



No. 11-165849-00000-0000

Fecha: 2011-12-01 16:32:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“CONSTRUCCIONES DE CASB7439”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **C07K 14/47**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO **RIXENSART, BÉLGICA.**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **01 DIC 2011**

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-165849-00000-0000

Fecha: 2011-12-01 16:32:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre : **GLAXOSMITHKLINE
BIOLOGICALS S.A.**

Dirección: Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica.

Nacionalidad o Domicilio: Rixensart, Bélgica.

Lugar de Constitución: Bélgica.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá,
Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: BLAIS, Normand; HARVEY, Martine; PILORGET, Anthony y RIOUX,
Clément.

Dirección: GlaxoSmitKline Biologicals Canada, 525 Cartier Boulevard West,
Laval, Québec H7V 3S8.

Nacionalidad o Domicilio: Canada.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2010/057141

Fecha: 25/05/10

Publicación Internacional No. WO 2010/136443 A1

Fecha: 02/12/10

⑥

Título (54)

"CONSTRUCCIONES DE CASB7439"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/47

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

US

27/05/09

61/181,380

US

25/06/09

61/220,396

⑨

Comprobante de Pago No. 11-101804

Fecha: 18-10-2011

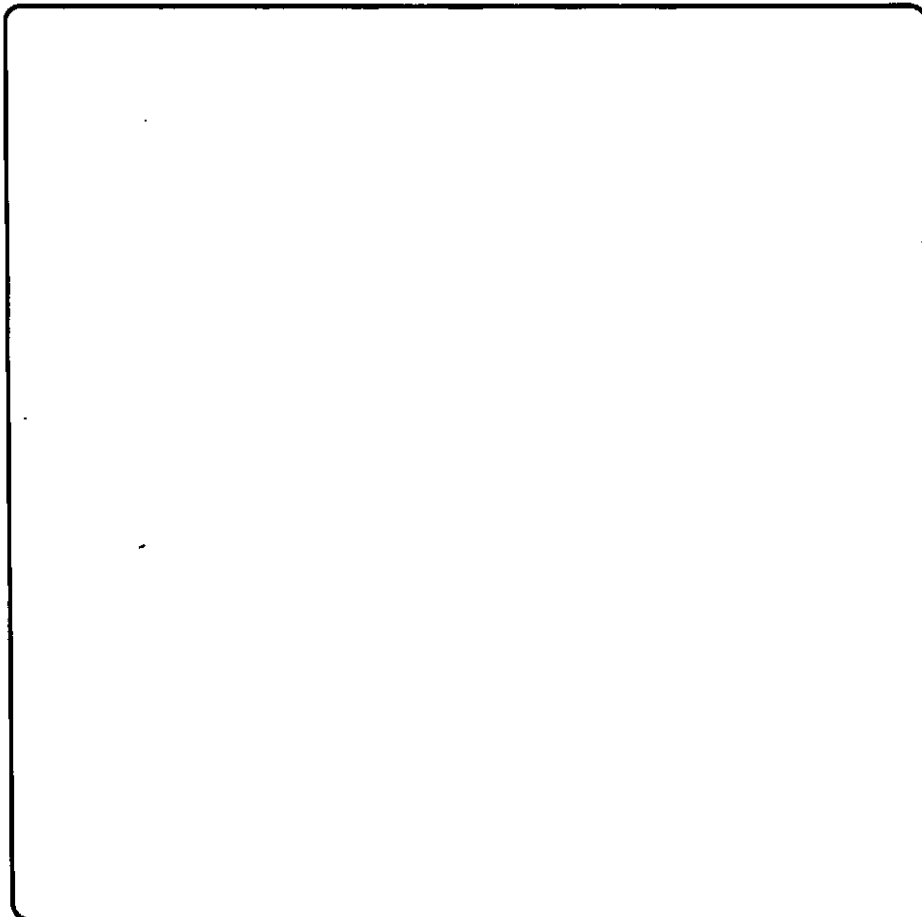
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- ☐ Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Reporte de búsqueda internacional, publicación, opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

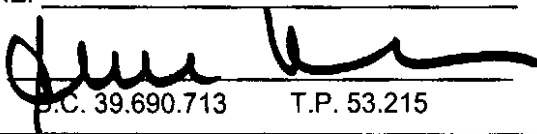


12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:



S.C. 39.690.713

T.P. 53.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 101804

Bogotá D.C., Octubre 18 de 2011 - 16:46:27

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A. NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	414999583	18/10/2011	38.215.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-165849- -00000-0000

Fecha: 2011-12-01 16:32:03 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 259

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Octubre 18 de 2011 - 16:46:35

ANEXO

Los documentos que acreditan la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de las sociedades peticionarias, que facultan a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se están presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.



ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

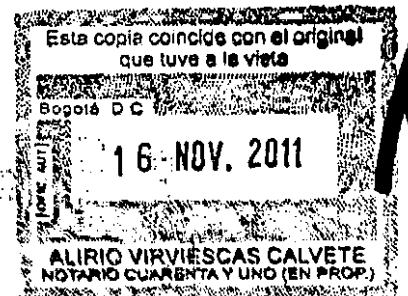
TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.



APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

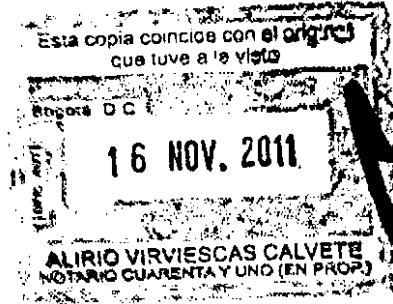
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 SET 10 A 10:47

ues
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

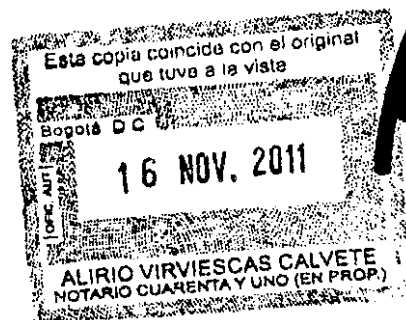
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, JAMES KERR MILLIGAN, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

C E R T I F I C O:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A." (anteriormente denominada "Smithkline Beecham Biologicals s.a."), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

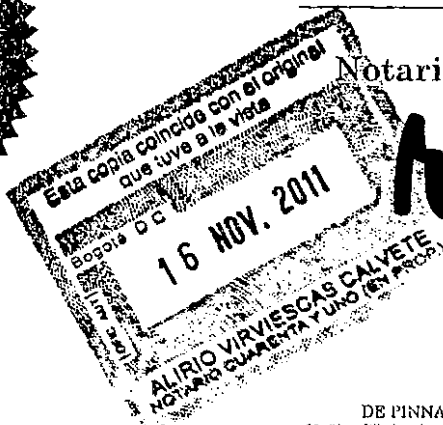
QUE el citado Señor Don MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

Handwritten signature of James Kerr Milligan

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



SCOTTISH
NOTARIES

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by James Keef Milligan
a été signé par
3. acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. bears the seal/stamp of Notary Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

5. at London/à Londres

6. the/le 01 SEP 2004

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp:
timbre:

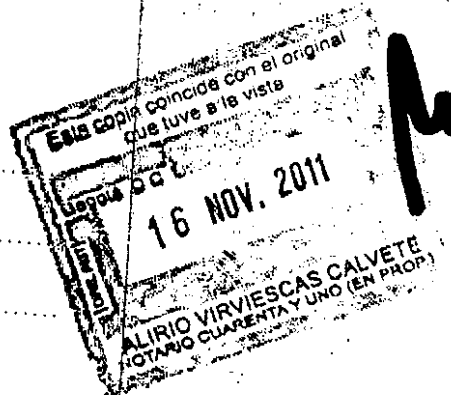


10. Signature: W GLASS

W Glass

For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.



Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

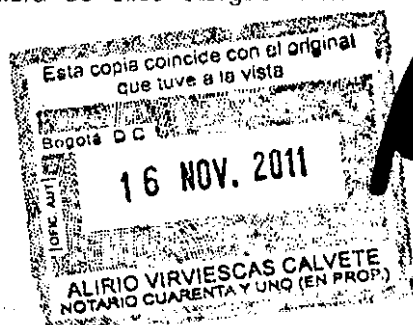
con domicilio en **rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado



The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Belgium**

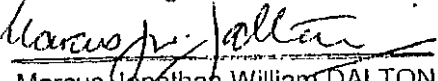
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social, conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

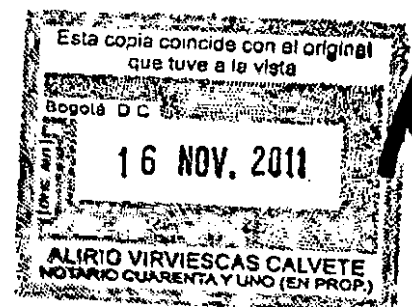
On this day of 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: C07K 14/47	
(22) Fecha de solicitud: 01-12-11		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/181,380	27-05-09	US
	61/220,396	25-06-09	US
		(72) Inventor(es): BLAIS, Normand; HARVEY, Martine; PILORGET, Anthony; RIOUX, Clément.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 27-12-11		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 02-12-10
	Fecha de presentación de la solicitud: 25-05-10		No. publicación: WO 2010/136443 A1
	No. de solicitud: PCT/EP2010/057141		
(54) Título: "CONSTRUCCIONES DE CASB7439"			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente divulgación se refiere a compuestos y métodos para aumentar la producción recombinante de los polipéptidos CASB7439, y a los métodos para utilizarlos.

Sector: Industria farmacéutica, en particular, polipéptidos CASB7439 modificados y constructos de proteínas que los comprenden, para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 01-12-11	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/47	
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(72) Inventor(es): BLAIS, Normand; HARVEY, Martine; PILORGET, Anthony; RIOUX, Clément.	
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País
	61/181,380 27-05-09 US
	61/220,396 25-06-09 US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-12-11 (87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha: 02-12-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 25-05-10 No. publicación: WO 2010/136443 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2010/057141	
(54) Título: CONSTRUCCIONES DE CASB7439.	

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐	
(21) No. de solicitud:		(22) Fecha de solicitud: 01-12-11	
(51) Clasificación Internacional: C07K 14/47		FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm	
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
(72) Inventor(es): BLAIS, Normand; HARVEY, Martine; PILORGET, Anthony; RIOUX, Clément.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad			
(31) No. Prioridad		(32) Fecha	(33) País
61/181,380		27-05-09	US
61/220,396		25-06-09	US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 27-12-11		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT		Fecha: 02-12-10	
Fecha de presentación de la solicitud: 25-05-10		No. Publicación: WO 2010/136443 A1	
No. de solicitud: PCT/EP2010/057141			
(54) Título: CONSTRUCCIONES DE CASB7439.			
(57) Resumen - Reivindicación(es):			
Resumen.-			
La presente divulgación se refiere a compuestos y métodos para aumentar la producción recombinante de los polipéptidos CASB7439, y a los métodos para utilizarlos.			
Sector: Industria Farmacéutica, en particular, polipéptidos CASB7439 modificados y constructos de proteínas que los comprenden, para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.			

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SAC/VR63365	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2010/057141	International filing date (day/month/year) 25/05/2010	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 27/05/2009
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☐ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2010/057141

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/057141A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/47 A61K39/00 A61P35/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 01/62778 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; CABEZON SILVA TERESA ELISA VIR [BE]; C) 30 August 2001 (2001-08-30) page 8, paragraph 3 pages 13-14 pages 25-28 page 43 example 1	1-21
Y	WO 02/092627 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; COCHE THIERRY [BE]; GAULIS SWANN ROMAI) 21 November 2002 (2002-11-21) pages 25-30 page 54 page 64, paragraph 3 - page 67, paragraph 1 ----- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 August 2010

Date of mailing of the international search report

13/09/2010

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Domingues, Helena

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2010/057141

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/066506 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; VINALS Y DE BASSOLS CARLOTA [BE]; CASS) 29 August 2002 (2002-08-29) pages 11-12 page 51; example 1 -----	1-21
Y	WO 2008/030559 A2 (CORIXA CORP [US]; XU JIANGCHUN [US]; KING GORDON E [US]; MEAGHER MADEL) 13 March 2008 (2008-03-13) page 26, paragraph 4