxia, inestabilidad de la presión sanguínea, broncoespasmo y disnea. Las opciones de tratamiento en caso de autoagresión derivada de células T no deseada se obtienen de esquemas de tratamiento convencionales en enfermedad de injerto frente a anfitrión aguda y crónica aplicada después del trasplante de células madre. La ciclosporina y los glucocorticoides se proponen como opciones de tratamiento.

En el caso improbable de infección sistémica de tipo Salmonella typhi Ty21a, se recomienda una terapia antibiótica apropiada, por ejemplo, con fluoroquinolonas incluyendo ciprofloxacina u ofloxacina. Las infecciones bacterianas del tracto gastrointestinal se van a tratar con los respectivos agentes, tales como rifaximina.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cepa atenuada de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión que codifica una proteína receptora de VEGF, en donde la composición farmacéutica comprende adicionalmente al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM06.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM04.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM08.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica comprende las vacunas de ADN VXM01 y VXM65.

En realizaciones particulares, la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral seleccionados del grupo que consiste en Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, Mesotelina (MSLN) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos

encontrada en SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma y pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, particularmente en donde la Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3, Mesotelina (MSLN) humana tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4, CEA humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5, y pp65 de CMV tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6, SEQ ID NO 7 o SEQ ID NO 8, y en donde el antígeno del estroma tumoral se selecciona entre la proteína de activación de fibroblastos (FAP).

La composición farmacéutica de la presente invención puede estar en forma de una solución, una suspensión, una cápsula con recubrimiento entérico, un polvo liofilizado o cualquier otra forma adecuada para el uso pretendido.

La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender adicionalmente uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

En el contexto de la presente invención, el término "excipiente" se refiere a una sustancia natural o sintética formulada junto con el ingrediente activo de una medicación. Los excipientes adecuados incluyen antiadherentes, aglutinantes, recubrimientos, disgregantes, aromatizantes, colorantes, lubricantes, deslizantes, adsorbentes, conservantes y edulcorantes.

En el contexto de la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y otros ingredientes de composiciones farmacéuticas que son fisiológicamente tolerables y que típicamente no producen reacciones adversas cuando se administran a un mamífero (p. ej., un ser humano). El término "farmacéuticamente aceptable" también puede significar aprobado por una agencia reguladora de un gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en mamíferos y, más particularmente, en seres humanos.

En realizaciones particulares, en donde el agente anticanceroso se selecciona entre al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella que comprende alojar un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede proporcionarse adecuadamente como solución bebible. Esta realización ofrece la ventaja de una mejor conformidad del paciente y permite programas de vacunación en masa rápidos, factibles y asequibles, especialmente en geografías pobres.

En particular, las soluciones bebibles adecuadas comprenden medios para neutralizar los ácidos gástricos al menos en un cierto grado, es decir, para llevar el pH del jugo gástrico más cerca de un pH de 7. En una realización particular, la solución bebible es una suspensión tamponada obtenida suspendiendo la cepa atenuada de Salmonella según la presente invención en un tampón adecuado, preferiblemente en un tampón que neutralice los ácidos gástricos al menos hasta un cierto grado, preferiblemente en un tampón que contenga 2,6 g de hidrogenocarbonato sódico, 1,7 g de ácido L-ascórbico, 0,2 g de lactosa monohidratada y 100 ml de agua potable.

En realizaciones particulares, la cepa atenuada de Salmonella y la al menos una cepa atenuada adicional de Salmonella es Salmonella typhi Ty21a.

En realizaciones particulares, el casete de expresión y el casete de expresión adicional son un casete de expresión eucariótico, que comprende particularmente un promotor de CMV.

En realizaciones particulares, la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma.

En realizaciones particulares, VEGFR-2 humano tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1.

En realizaciones particulares, la composición farmacéutica es para su uso como medicamento, particularmente para su uso en el tratamiento del cáncer.

En realizaciones particulares, el tratamiento comprende una única o múltiples administraciones de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF o la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención. La dosis única de las administraciones puede ser la misma o diferente. En particular, el tratamiento comprende 1, 2, 3, 4, 5 o 6 administraciones de la cepa atenuada de Salmonella que codifica una proteína receptora de VEGF o la composición farmacéutica según la presente invención, preferiblemente en donde las múltiples administraciones se producen en el plazo de tres a seis meses consecutivos.

Breve descripción de las figuras y tablas

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de VEGFR-2 humano codificada por el ADNc de VEGFR-2 contenido en el plásmido pVAX10.VR2-1 (correspondiente a SEC ID NO 1)

Figura 2: Secuencia de ácido nucleico comprendida en el vector de expresión vacío pVAX10 (secuencia del vector de expresión pVAX10 sin la porción del sitio de clonación múltiple que está localizada entre los sitios de restricción

NheI y *XhoI* (SEQ ID NO 2).

Figura 3: Secuencia de aminoácidos de WT-1 humana truncada codificada por ADNc de WT-1 contenido en el plásmido pVAX10.hWT1 (SEC ID NO 3)

5 Figura 4: Secuencia de aminoácidos de MSLN humana codificada por ADNc de MSLN contenido en el plásmido pVAX10.hMSLN (SEC ID NO 4)

Figura 5: Secuencia de aminoácidos de CEA humano codificada por ADNc de CEA contenido en el plásmido pVAX10.hCEA (SEC ID NO 5)

Figura 6: Secuencia de aminoácidos de pp65 de CMV codificada por el ADNc de pp65 de CMV contenido en el plásmido pVAX10.CMVpp65_1 (SEC ID NO 6)

10 Figura 7: Secuencia de aminoácidos de pp65 de CMV codificada por el ADNc de pp65 de CMV contenido en el plásmido pVAX10.CMVpp65_2 (SEC ID NO 7)

Figura 8: Secuencia de aminoácidos de pp65 de CMV codificada por el ADNc de pp65 de CMV contenido en el plásmido pVAX10.CMVpp65_3 (SEC ID NO 8)

15 Figura 9: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.VR2-1 y que codifica VEGFR-2 humano de SEQ ID NO 1

Figura 10: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.hWT1 y que codifica WT-1 humana de SEQ ID NO 3

Figura 11: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.hMSLN y que codifica MSLN humana de la SEQ ID NO 4

20 Figura 12: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.hCEA y que codifica CEA humano de SEQ ID NO 5

Figura 13: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.CMVpp65_1 y que codifica pp65 de CMV de SEQ ID NO 6

25 Figura 14: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.CMVpp65_2 y que codifica pp65 de CMV de SEQ ID NO 7

Figura 15: Secuencia de ácido nucleico contenida en el plásmido pVAX10.CMVpp65_3 y que codifica pp65 de CMV de SEQ ID NO 8

Figura 16: Mapa plasmídico de pVAX10.VR2-1

Figura 17: Mapa plasmídico de pVAX10.hWT1

30 Figura 18: Mapa plasmídico de pVAX10.hMSLN

Figura 19: Mapa plasmídico de pVAX10.hCEA

Figura 20: Mapa plasmídico de pVAX10.CMVpp65_1

Figura 21: Mapa plasmídico de pVAX10.CMVpp65_2

Figura 22: Mapa plasmídico de pVAX10.CMVpp65_3

35 Figura 23: Efectos de la administración combinada de VXM01 y anti-CTLA4 en un modelo tumoral de ratón MC38 - crecimiento tumoral

Figura 24: Efectos de la administración combinada de VXM01 y anti-CTLA4 en un modelo tumoral de ratón MC38 - supervivencia

40 Figura 25: Efectos de la administración combinada de VXM01 y anti-CTLA4 en modelo tumoral de ratón B16 - supervivencia

Figura 26: Programa de tratamiento Ejemplo 3

Figura 27: Efecto del tratamiento con VXM01 con o sin ciclofosfamida sobre el tamaño tumoral [mm³] el día 30. Cada punto representa el resultado del tumor de un animal.

45 Figura 28: Porcentajes de células CD8⁺ específicas de VEGFR-2 en bazo de ratones BALB/C que portan células de tumor de colon CT26 subcutáneo. Cada punto representa los resultados de un bazo. Los resultados se

proporcionan en % total de 3 pentámeros de VEGFR2 agrupados.

Figura 29: Tinción inmunohistoquímica anti-CD3 de muestras tumorales de animales tratados con el vector vacío y VXM01, respectivamente. Las células positivas para CD3 aparecen en color pardo (véase la flecha, por ejemplo); aumento x200.

5 Figura 30: Cuantificación de productos infiltrados de células inmunitarias y multiplicidad de inducción media de PD-L1 en muestras tumorales de animales tratados con VXM01 o VXM01 más ciclofosfamida en comparación con animales tratados con el control de vector vacío. Los datos se obtienen del recuento absoluto de células/área de tejido [mm²]; aumento x200.

10 Figura 31: Porcentajes de células CD8⁺ específicas de VEGFR-2 y CEA en bazo de ratones sanos tratados con ratones que portan células tumorales de colon CT26 subcutáneo. Cada punto representa los resultados de un bazo. Los resultados se proporcionan en % total de 2 pentámeros de VEGFR2 agrupados.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudio de combinación con anti-CTLA4 para carcinoma de colon MC38:

15 Se sensibilizaron cuatro grupos de ratones C57/Bl6/6J (n=6 cada uno) con una administración subcutánea de 5x10⁵ células tumorales MC38 el Día 0 del estudio.

Los animales se trataron con VXM01 mlow (Salmonella typhimurium que portaba un casete de expresión eucariótico que codificaba VEGFR-2 murino, fabricado por Richter-Helm BioLogics, Hannover, Alemania) solo a una dosis de 10⁸ UFC mediante sonda oral el Día -1, Día 1, Día 4 y Día 6 (n=6), o con VXM01 mlow a la misma dosis, vía de administración y esquema de administración más el anticuerpo anti-CTLA4 murino el Día 12, 14, 16 y 18 (n=6), o con el anticuerpo anti-CTLA4 murino el Día 12, 14, 16 y 18 solo (n=6), o sin tratamiento (n=6, control).

El crecimiento tumoral se midió usando un microcalibre. Los animales se sacrificaron tan pronto como el volumen tumoral alcanzó 1500 mm³ por razones de bienestar animal.

La supervivencia de los animales de prueba se registró una vez al día.

El crecimiento tumoral se representa gráficamente en la Figura 23.

25 La supervivencia de los animales de prueba se representa en un gráfico de Kaplan-Meier en la Figura 24.

Ejemplo 2: Estudio de combinación de anti-CTLA4 para melanoma B16-F10:

Se sensibilizaron cuatro grupos de ratones C57/Bl6/6J (n=6 cada uno) con una administración intravenosa de 2x10⁵ células tumorales B16-F10 el Día 0 del estudio.

30 Los animales se trataron con VXM01 mlow (Salmonella typhimurium que portaba un casete de expresión eucariótico que codificaba VEGFR-2 murino, fabricado por Richter-Helm BioLogics, Hannover, Alemania) solo a una dosis de 10⁸ UFC mediante sonda oral el Día -5, Día -3, Día 0 y Día 2 (n=6), o con VXM01 mlow a la misma dosis, vía de administración y esquema de administración más el anticuerpo anti-CTLA4 murino el Día 8, 10, 12 y 14 (n=6), o con el anticuerpo anti-CTLA4 murino el Día 8, 10, 12 y 14 solo (n=6), o sin tratamiento (n=6, control).

La supervivencia de los animales de ensayo se registró una vez al día.

35 La supervivencia de los animales de ensayo se representa en un gráfico de Kaplan-Meier en la Figura 25.

Ejemplo 3: Actividad antitumoral de la vacuna de VMX01 en el modelo tumoral murino CT26

El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antitumoral de VXM01 con o sin ciclofosfamida en ratones BALB/C que portaban tumores de colon subcutáneos CT26, y caracterizar las respuestas inmunitarias provocadas por los tratamientos en bazo y tumor.

40 Se administraron VXM0m-vacío de control (control de vector de S. typhimurium sin plásmido de expresión) y VXM01 mlow (Salmonella typhimurium que portaba un casete de expresión eucariótico que codificaba VEGFR-2 murino) a 10⁸ UFC/adm mediante sonda oral (per os, PO) a través de un tubo de sonda. Independientemente de los grupos de animales, cada animal recibió tampón de aplicación PO antes de la dosis para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación (100 pl/animal/aplicación). Este tampón se compuso mediante disolución de 2,6 g de hidrogenocarbonato sódico, 1,7 g de ácido L-ascórbico y 0,2 g de lactosa monohidratada en 100 ml de agua potable y se aplicó 30 min antes de la aplicación de VXM0m-vacío o VXM01 mlow.

Se inyectó ciclofosfamida a 100 mg/kg/adm en la cavidad peritoneal de ratones (intraperitonealmente, IP). El volumen de inyección IP no excedió de 10 ml/kg y se calculó según el peso corporal más reciente de los ratones.

El tratamiento comenzó el día 0 (D0), un día después de la aleatorización que se consideró como el día -1 (D-1). Se

aleatorizaron 33 ratones BALB/C hembra sanos (BALB/CByJ), de 6 semanas de edad, según su peso corporal en 4 grupos de 11 animales cada uno utilizando un soporte lógico Vivo Manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). Se realizó una prueba estadística (análisis de varianza) para probar la homogeneidad entre grupos.

El programa de tratamiento fue el siguiente:

- 5 Grupo 1: Los animales del grupo 1 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM0m vacío en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.

Grupo 2: Los animales del grupo 2 recibieron un total de 6 administraciones PO de ratones VXM01 mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.

- 10 Grupo 3: Los animales del grupo 3 recibieron una única inyección IP de ciclofosfamida en D0 y un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.

El programa de tratamiento se resume en la Tabla 1 y la Figura 26.

Tab. 1: Programa de tratamiento					
Grupo	Núm. Animales	Tratamiento	Dosis	Vía	Programa de tratamiento
1*	11	Vector vacío	10 ⁸ UFC/adm	PO	D1, D3, D5, D7, D14 y D21
2*	11	VXM01 mlow	10 ⁸ UFC/adm	PO	D1, D3, D5, D7, D14 y D21
3*	11	VXM01 mlow	10 ⁸ UFC/adm	PO	D1, D3, D5, D7, D14 y D21
		Ciclofosfamida	100 mg/kg/adm	IP	D0
TOTAL	33				
* Cada animal recibió tampón de aplicación predosis por vía oral (PO) para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación					

Los tumores se indujeron mediante inyección subcutánea de 1x10⁶ células CT26 en 200 µl de RPMI 1640 en el flanco derecho de los animales de prueba el día 8 (D8).

- 15 El día de la terminación (D30, es decir, 22 días después de la inoculación del tumor), se recogieron los tumores de todos los ratones y se midió el tamaño tumoral.

Los resultados se representan gráficamente en la Figura 27. El tamaño tumoral disminuyó significativamente en los animales tratados con VXM01 solo o con VXM01 más ciclofosfamida en comparación con el control de vector vacío. La reducción del tamaño tumoral fue más pronunciada en los animales tratados tanto con ciclofosfamida como con la vacuna de VXM01.

- 20

El día de la terminación, se recogieron los bazo de todos los ratones (11 muestras por grupo) y se colocaron individualmente en tubos que contenían PBS enfriado (2-8°C). Se realizó la inmunomonitorización de respuestas de células T específicas de VEGFR-2 utilizando citometría de flujo con pentámeros.

- 25 Para este propósito, las muestras de bazo se lavaron con PBS y posteriormente se homogeneizaron sumergiéndolas a través de un filtro de nylon para células de 100 µm. Durante la homogeneización, el filtro se enjuagó varias veces con PBS estéril frío. Las muestras se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos a 2-8 °C, el sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió en 2 ml de tampón de lisis de glóbulos rojos ACK (1 ml de tampón por bazo). Las células se incubaron en el tampón de lisis durante 1 min a TA. Después, se añadió PBS a 40 ml para detener la lisis y la suspensión celular se tamizó a través de un nuevo filtro (40 µm) y el flujo continuo se recogió en un nuevo tubo de 50 ml. Después de la centrifugación a 1500 rpm durante 10 min a 2-8°C, el sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 5 ml de medio DMEM complementado con IL-2. Las células se incubaron durante la noche a 37°C y 5% de CO₂.

- 30

Antes de la tinción del pentámero, se realizó una tinción para células vivas/muertas (L/D) usando el Live Dead (L/D) Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit de Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el fin de excluir las células muertas mediante selección en la población negativa.

- 35

La tinción de pentámeros se realizó utilizando Pro5® Recombinant MHC Pentamers de Proimmune, Oxford, Reino Unido, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron los siguientes pentámeros de KDR (VEGFR-2).

H-2Kd - SYQYGTMQTL	KDR-STL
H-2Kd - KYLSYPAPDI	KDR-KDI
H-2Kd - RFVPDGNRI	KDR-RRI
H-2Kd - TYQSIMYIV	KDR-TIV
H-2Kd - DFLTLEHLI	KDR-DLI

Los resultados de la tinción de pentámeros se muestran en la Figura 28.

- 5 El número de células T citotóxicas CD8⁺ específicas de VEGFR-2 aumentaron significativamente en animales tratados con VXM01 solo o VXM01 más ciclofosfamida en comparación con el control de vector vacío. El tratamiento con ciclofosfamida junto con VXM01 aumentó significativamente la respuesta de pentámeros de KDR en comparación con la respuesta obtenida con la vacuna VXM01 sola.

Los tumores de 5 ratones en cada grupo se analizaron mediante inmunohistoquímica (IHC).

- 10 Para ello, los tumores se fijaron en formalina tamponada neutra al 10% durante 24 h a 48 h, se transfirieron a etanol y después se incluyeron en parafina. Las muestras incluidas se sometieron a tinción inmunohistoquímica. Los resultados se representan gráficamente en las Figuras 29 y 30.

- 15 Se encontró que el número medio de células T por unidad de tejido aumentó en los tumores de ratones tratados con VXM01 solo o con VXM01 más ciclofosfamida en comparación con el control de vector vacío. Se encontró que las poblaciones de células CD3⁺ y CD8⁺ aumentaron aproximadamente tres veces en las muestras tumorales de ratones tratados con VXM01 más ciclofosfamida y aproximadamente dos veces en muestras tumorales de ratones tratados con VXM01 solo. Asimismo, la población de células T CD4⁺ aumentó en los animales tratados con vacuna de VXM01 con y sin pretratamiento con ciclofosfamida, con un aumento de 1,7 veces en el número medio de células CD4⁺/área de tejido en ambos grupos de vacunas en comparación con el control de vector vacío.

- 20 Además, el número de células inmunitarias positivas para PD-1 aumentó en un factor de 2,0 y 2,1 y el tumor se enriqueció en células que expresaban PD-L1 tras el tratamiento con VXM01 como agente único o en combinado con ciclofosfamida, lo que indica claramente que el tratamiento con VXM01 podría aumentar la susceptibilidad de los tumores hacia el tratamiento con inhibidores del punto de control anti-PD-1 y anti-PD-L1.

Ejemplo 4: Estudio de combinación de VXM01/VXM08 en ratones C56BL/6J sanos

- 25 El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de VXM01 mlow y VXM08hm para desencadenar una respuesta inmunitaria en ratones sanos.

- 30 Se administraron VXM0m-vacío control (control de vector de *S. typhimurium* sin plásmido de expresión), vacuna de VXM01 mlow (*Salmonella typhimurium* que alberga un casete de expresión eucariótico que codifica VEGFR-2 murino) y vacuna de VXM08hm (*Salmonella typhimurium* que alberga un casete de expresión eucariótico que codifica CEA humano) a 10⁸ UFC/adm en 50 µl por aplicación mediante sonda oral (por vía oral, PO) a través de un tubo de sonda. Independientemente de los grupos de animales, cada animal recibió tampón de aplicación antes de la dosis PO para neutralizar el ácido en el estómago antes de la dosificación (50 µl/animal/aplicación antes de la administración de vacuna sola; 100 µl/animal/aplicación antes de la administración combinada de VXM01 y VXM08). Este tampón se compuso por disolución de 2,6 g de hidrogenocarbonato sódico, 1,7 g de ácido L-ascórbico y 0,2 g de lactosa monohidratada en 100 ml de agua potable y se aplicó 30 min antes de la aplicación de VXM0m-vacío, VXM01 mlow y/o VXM08hm.

Se aleatorizaron 40 ratones hembra sanos C57BL/6J, de 6-7 semanas de edad, el día 0 (D0) según su peso corporal en 5 grupos de 8 animales cada uno utilizando el soporte lógico Vivo Manager® (Biosystemes, Couternon, Francia). Se realizó un ensayo estadístico (análisis de varianza) para probar la homogeneidad entre grupos.

El programa de tratamiento fue el siguiente:

- 40 Grupo 1: Los animales del grupo 1 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM0m vacío en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.
- Grupo 2: Los animales del grupo 2 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21.
- 45 Grupo 3: Los animales del grupo 3 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM08hm en D2, D4, D6, D8, D15 y D22.

Grupo 4: Los animales del grupo 4 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D2, D4, D6, D8, D15 y D22 y un total de 6 administraciones PO de VXM08hm en D2, D4, D6, D8, D15 y D22.

Grupo 5: Los animales del grupo 5 recibieron un total de 6 administraciones PO de VXM01 mlow en D1, D3, D5, D7, D14 y D21 y un total de 6 administraciones PO de VXM08hm en D2, D4, D6, D8, D15 y D22.

5 El programa de tratamiento se resume en la Tabla 2.

Grupo	Núm. Ratones	Tratamiento	Dosis (UFC/adm)	Volumen (µl)	Vía	Programa de tratamiento
1	8	Vector vacío		50	PO	Cebado: D1, D3, D5, D7 Refuerzo: D14, D21
2	8	VXM01 mlow	10 ⁸	50	PO	Cebado: D1, D3, D5, D7 Refuerzo: D14, D21
3	8	VXM08hm	10 ⁸	50	PO	Cebado: D2, D4, D6, D8 Refuerzo: D15, D22
4	8	VXM01 mlow	10 ⁸	50	PO	Cebado: D2, D4, D6, D8 Refuerzo: D15 y D22
		VXM08hm* (concomitante)	10 ⁸	50	PO	Cebado: D2, D4, D6, D8 Refuerzo: D15, D22
5	8	VXM01 mlow	10 ⁸	50	PO	Cebado: D1, D3, D5, D7 Refuerzo: D14, D21
		VXM08hm (días alternos)	10 ⁸	50	PO	Cebado: D2, D4, D6, D8 Refuerzo: D15, D22
*VXM08 se administró justo después de VMX01, el mismo día de la aplicación						

El día de la terminación (es decir, D29), se recogieron los bazo de todos los ratones (8 muestras por grupo) y se colocaron individualmente en tubos que contenían PBS enfriado (2-8°C). Se realizó inmunomonitorización de respuestas de células T específicas de VEGFR-2 y CEA utilizando citometría de flujo con pentámeros. El análisis de pentámeros que incluía la tinción de células vivas/muertas anterior se realizó como se describe en el Ejemplo 3.

Se utilizaron los siguientes pentámeros de KDR (VEGFR-2) como mezcla agrupada en la misma proporción:

H-2Db-VILTNPISM	KDR2
H-2Db-FSNSTNDLI	KDR3

Se usaron los siguientes pentámeros de CEA como mezcla agrupada en la misma proporción:

H-2Db-CGIQNSVSA	CEA-CSA-Penta
H-2Db-LQLSNGNRTL	CEA-LTL-Penta
H-2Db-CGIQNKLSV	CEA-CSV-Penta

15 Los resultados de la tinción de pentámeros se muestran en la Figura 31. La frecuencia media de células T CD8⁺ específicas de VEGFR-2 (KDR) fue 1,71, 4,36 y 2,76 veces mayor en ratones tratados con VXM01 mlow VXM01 mlow/VXM08hm (concomitante) y VXM01 mlow/VXM08hm (días alternos) respectivamente que en el grupo de control. Los ratones tratados con VXM01 mlow/VXM08hm concomitantemente o en días alternos mostraron una frecuencia más alta de células T CD8⁺ específicas de VEGFR-2 en comparación con ratones tratados con VXM01 mlow solo.

20 Aunque no es estadísticamente significativo, la sinergia fue ligeramente mayor cuando se habían aplicado concomitantemente vacunas de VXM01 mlow y VXM08hm, es decir, el mismo día en comparación con el régimen de días alternos.

La frecuencia media de células T CD8⁺ específicas de CEA fue 1,29, 2,23 y 1,95 veces mayor en ratones tratados con

- 5 VXM08hm, VXM01 mlow/VXM08hm (concomitante) y VXM01 mlow/VXM08hm (días alternos) respectivamente que en el grupo de control. Los ratones tratados con VXM01 mlow/VXM08hm concomitantemente o en días alternos mostraron una frecuencia más alta de células CD8⁺ específicas de CEA en comparación con los ratones tratados con VXM08hm solo. Aunque no es estadísticamente significativo, la sinergia fue ligeramente mayor cuando se habían aplicado concomitantemente vacunas de VXM01 mlow y VXM08hm, es decir, el mismo día en comparación con el régimen de días alternos.

REIVINDICACIONES

1. Una cepa atenuada de *Salmonella typhi* Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN que comprende un casete de expresión eucariótico que codifica una proteína receptora de VEGF, para su uso en el tratamiento del cáncer, en donde el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética, que comprende al menos una proteína de unión a antígeno tumoral y/o al menos una proteína de unión a antígeno del estroma tumoral sobre su superficie celular.
2. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según la reivindicación 1, en donde la proteína receptora de VEGF se selecciona del grupo que consiste en VEGFR-2 humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 1 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma.
3. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula de ADN comprende el gen de resistencia al antibiótico kanamicina, el ori de pMB1 y un promotor de CMV.
4. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento comprende adicionalmente al menos un inhibidor de punto de control seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo contra PD-1, PD-L1 y CTLA4.
5. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento comprende adicionalmente la administración de al menos una cepa atenuada adicional de *Salmonella typhi* Ty21a que comprende al menos una copia de una molécula de ADN adicional que comprende un casete de expresión eucariótico adicional que codifica un antígeno tumoral o un antígeno del estroma tumoral.
6. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según la reivindicación 5, en donde dicho antígeno tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en Proteína Tumoral de Wilms (WT1) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 3 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, mesotelina (MSLN) humana que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 4 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, CEA humano que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 5 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 6 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 7 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, y pp65 de CMV que tiene la secuencia de aminoácidos encontrada en SEQ ID NO 8 y una proteína que comparte al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con la misma, y en donde dicho antígeno del estroma tumoral codificado por dicha cepa atenuada adicional de *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en proteína de activación de fibroblastos (FAP) humana.
7. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa atenuada de *Salmonella* se administra simultáneamente a, o antes de, dicha al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética.
8. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento está acompañado por quimioterapia o radioterapia.
9. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cepa atenuada de *Salmonella* se administra por vía oral.
10. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cáncer se selecciona entre cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, mesotelioma, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, glioblastoma, cáncer gástrico, cáncer hepatocelular, cáncer de células renales, cáncer de próstata y cáncer de cuello uterino.
11. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde una dosis única de la cepa atenuada de *Salmonella* comprende de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^9 unidades formadoras de colonias (UFC).
12. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tratamiento es inmunoterapia contra el cáncer individualizada que comprende la etapa de evaluar el patrón de expresión de y/o la respuesta preinmunitaria contra dicho antígeno tumoral en un paciente.
13. La cepa atenuada de *Salmonella* para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la al menos una célula T modificada mediante ingeniería genética comprende al menos una proteína de unión a antígeno tumoral sobre su superficie celular, en donde el antígeno tumoral se selecciona entre CEA, FBP, GD2, GD3, Her2-neu, MAGE-A1, MSLN, PSCA y PSMA.

Figura 1

10	20	30	40	50	60
MQSKVILLAVA LMLCVETRAA SVGLFESVSLD LFKLSIQKDI LTIFANTILQ ITCRQQRDLG					
70	80	90	100	110	120
WLRPNHQSGG EQRVEVTECS DGLFCKTLTI PKVIGNDTGA YKCFYRETOL ASVIYVYVQD					
130	140	150	160	170	180
YRSPFIASVS DQHGCVVITE NKNETVVIPI LGGISNLAVE LCARYPEKRF VPDGHRISWD					
190	200	210	220	230	240
SRKGFITPSY MISTYAGMYFC EAKINDESTQ SIMYIVVYVG YRIYDVVLSP SHGIELSGGE					
250	260	270	280	290	300
KLVLKCTART ELNVGIDFWH EYPSEHQHK KLVNBDLKTQ SGSEMKKFLS TLTIDGVTRG					
310	320	330	340	350	360
DQGLYTCAAG SGIMTKKXST FVEVHEKPFV AFGSGMESLV EATVGERVRI PAKYLGYPFP					
370	380	390	400	410	420
EIKWYKNGIP LRSNHTIKAG HVLTIMEVGE ROTQNTVIL TNPISHEKQS HVVSLVYVVP					
430	440	450	460	470	480
EQIGENGLIS PVDSYQYGTI QTLTCTVYAI PPPHHINWYW GLESECAWEP SQAVSVTHPY					
490	500	510	520	530	540
PCEWRSVED EQGGKIEVN HQQFALIEGK HRTVSTLVIQ AANVSALXEC ELVHEVGEQE					
550	560	570	580	590	600
RVISFHVTRG PEITLQFWMQ PTEQESVOLW CTADRSFEN LTRVYKLGQPF LFINVGELPT					
610	620	630	640	650	660
PVCKNLDTLW KLNATMFNS TNDILIMELE NABLQDQGDY VCLAQDBRTK ERRCVYRQLT					

Figura 1 (cont.)

670	680	690	700	710	720
VLERVAPTIT	ONLENQITTSI	GESIEVSCTA	SGNPPFPQIMW	PKOMETLVED	SGIVLKDQMR.
730	740	750	760	770	780
NLTIRRVREK	DEGLYTCQAC	SVLGCAYVEA	FFIIEGAQEK	TNLEIIILVG	TAVIAMFFWL
790	800	810	820	830	840
LLVILATVK	RANGCELKTC	YLSIVMOPDE	LPLDENECRL	FVDASKWEFP	RDLKLCEPL
850	860	870	880	890	900
GRGAPQGVIE	ADAFGIDKTA	TCNTVAVKML	KSGATHSEHR	AIMSELEILI	HIGHNLNVVN
910	920	930	940	950	960
LLGACTKPGG	FLWVIVEFCE	FGHLSTYLSA	KKNEFVPYKT	KCARFQCKD	YVGAIPVDLK
970	980	990	1000	1010	1020
RRLOSITSSQ	GGASGCFVEE	KSLGDVEEEE	APSOLYKDFL	TLEHLICYSF	QVANGMEFLA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
SRKCIHRDLA	ARNILLSEKN	VYKICDFGLA	KSIYKDPQYV	RKGDARLFLE	WNAFETIFDR
1090	1100	1110	1120	1130	1140
VYTIQSDVWS	FGVLLKEIFS	LGASPYFGVK	IDEEPCRRLE	ECTMRAFDY	TPPEMYQTNL
1150	1160	1170	1180	1190	1200
QWNHCEPSQR	PTFSSEVERL	GNLLQANAGQ	DKKDYIVLPI	SETLSMEEDS	QLSLPTSPVS
1210	1220	1230	1240	1250	1260
CNEEEVCCOF	KFRYDWTAGI	SGYLQWCKKK	SRPVSVKTFE	DIPLESPEVK	VIFDQHQDGS
1270	1280	1290	1300	1310	1320
QWVLASEELK	TLECRTELSP	SGQGNVPEKS	RESVASEGSN	QIGGYQSGYH	SSQTDTTVYS

Figura 1 (cont.)

1330	1340	1350
GEAEELKLI	EIOVDTGGA	QILQFDSQT
LEEFV		

Figura 2

TGGGCTTTTGGCTGGCCTTTTGGCTCACATGTTCTTGACTCTTCGCGATGTACGGGGCCA
 GATATACGCGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTC
 ATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCC
 GCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTT
 CCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGACTATTTACGGT
 AAACCTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG
 ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGG
 GACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATG
 CGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC
 AAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGG
 ACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGT
 GTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAAGTAGAGAACCCTGCTC
 TTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCC
 TCGAGTCTAGAGGGGCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGT
 TGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCGCTGCTTCTTGAACCTGGAAGGTGC
 CACTCCCCTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG
 GTGTCAATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTG
 GGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTACTGGG
 CGGTTTTATGGACAGCAAGCGAACCAGCAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAA
 GGTTGGGAAGCCCTGCAAAAGTAACTGGATGGCTTTCTCGCCGCCAAGGATCTGAT
 GGCGCAGGGGATCAAGCTCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATT
 GAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCC
 GCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCT
 GTCAGCGCAGGGGGCGCCGGTTCTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTG
 AATCAACTGCAAGACGAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTC
 CTTCGCGAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATT
 GGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAA
 GTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGCCGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG
 CCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTAATCGGATGGAA
 GCGGGCTTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAG
 CCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGT
 GACCCATGGCGATGCTGCTTCCCGAATATCATGGTGGAATATGGCCGCTTTTCTG
 GATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTT
 GGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCCGAATGGCTGACCGCTTCTC
 GTGCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCT
 TGACGAGTTCTTCTGAATTATTAACGCTTACAATTTCTGATGCGGTATTTCTCCTT
 ACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTG
 CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
 GACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATAGCACGTGCTAAAACCTTCATTTTAAAT
 TAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGT
 GAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCATCAGTGACCAAAACAGGAAAAAACC
 GCCCTTAACATGGCCCGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAACT
 CAACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCAC

Figura 2 (cont.)

GCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACT
 CTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGG
 AGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGGGCGCA
 GCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCA
 TCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATG
 CGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGC
 TCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
 ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCC
 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
 CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACC
 CGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCT
 CCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAG
 CGTGCCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTT
 GCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTT
 ATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGG
 CAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGA
 GTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTG
 CGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
 AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGC
 AGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATC

ES 2 994 561 T3

Figura 3

10 20 30 40 50 60
MGSDVRDLNA LLPAVPSLGG GGGCALPVSG AAQWAPVLDF APPGASAYGS LGGPAPPPAP

70 80 90 100 110 120
PPPPPPPHS FIKQEPSWGG AEPHEEQCLS AFTVHFSGQF TG TAGACRYG PFGPPPPSQA

130 140 150 160 170 180
SSGQARMFPN APYLPSCLES QPAIRNQGY S TVTFDGTPSY GH T PSHHAAQ FPNHSFKHED

190 200 210 220 230 240
PMGQQGSLGE QQYSVPPPVY GCH TPTD SCT GSQALLRTP YSSDNL YQMT SQLECM TWNQ

250 260 270 280 290 300
MNLGATLKG V AAGSSSSV KW TEGQSNHSTG YESDNHTTPI LCGAQYRIHT HGVFRGIQDV

310 320 330 340 350 360
RRVPGVAPTL VRSASETSEK RPFMCAYPGC NKRYFKLSHL QMHSRKHTGE KPYQCDFKDC

370
ERRFSRSDQL K

Figura 4

MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPLDGVLANPPNISSLS
PRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLL
FLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRSLLSEADVRL
GGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQAARAALQGGGPPYGPPSTWSVST
MDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPRTLPRFRREVEKTACPSGK
KAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVI
QHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLKALLEVNGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGR
GQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCSLSPHEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAF
QNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGP
HVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLGLGLQGGINGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGP
GPVLTVLALLLASTLA

Figura 5

MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNVAEGKEVLLL VHNLP
 QHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQATPGPAYSGREIIPNASLLIQNIIQNDTG FY
 TLHVIKSDLVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWW
 VNNQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPD
 APTISPLNTSYRSGENLNL SCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSY
 TCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLW
 WVNNQSLPVS PRLQLSNDNRTLTL LSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGP
 DDPTISPSYTYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLY
 TCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLW
 WVNGQSLPVS PRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYG
 PDTPIISPPDSSYLSGANLNL SCHSASNPS PQYSWRINGIPQQHTQVLFIKITPNNNGTY
 ACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI

Figura 6

MESRGRRCPMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQ
YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPL
KMLNIPSINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQW
KEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCE
DVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIIKPGKISHIML
DVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFDI
DLLLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDWTS GSDSDEEL
VTTERKTPRVTGGGAMAGASTSAGRKRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED
TDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGGQNLKYQEFFWDANDIYRIFA
ELEGVWQPAAQPKRRRRHRQDALPGPCIASTPKKHRG

Figura 7

MESRGRRCPESISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQ
YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPL
KMLNIPSINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQW
KEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSEMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCE
DVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIIKPGKISHIML
DVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFDI
DLLLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQGKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDWTSGSDSDEEL
VTERKTPRVTGGGAMAGASTSAGRNRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED
TDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPVATVQGGQNLKYQEFFWDANDIYRIFA
ELEGVWQPAAQPKRRRRHRQDALPGPCIASTPKKHRG

Figura 8

MESRGRRCPMISVLGPISGHVLKAVFSRGDTPVLPHETRLLQTGIHVRVSQPSLILVSQ
 YTPDSTPCHRGDNQLQVQHTYFTGSEVENVSVNVHNPTGRSICPSQEPMSIYVYALPL
 KMLNIP SINVHHYPSAAERKHRHLPVADAVIHASGKQMWQARLTVSGLAWTRQQNQW
 KEPDVYYTSAFVFPTKDVALRHVVCAHELVCSEMENTRATKMQVIGDQYVKVYLESFCE
 DVPSGKLFMHVTLGSDVEEDLTMTRNPQPFMRPHERNGFTVLCPKNMIIKPGKISHIML
 DVAFTSHEHFGLLCPKSIPGLSISGNLLMNGQQIFLEVQAIRETVELRQYDPVAALFFDI
 DLLLQRGPQYSEHPTFTSQYRIQ GKLEYRHTWDRHDEGAAQGDDDVWTSGSDSDEEL
 VTTERKTPRVTGGGAMAGASTSAGRNRKSASSATACTAGVMTRGRLKAESTVAPEED
 TDESDNEIHNPVFTWPPWQAGILARNLVPMVATVQGGQNLKYQEFFFWDANDIYRIFA
 ELEGVWQPAAQ

Figura 9

atgcagagcaagggtgctgctggccgctgcccctgtggctctgctggtgagacccgggcccgcctctgtgggtttgcctagtgttct
 cttgatctgccaggtcagcatacaaaaagacatacttacaattaaggctaatacaactcttcaaatcttgcaggggac
 agagggacttggacgtgcttggcccaataatcagagtggtgagcaaaagggtggagggtgactgagtgacgagtg
 cctctctglaagacactcacaattccaaaagtgaatggaatgacactggagccctacaagtgtctctaccgggaactgac
 ttggcctcggtcatttatgtctatgttcaagattacagatctccatttattgtctctgttagtgaccaacatggagtcgtgacattact
 gagaacaaaaacaaactgtgtgtgattccatgtctcgggtccatttcaaatctcaactgtcactttgtgcaagataccaga
 aaagagatttgtctgaigtgaacagaatttctgggacagcaagaagggtttactattccagctacatgacagctatgc
 tggcatgctctctgtgaagcaaaaaitaatgatgaaagttaccagctattatgtacatagttgtgtgttaggtataggattta
 tgalgtgtgtctgagtcctctcatggaattgaactatctgttggagaaaagcttcttaaatgtacagcaagaactgaacta
 aatgtggggattgacttcaactgggaatacccttcttgaagcatcagcataagaactgttaaacggagacctaataacc
 cagctcgggagtgagatgaagaaatttttgagcaccttaactatagatggtgtaacccggagtgaccaaggattgtlacaact
 gtgcagcatccagtggtgtgatgaccaagaagaacagcacatttgcagggtccatgaaaaaccttltgttcttltggaag
 ggcatggaatctctgttgggaagccaggtgtggggagcgtgtcagaatccctgcgaagtaccttggttaccacccccaga
 aataaaatggataaaaaatggaatacccttggatccatccacaataaaagcggggcatgtactgacgattatggaagt
 gaglgaagagagacaggaaattacactgtcatcttaccatccatllcaaggagagagagagccatgtgtgtctct
 ggtgtgtatgttccacccagattggtgagaaatctctaaatctctctgttggatttctaccagtagccacccactcaaacgct
 gacatgtacgggtctatgtccatttctcccccgcacatccactggtattgtgaggtggaggaagagtgccgccaacgagccc
 agccaagctgtctcagtgacaaacccatcccttgtgaagaaigggagaagtgtggaggacttccaggagggaataaaa
 ttgaagttaataaaaaatcaattgtctaaatgaaggaaaaaaacaaactglaagtaccctgttatccaggcgcaaatgtgt
 cagcttgtlacaataatgtgaagcgttcaacaaagtcgggagagggagagaggggtgacttctccactgacccaggggtcct
 gaaatcttctgcaacctgacatgcagccactgagcaggagagcgtgtcttgggtgactgcagacagatctacgttga
 gaacctcacatgtgtacaagcttggccacagcctctgccaatccatgtgggagagtgccacacactgttgaagaacttg
 gatactcttggaaatgaatgccacatgttcttaataagcacaatgacatttgaatcaggttaagaatgcatccttgc
 ggaaccaaggagactatgtctgcttgcacagacaggaagaccaagaaaaagacattgtgtgtcaggcagctcacagtc
 ctgagagcgtgtggcaccacagcatcacaggaacctggagaatcagacgacaaglaattggggaaagcatcgagctcat
 gcacggcatctgggaatccccctccacagatcatgtgtttaaagataatgagacccctgtagaagactcaggcatgtattg
 aaggtatgggaacccggaacctcactatcccgagagtgaggaaggagagcgaaggccctacacclgcccaggtcag
 tgttctgtgtgtgcaaaagtggaggcattttcataatagaagggtgcccaggaaaagacgaacttggaaatcattattctagt
 aggcacggcgggtgattgccaigtctctgtgctacttctgtcatctccacggacccgitaagcgggccaatggagggaact
 gaagacagggctactgtccatcgtcatggaatccagatgaactccattggaatgaacatgtgaacgactgccttgaatgcca
 gcaaatgggaatccccagagaccggctgaagcaggttaagccctgtggcgtgtgttggccaagtgtatgaagcag
 atgcttgggaatgacaagacagcaacttgcaggacagtagcagtcacaaatgttgaagaaggagcaacacacagtgga
 gcatcgagctctcatgtctgaactcaagatccatctcatattgttgcacccatcacaatgtgtgtaacccctctagggtcctgtacca
 agccaggaggggccacatgtgtgtgttgggaattctgcaaatltggaaacctgtccacttaccctgaggagcaagagaaatg
 aatttgccttacaagaccaaaaggggcagcattccgtcaagggaagactacgttggagcaatccctgtggatctgaaa
 cggcgttgggacagcatcaccagtagccagagctcagccagctctggtttgtggaggagaagtcctcagtgatgtaga
 agaagagggaagctcctgaagatctgtataaggacttctgaccttggagcatctcatctgttacagcttccagtggttaagg
 gcatggagttcttggcactcgcgaagtgtatccacagggagcctggcggaacgaataatccctctatcgagagaagaacgtgg
 taaaatctgtgacttggctgtggccgggataatataaagatccagattatgtcagaaaaggagatgctcgcctcccttga
 atggatggccccagaacaatlttgacagagtgacacaatccagagtgacgtctgtgttltgtgttltgtgtgtgggaata
 tttcttaggtgtcttccatctctgtgggtaagattgatgaagaatttttagggcgttgaagaaggaaactagaatgagg
 gccctgtattatctacacagaaatgtaccagaccatgtctgactgtctggcaggggagccagtcagagacccacgtt
 ttcagagttgtgtggaacatttgggaaatctctgcaagctaattgtctcagcaggtggcaagactacattgttctccgatata
 gagactttagcatggaagaggattctgactctctgccaactcactgttctgtatggaggaggaggaagtatgtgac
 cccaaatccattatgacaacacagcaggaatcagtcagtatctgcagaacagtaagcgaagagcggcctgtgtgagt
 aaaaacatttgaagataccccgttgaagaaccagaagtaaaagtaatccagatgacaaccagacggacagtggtatg
 gttctgtcctcagaagagctgaaaacttgggaagacagaaccaaatatctccatcttltgttgggaatgggtgccagcaaaag
 cagggtgtctgtgtcgtatctgaagctcaaacacagacaagcggctaccagtcgggatctactccgatgacacagacacc
 accgtgtactccagtgagggaagcagaactttaagctgataggattggagtgcaaacccgttagcacagcccagatctc
 cagcctgacccggggaccacacagctctctctctgtttaa

Figura 10

ATGGACTTCCTCTTGCTGCAGGACCCGGCTTCCACGTGTGTCCCGGAGCCGGCGTCTC
 AGCACACGCTCCGCTCCGGGCCTGGGTGCCTACAGCAGCCAGAGCAGCAGGGAGTCC
 GGGACCCGGGCGGCATCTGGGCCAAGTTAGGCGCCGCCGAGGCCAGCGCTGAACGT
 CTCCAGGGCCGGAGGAGCCGCGGGGCGTCCGGGTCTGAGCCGCAGCAAATGGGCTC
 CGACGTGCGGGACCTGAACGCGCTGCTGCCCCGCCGTCCCCTCCCTGGGTGGCGGCG
 GCGGCTGTGCCCTGCCTGTGAGCGGCGCGGCGCAGTGGGCGCCGGTGCTGGACTTTG
 CGCCCCCGGGCGCTTCGGCTTACGGGTCTTGGGCGGCCCGCGCCGCCACCGGCT
 CCGCCGCCACCCCCGCCGCCGCCGCTCACTCCTTCATCAAACAGGAGCCGAGCTGG
 GGCGGCGCGGAGCCGCACGAGGAGCAGTGCCTGAGCGCCTTCACTGTCCACTTTTCC
 GGCCAGTTCACTGGCACAGCCGGAGCCTGTCGCTACGGGGCCCTTCGGTCCTCCTCCG
 CCCAGCCAGGCGTCATCCGGCCAGGCCAGGATGTTTCCTAACGCGCCCTACCTGCCCA
 GCTGCCTGGAGAGCCAGCCCGCTATTGCAATCAGGGTTACAGCACGGTCACCTTCGA
 CGGGACGCCCAGCTACGGTCACACGCCCTCGCACCATGCGGCGCAGTTCCCCAACCA
 CTCATTCAAGCATGAGGATCCCATGGGCCAGCAGGGCTCGCTGGGTGAGCAGCAGTAC
 TCGGTGCCGCCCCCGGTCTATGGCTGCCACACCCCCACCGACAGCTGCACCGGCAGC
 CAGGCTTTGCTGCTGAGGACGCCCTACAGCAGTGACAATTTATACCAAATGACATCCCA
 GCTTGAATGCATGACCTGGAATCAGATGAACTTAGGAGCCACCTTAAAGGGAGTTGCTG
 CTGGGAGCTCCAGCTCAGTGAAATGGACAGAAGGGCAGAGCAACCACAGCACAGGGTA
 CGAGAGCGATAACCACACAACGCCCATCCTCTGCGGAGCCCAATACAGAATACACAG
 CACGGTGTCTTCAGAGGCATTCAGTGA

Figura 11

ATGGCCTTGCCAACGGCTCGACCCCTGTTGGGGTCCTGTGGGACCCCCGCCCTCGGC
 AGCCTCCTGTTCTGCTCTTCAGCCTCGGATGGGTGCAGCCCTCCAGGACCCTGGCTG
 GAGAGACAGGGCAGGAGGCTGCGCCCCTGGACGGAGTCCTGGCCAACCCACCTAACA
 TTTCCAGCCTCTCCCCTCGCCAACTCCTTGCTTCCCGTGTGCGGAGGTGTCCGGCCT
 GAGCACGGAGCGTGTCCGGGAGCTGGCTGTGGCCTTGGCACAGAAGAATGTCAAGCT
 CTCAACAGAGCAGCTGCGCTGTCTGGCTCACCGGCTCTCTGAGCCCCCGAGGACCTG
 GACGCCCTCCCATTTGGACCTGCTGCTATTCTCAACCCAGATGCGTTCTCGGGGCCCC
 AGGCCTGCACCCGTTTCTTCTCCCGCATCACGAAGGCCAATGTGGACCTGCTCCCGAG
 GGGGGTCTCCCGAGCGACAGCGGCTGCTGCCTGCGGCTCTGGCCTGCTGGGGTGTGC
 GGGGGTCTCTGCTGAGCGAGGCTGATGTGCGGGCTCTGGGAGGCCTGGCTTGCAGCC
 TGCCTGGGCGCTTTGTGGCCGAGTCGGCCGAAGTGTGCTACCCCGGCTGGTGAGCT
 GCCCCGGACCCCTGGACCAGGACCAACAGGAGGCAGCCAGGGCGGCTCTGCAGGGC
 GGGGGACCCCCCTACGGCCCCCGTCGACATGGTCTGTCTCCACGATGGACGCTCTG
 CGGGGCTGCTGCCCGTGTGTTGGCCAGCCCATCATCCGCAGCATCCCGCAGGGCATC
 GTGGCCGCGTGGCGGCAACGCTCCTCTCGGGACCCATCCTGGCGGCAGCCTGAACGG
 ACCATCCTCCGGCCGCGGTTCCGGCGGGGAAGTGGAGAAGACAGCCTGTCTTCAGGC
 AAGAAGGCCCGCGAGATAGACGAGAGCCTCATCTTCTACAAGAAGTGGGAGCTGGAAG
 CTGCGTGGATGCGGCCCTGCTGGCCACCCAGATGGACCGCGTGAACGCCATCCCCCT
 TCACCTACGAGCAGCTGGACGTCCTAAAGCATAAACTGGATGAGCTCTACCCACAAGGT
 TACCCCGAGTCTGTGATCCAGCACCTGGGCTACCTCTTCTCAAGATGAGCCCTGAGG
 ACATTCGCAAGTGGAATGTGACGTCCCTGGAGACCCTGAAGGCTTTGCTTGAAGTCAAC
 AAAGGGCACGAAATGAGTCCTCAGGCTCCTCGGCGGCCCTCCACAGGTGGCCACC
 CTGATCGACCGCTTTGTGAAGGGAAGGGGCCAGCTAGACAAAGACACCCTAGACACCC
 TGACCGCCTTCTACCCTGGGTACCTGTGCTCCCTCAGCCCCGAGGAGCTGAGCTCCGT
 GCCCCCAGCAGCATCTGGGCGGTGAGGCCCGAGGACCTGGACACGTGTGACCCAAG
 GCAGCTGGACGTCTCTATCCCAAGGCCCGCCTTGCTTTCCAGAACATGAACGGGTCC
 GAATACTTCGTGAAGATCCAGTCCTTCTGGGTGGGGCCCCCACGGAGGATTTGAAGG
 CGCTCAGTCAGCAGAATGTGAGCATGGACTTGGCCACGTTTCATGAAGCTGCGGACGGA
 TGCGGTGCTGCCGTTGACTGTGGCTGAGGTGCAGAACTTCTGGGACCCACGTTGAG
 GGCCTGAAGGCGGAGGAGCGGCACCGCCCCGTGCGGGACTGGATCCTACGGCAGCG
 GCAGGACGACCTGGACACGCTGGGGCTGGGGCTACAGGGCGGCATCCCCAACGGCTA
 CCTGGTCCTAGACCTCAGCATGCAAGAGGCCCTCTCGGGGACGCCCTGCCTCCTAGGA
 CCTGGACCTGTTCTCACCGTCCTGGCACTGCTCCTAGCCTCCACCCTGGCCTGA

Figura 12

ATGGAGTCTCCCTCGGCCCCCTCCCCACAGATGGTGCATCCCCTGGCAGAGGCTCC
 TGCTCACAGCCTCACTTCTAACCTTCTGGAACCCGCCCACTGCCAAGCTCACT
 ATTGAATCCACGCCGTTCAATGTGCGCAGAGGGGAAGGAGGTGCTTCTACTTGTCCA
 CAATCTGCCCCAGCATCTTTTTGGCTACAGCTGGTACAAAGGTGAAAGAGTGGATG
 GCAACCGTCAAATTATAGGATATGTAATAGGAACTCAACAAGCTACCCCAGGGCCC
 GCATACAGTGGTCGAGAGATAATATACCCCAATGCATCCCTGCTGATCCAGAACAT
 CATCCAGAATGACACAGGATTCTACACCCTACACGTCATAAAGTCAGATCTTGTGAA
 TGAAGAAGCAACTGGCCAGTTCCGGGTATACCCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATCT
 CCAGCAACAACCTCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGAA
 CCTGAGACTCAGGACGCAACCTACCTGTGGTGGGTAAACAATCAGAGCCTCCCGGT
 CAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTCA
 CAAGAAATGACACAGCAAGCTACAAATGTGAAACCCAGAACCCAGTGAGTGCCAGG
 CGCAGTGATTGAGTCATCCTGAATGTCTCTATGGCCCGGATGCCCCCACCATTTC
 CCCTCTAAACACATCTTACAGATCAGGGGAAAATCTGAACCTCTCCTGCCACGCAG
 CCTCTAACCCACCTGCACAGTACTCTTGGTTTGTCAATGGGACTTTCCAGCAATCCA
 CCCAAGAGCTCTTTATCCCCAACATCACTGTGAATAATAGTGGATCCTATACGTGCC
 AAGCCCATAACTCAGACACTGGCCTCAATAGGACCACAGTCACGACGATCACAGTC
 TATGCAGAGCCACCCAAACCCTTCATCACCAGCAACAACCTCCAACCCCGTGGAGGA
 TGAGGATGCTGTAGCCTTAACCTGTGAACCTGAGATTGAGAACACAACCTACCTGT
 GGTGGGTAAATAATCAGAGCCTCCCGGTGAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGAC
 AACAGGACCCTCACTCTACTCAGTGTGACAAGGAATGATGTAGGACCCTATGAGTG
 TGGAATCCAGAACAAATTAAGTGTTGACCACAGCGACCCAGTCATCCTGAATGTCCT
 CTATGGCCCAGACGACCCCAACATTTCCCCCTCATACACCTATTACCGTCCAGGGG
 TGAACCTCAGCCTCTCCTGCCATGCAGCCTCTAACCCACCTGCACAGTATTCTTGG
 CTGATTGATGGGAACATCCAGCAACACACACAAGAGCTCTTTATCTCCAACATCACT
 GAGAAGAACAGCGGACTCTATACCTGCCAGGCCAATAACTCAGCCAGTGGCCACA
 GCAGGACTACAGTCAAGACAATCACAGTCTCTGCGGAGCTGCCAAGCCCTCCATC
 TCCAGCAACAACCTCAAACCCGTGGAGGACAAGGATGCTGTGGCCTTCACCTGTGA
 ACCTGAGGCTCAGAACACAACCTACCTGTGGTGGGTAAATGGTCAGAGCCTCCCAG
 TCAGTCCCAGGCTGCAGCTGTCCAATGGCAACAGGACCCTCACTCTATTCAATGTC
 ACAAGAAATGACGCAAGAGCCTATGTATGTGGAATCCAGAACTCAGTGAGTGCAAA
 CCGCAGTGACCCAGTCACCCTGGATGTCTCTATGGGCCGGACACCCCCATCATTT
 CCCCCCAGACTCGTCTTACCTTTCCGGAGCGAACCTCAACCTCTCCTGCCACTCG
 GCCTCTAACCCATCCCCGCAGTATTCTTGGCGTATCAATGGGATACCGCAGCAACA
 CACACAAGTTCTCTTTATCGCCAAAATCACGCCAAATAATAACGGGACCTATGCCTG
 TTTTGTCTCTAACTTGGCTACTGGCCGCAATAATTCCATAGTCAAGAGCATCACAGT
 CTCTGCATCTGGAACCTCTCCTGGTCTCTCAGCTGGGGCCACTGTCGGCATCATGA
 TTGGAGTGCTGGTTGGGGTTGCTCTGATATAG

Figura 13

ATGGAATCCAGGGGGAGGAGGTGTCCGGAGATGATCTCAGTCCTCGGACCGATTA
 GCGGTACGTGCTCAAAGCGGTCTTCAGCAGAGGAGACACTCCGGTGCTGCCGCA
 CGAAACAAGGCTCCTTCAGACGGGGATACACGTGCGTGTGAGTCAGCCCAGCCTG
 ATCCTCGTGTCTCAATACACCCCTGACAGCACTCCCTGTCACAGAGGGGACAACCA
 ACTCCAGGTCCAGCACACCTACTTCACTGGGAGCGAGGTGAGAACGTCAGCGTG
 AACGTGCACAACCCACCGGAAGATCAATCTGCCCTAGCCAGGAGCCCATGAGCA
 TCTACGTGTACGCCCTCCCGCTCAAGATGCTCAACATCCCCTCCATCAACGTCCAC
 CACTATCCCTCCGCTGCCGAACGTAAACACCGACACTTGCCAGTTGCCGACGCCGT
 GATACACGCTTCAGGGAAGCAGATGTGGCAAGCCAGGCTTACTGTGAGTGGACTC
 GCCTGGACTAGGCAACAGAACCAGTGGAAGGAGCCCGACGTGTAACACACAGCG
 CTTTCGTGTTCCCCACAAAAGACGTGCGCTGCGACATGTGGTGTGCGCTCACGAA
 CTGGTGTGCAGCATGGAGAACACGCGAGCGACCAAGATGCAGGTGATCGGTGACC
 AGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGAGCTTCTGCGAGGATGTCCCGTCCGGAAAGCT
 GTTCATGCACGTGACCCTGGGCAGTGACGTTGAGGAAGACCTGACCATGACGCGT
 AACCCGCAGCCTTTCATGAGACCGCACGAGAGGAACGGATTACCCGTCCTGTGCC
 CGAAGAACATGATCATCAAGCCCGCAAGATCAGCCACATCATGCTCGACGTGCC
 TTCACCTCTCACGAACACTTCGGGCTGCTGTGTCCGAAGAGCATTCCGGGTCTGAG
 CATCTCAGGCAACCTGCTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAAGTGCAGGCC
 ATAAGGGAGACCGTGGAACCTGAGGCAGTACGATCCTGTGGCTGCCCTGTTCTTCTT
 CGACATCGACCTCTTGCTGCAAAGGGGTCCACAGTATAGCGAACACCCACCTTCA
 CCTCCAGTACCGTATCCAGGGCAAGCTGGAGTACCGACACACTTGGGATAGGCA
 CGACGAGGGTGCCGCTCAAGGTGACGACGATGTTTGGACTAGCGGCTCTGATAGC
 GACGAAGAGCTGGTGACCACTGAGCGCAAACTCCAAGAGTTACGGGCGGCGGCG
 CAATGGCTGGCGCCTCTACTTCCGCGGGAAGGAAaAGGAAAAGCGCGTCTAGCGC
 AACTGCATGCACTGCCGGTGTGATGACAAGGGGGAGACTGAAGGCCGAGAGTACA
 GTGGCTCCGGAAGAGGATACCGACGAGGACTCTGACAACGAGATCCACAACCCCG
 CAGTGTTTACGTGGCCACCTTGGCAAGCCGGCATCCTTGCTAGAAACCTGGTGCCC
 ATGGTGGCCACAGTCCAAGGCCAGAACCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACG
 CCAACGACATCTACCGTATCTTCGCCGAACCTGAAGGCGTCTGGCAGCCGGCGGC
 TCAACCCAAAAGGAGACGTACAGACAGGACGCGCTTCCCGGACCCTGTATTGCCT
 CTACCCCAAGAAACACCGGGG

Figura 14

ATGGAATCCAGGGGGAGGAGGTGTCCGGAGATGATCTCAGTCCTCGGACCGATTA
 GCGGTACGTGCTCAAAGCGGTCTTCAGCAGAGGAGACACTCCGGTGCTGCCGCA
 CGAAACAAGGCTCCTTCAGACGGGGATACACGTGCGTGTGAGTCAGCCCAGCCTG
 ATCCTCGTGTCTCAATACACCCCTGACAGCACTCCCTGTCACAGAGGGGACAACCA
 ACTCCAGGTCCAGCACACCTACTTCACTGGGAGCGAGGTGAGAACGTCAGCGTG
 AACGTGCACAACCCACGGAAGATCAATCTGCCCTAGCCAGGAGCCCATGAGCA
 TCTACGTGTACGCCCTCCCGCTCAAGATGCTCAACATCCCCTCCATCAACGTCCAC
 CACTATCCCTCCGCTGCCGAACGTAAACACCGACACTTGCCAGTTGCCGACGCCGT
 GATACACGCTTCAGGGAAGCAGATGTGGCAAGCCAGGCTTACTGTGAGTGGACTC
 GCCTGGACTAGGCAACAGAACCAGTGGAAGGAGCCCGACGTGTACTACACCAGCG
 CTTTCGTGTTCCCCACAAAAGACGTGCGCTGCGACATGTGGTGTGCGCTCACGAA
 CTGGTGTGCAGCATGGAGAACACGCGAGCGACCAAGATGCAGGTGATCGGTGACC
 AGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGAGCTTCTGCGAGGATGTCCCGTCCGGAAAGCT
 GTTCATGCACGTGACCCTGGGCAGTGACGTTGAGGAAGACCTGACCATGACGCGT
 AACCCGCAGCCTTTTCATGAGACCGCACGAGAGGAACGGATTACCGTCCTGTGCC
 CGAAGAACATGATCATCAAGCCCGGCAAGATCAGCCACATCATGCTCGACGTGCGC
 TTCACCTCTCACGAACACTTCGGGCTGCTGTGTCCGAAGAGCATTCCGGGTCTGAG
 CATCTCAGGCAACCTGCTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAAGTGCAGGCC
 ATAAGGGAGACCGTGGAAGTGAAGGCAGTACGATCCTGTGGCTGCCCTGTTCTTCTT
 CGACATCGACCTCTTGCTGCAAAGGGGTCCACAGTATAGCGAACACCCACCTTCA
 CCTCCAGTACCGTATCCAGGGCAAGCTGGAGTACCGACACACTTGGGATAGGCA
 CGACGAGGGTGCCGCTCAAGGTGACGACGATGTTTGGACTAGCGGCTCTGATAGC
 GACGAAGAGCTGGTGACCACTGAGCGCAAACTCCAAGAGTTACGGGCGGCGGCG
 CAATGGCTGGCGCCTCTACTTCCGCGGGAAGGAACAGGAAAAGCGCGTCTAGCGC
 AACTGCATGCACTGCCGGTGTGATGACAAGGGGGAGACTGAAGGCCGAGAGTACA
 GTGGCTCCGGAAGAGGATACCGACGAGGACTCTGACAACGAGATCCACAACCCCG
 CAGTGTTTACGTGGCCACCTTGGCAAGCCGGCATCCTTGCTAGAAACCTGGTGCC
 ATGGTGGCCACAGTCCAAGGCCAGAACCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACG
 CCAACGACATCTACCGTATCTTCGCCGAACCTGAAGGCGTCTGGCAGCCGGCGGC
 TCAACCCAAAAGGAGACGTACAGACAGGACGCGCTTCCCGGACCCTGTATTGCCT
 CTACCCCCAAGAAACACCGGGGC

Figura 15

ATGGAATCCAGGGGGAGGAGGTGTCCGGAGATGATCTCAGTCCTCGGACCGATTA
 GCGGTACGTGCTCAAAGCGGTCTTCAGCAGAGGAGACACTCCGGTGCTGCCGCA
 CGAAACAAGGCTCCTTCAGACGGGGATACACGTGCGTGTGAGTCAGCCCAGCCTG
 ATCCTCGTGTCTCAATACACCCCTGACAGCACTCCCTGTCACAGAGGGGACAACCA
 ACTCCAGGTCCAGCACACCTACTTCACTGGGAGCGAGGTGAGAACGTGAGCGTG
 AACGTGCACAACCCACGCGGAAGATCAATCTGCCCTAGCCAGGAGCCCATGAGCA
 TCTACGTGTACGCCCTCCCGCTCAAGATGCTCAACATCCCCTCCATCAACGTCCAC
 CACTATCCCCTCCGCTGCCGAACGTAAACACCGACACTTGCCAGTTGCGGACGCCGT
 GATACACGCTTCAGGGAAGCAGATGTGGCAAGCCAGGCTTACTGTGAGTGGACTC
 GCCTGGACTAGGCAACAGAACCAGTGGAAGGAGCCCGACGTGTAACACACAGCG
 CTTTCGTGTTCCCCACAAAAGACGTGCGCTGCGACATGTGGTGTGCGCTCACGAA
 CTGGTGTGCAGCATGGAGAACACGCGAGCGACCAAGATGCAGGTGATCGGTGACC
 AGTACGTCAAGGTGTACCTGGAGAGCTTCTGCGAGGATGTCCCGTCCGGAAAGCT
 GTTCATGCACGTGACCCTGGGCAGTGACGTTGAGGAAGACCTGACCATGACGCGT
 AACCCGCAGCCTTTCATGAGACCGCACGAGAGGAACGGATTACCGTCCTGTGCC
 CGAAGAACATGATCATCAAGCCCGGCAAGATCAGCCACATCATGCTCGACGTGCC
 TTCACCTCTCACGAACACTTCGGGCTGCTGTGTCCGAAGAGCATTCCGGTCTGAG
 CATCTCAGGCAACCTGCTGATGAACGGGCAGCAGATCTTCCTGGAAGTGCAGGCC
 ATAAGGGAGACCGTGGAACCTGAGGCAGTACGATCCTGTGGCTGCCCTGTTCTTCTT
 CGACATCGACCTCTTGCTGCAAAGGGGTCCACAGTATAGCGAACACCCACCTTCA
 CCTCCAGTACCGTATCCAGGGCAAGCTGGAGTACCGACACACTTGGGATAGGCA
 CGACGAGGGTGCCGCTCAAGGTGACGACGATGTTTGGACTAGCGGCTCTGATAGC
 GACGAAGAGCTGGTGACCACTGAGCGCAAACTCCAAGAGTTACGGGCGGCGGCG
 CAATGGCTGGCGCCTCTACTTCCGCGGGAAGGAACAGGAAAAGCGCGTCTAGCGC
 AACTGCATGCACTGCCGGTGTGATGACAAGGGGGAGACTGAAGGCCGAGAGTACA
 GTGGCTCCGGAAGAGGATACCGACGAGGACTCTGACAACGAGATCCACAACCCCG
 CAGTGTTTACGTGGCCACCTTGGCAAGCCGGCATCCTTGCTAGAAACCTGGTGCCC
 ATGGTGGCCACAGTCCAAGGCCAGAACCTGAAGTACCAGGAGTTCTTCTGGGACG
 CCAACGACATCTACCGTATCTTCGCCGAACCTGAAGGCGTCTGGCAGCCGGCGGC
 TCAA

Figura 16

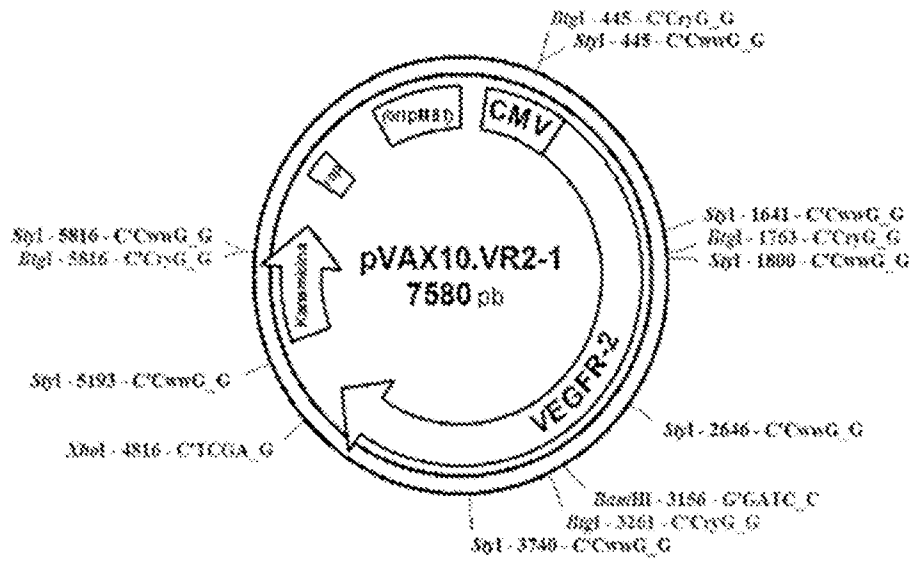


Figura 17

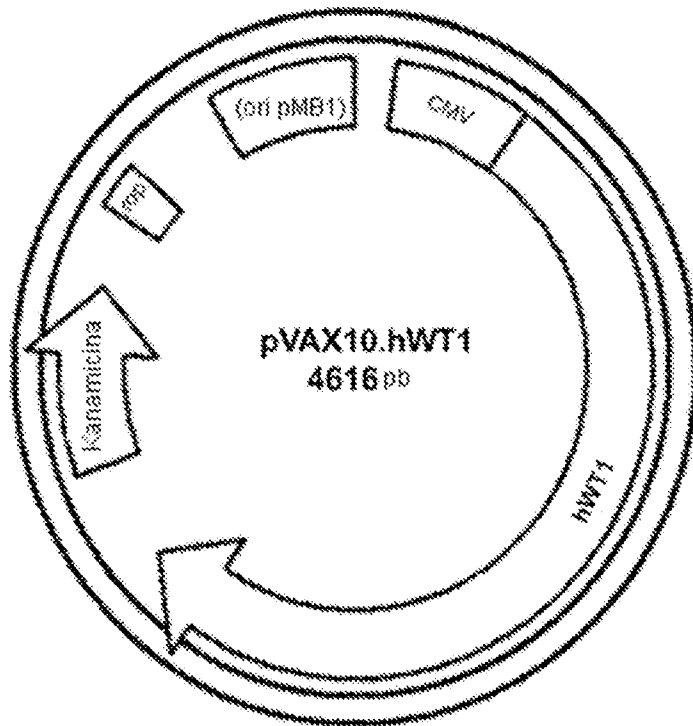


Figura 18

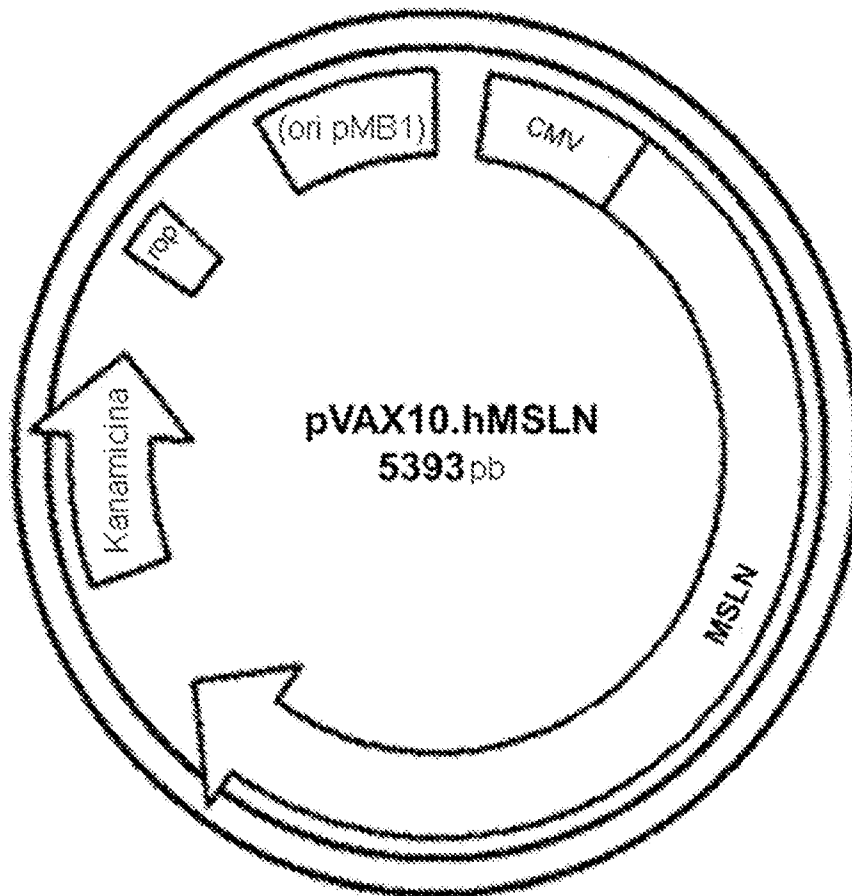


Figura 19

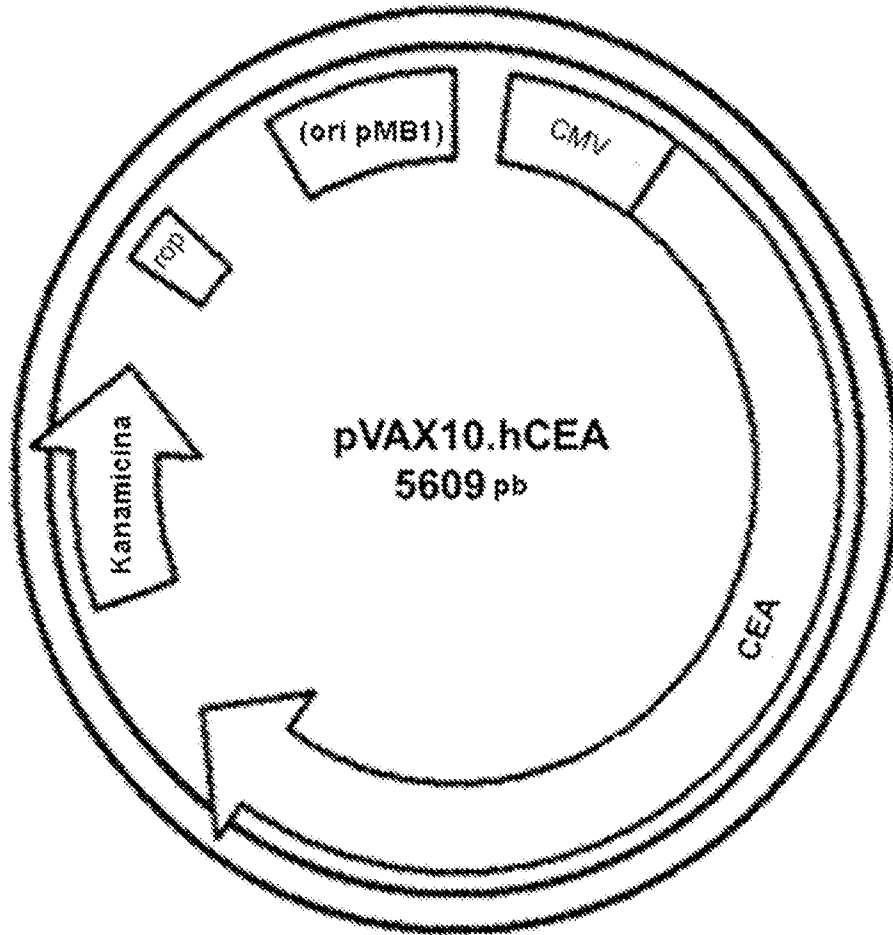


Figura 20

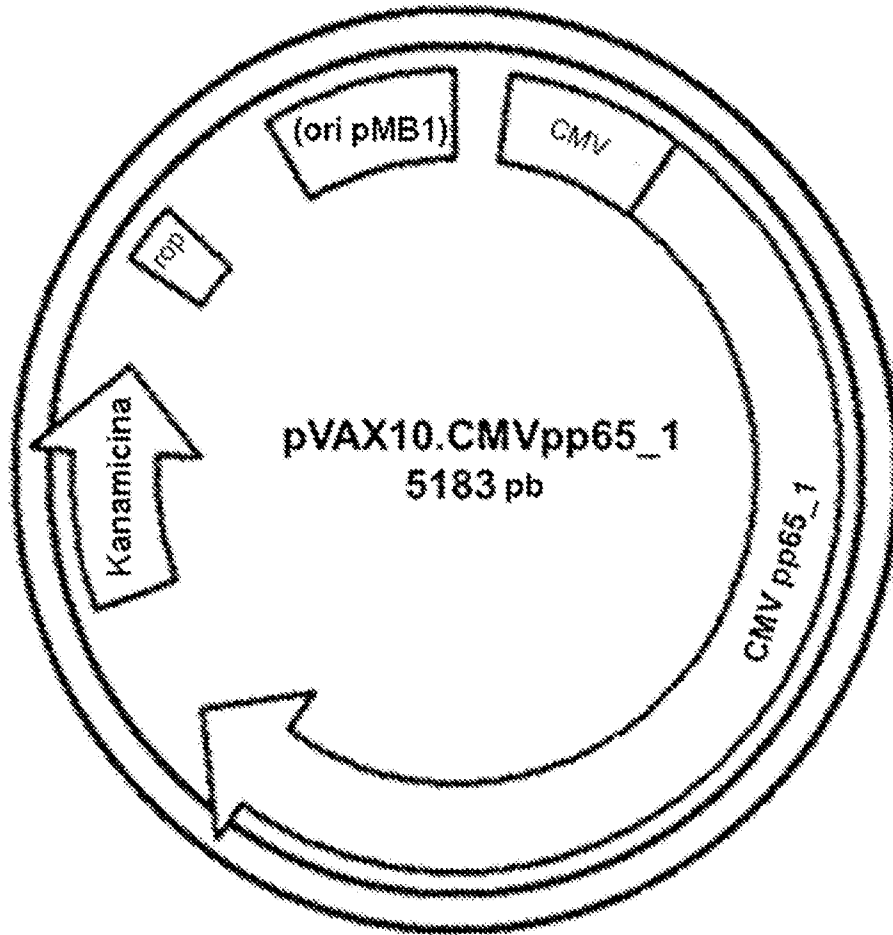


Figura 21

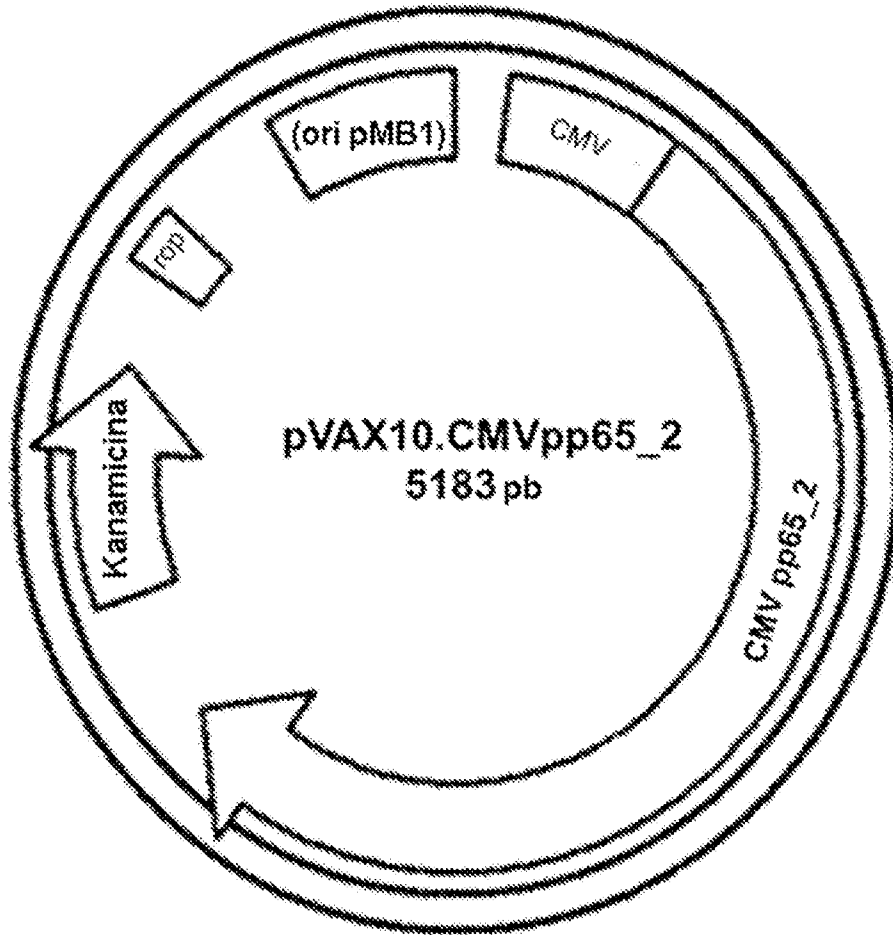


Figura 22

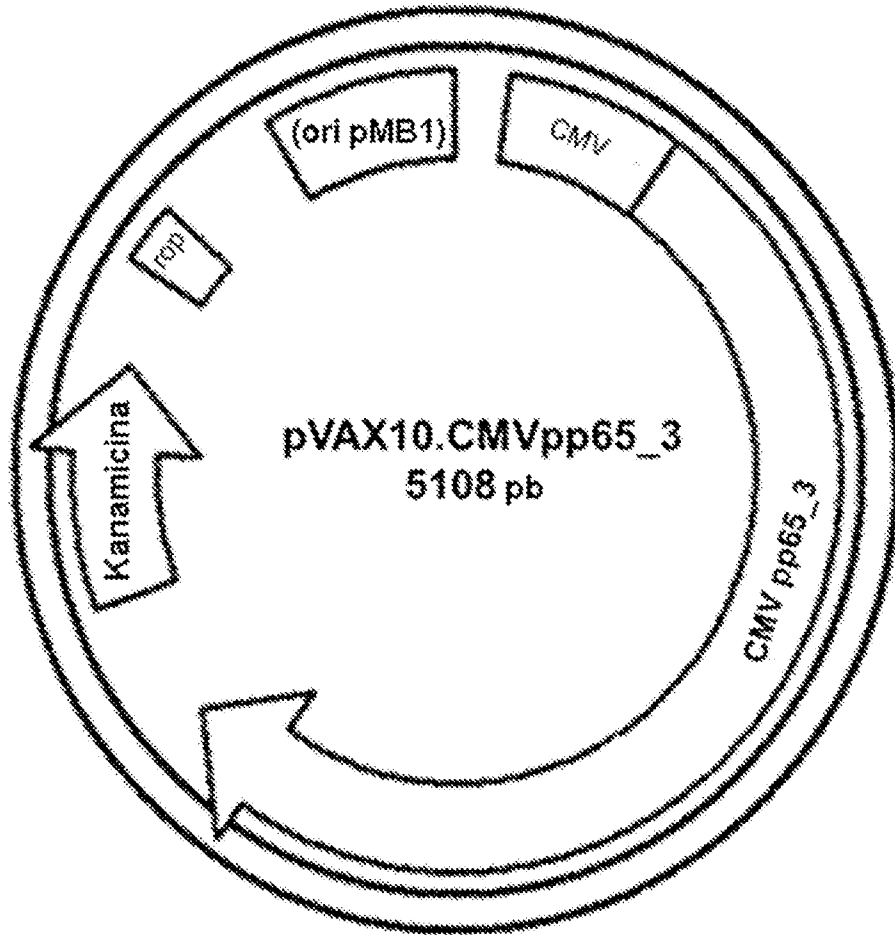


Figura 23

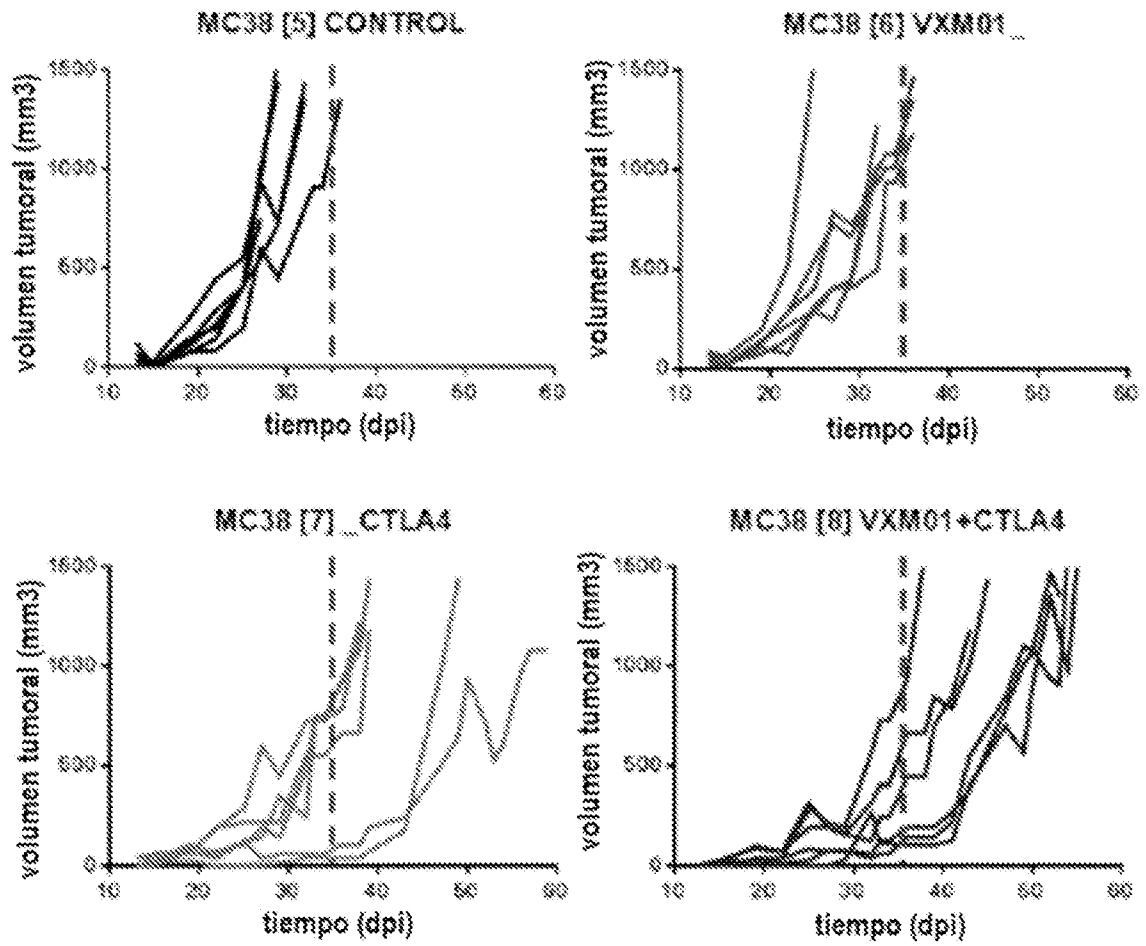


Figura 24

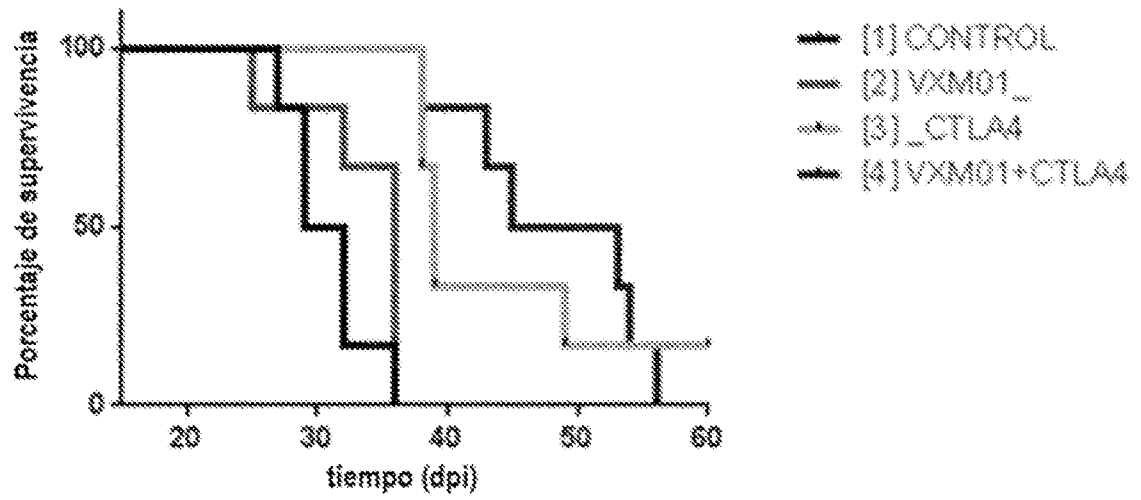


Figura 25

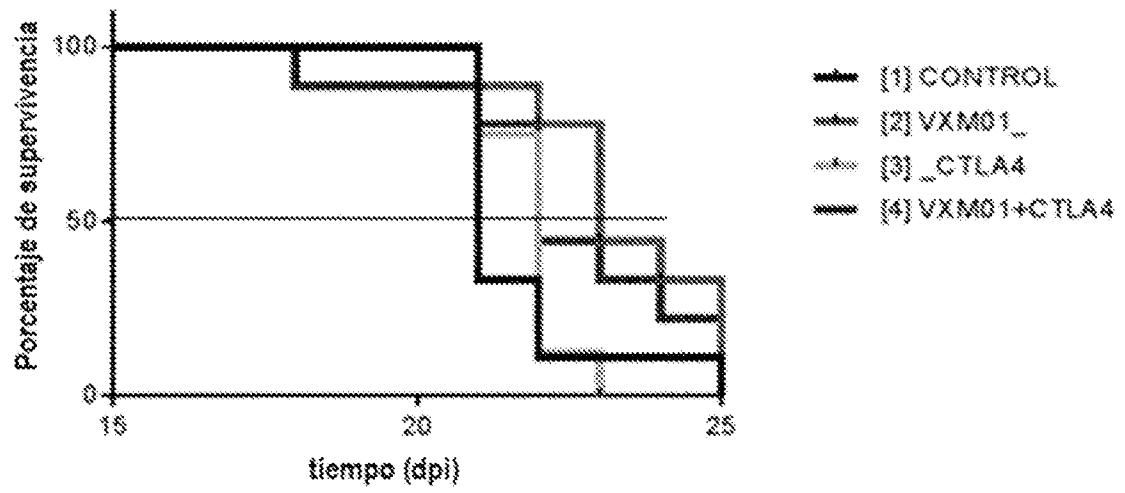


Figura 26

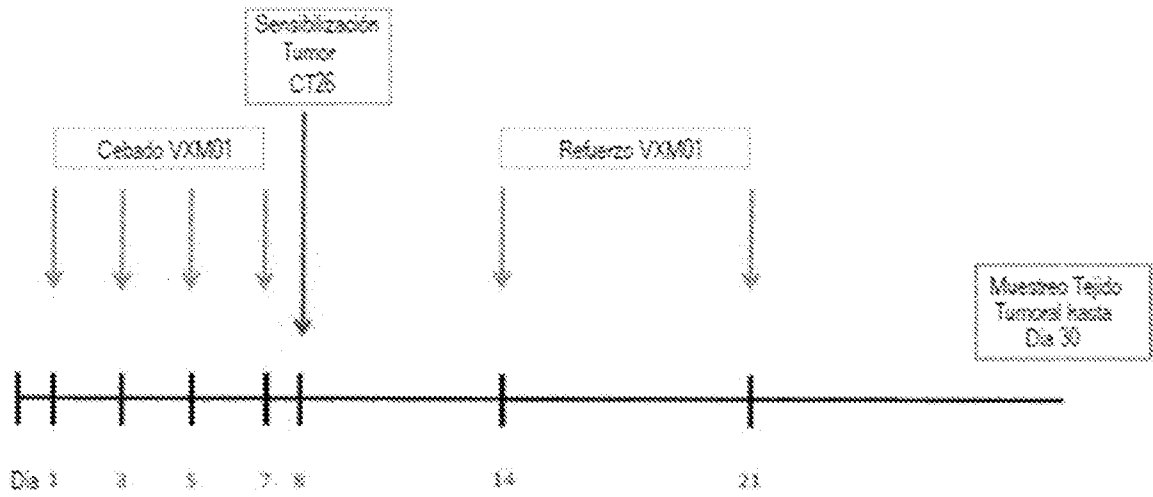


Figura 27

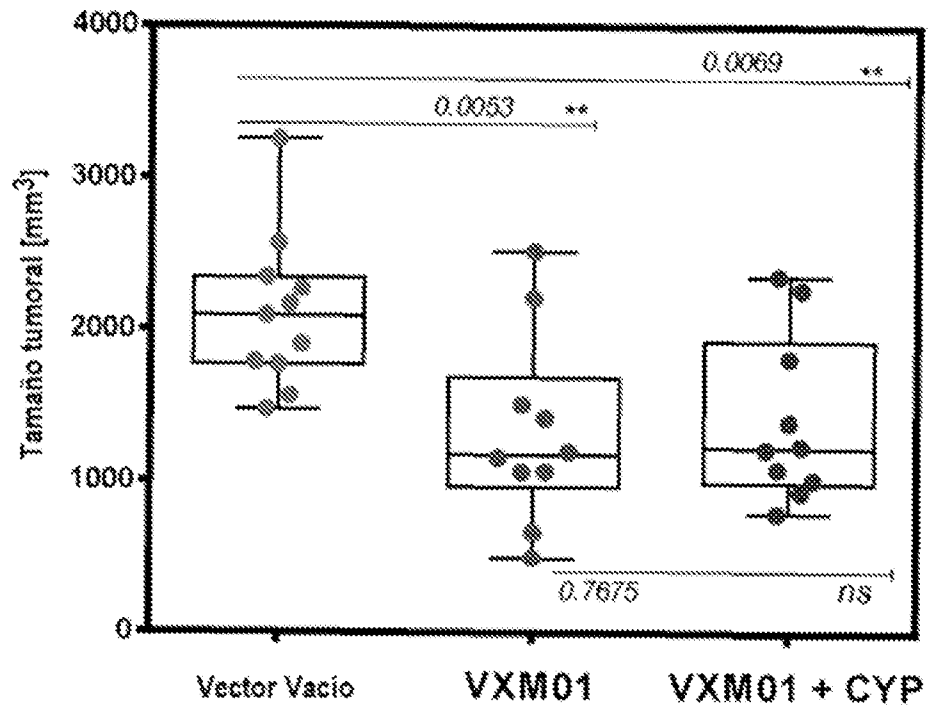


Figura 28

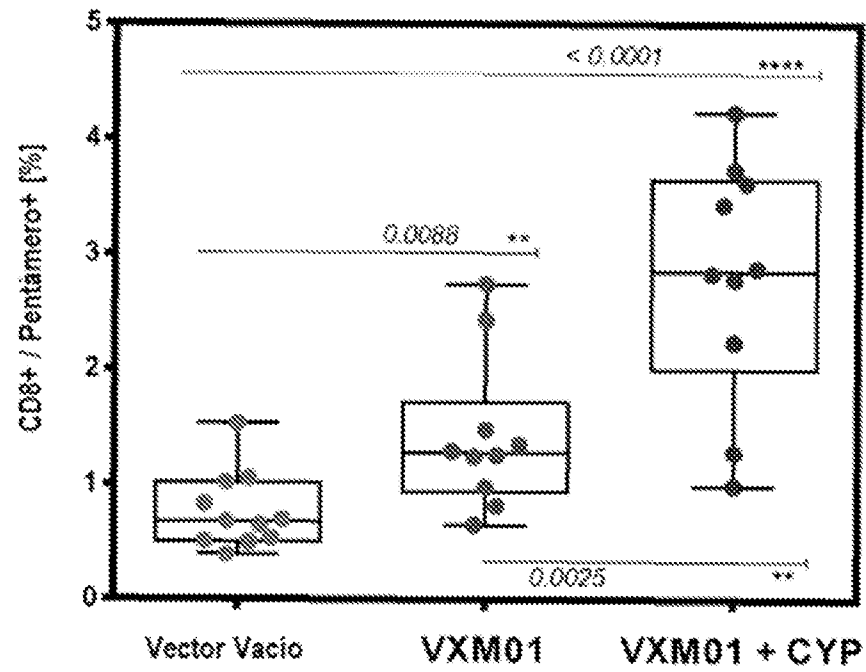


Figura 29

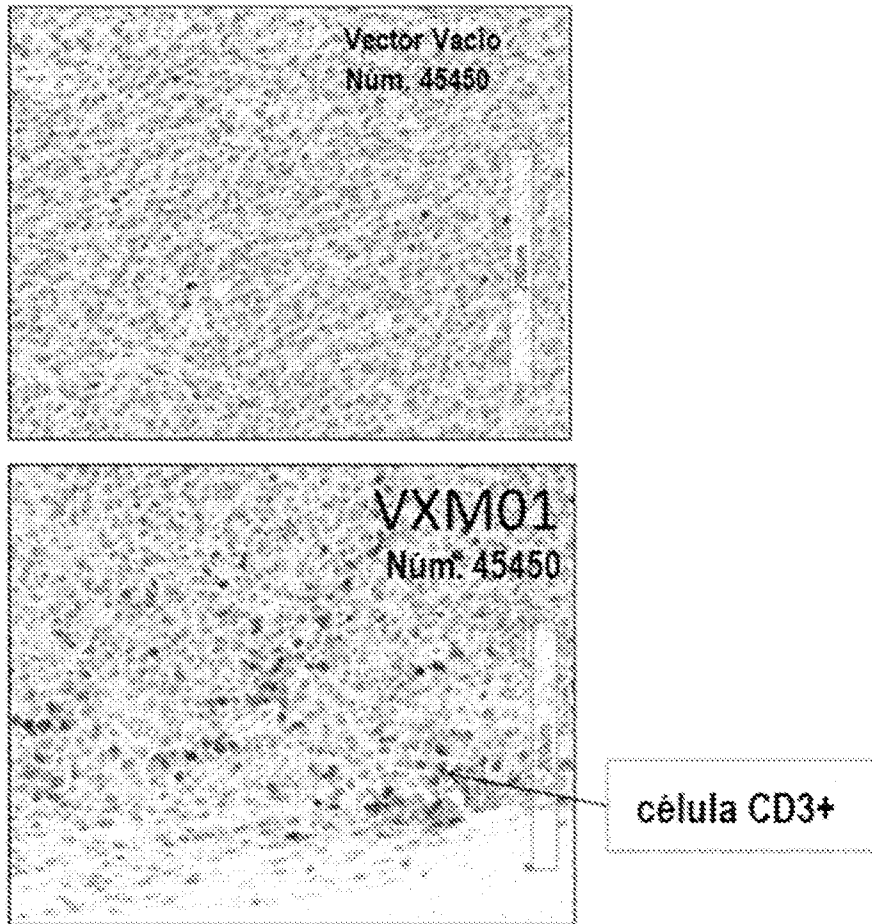


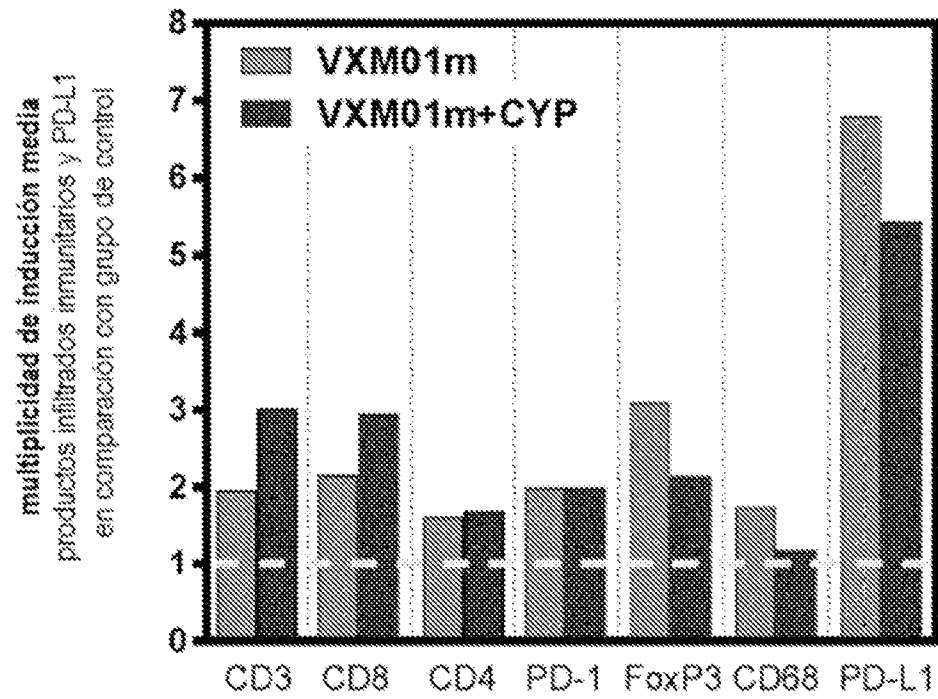
Figura 30

Figura 31

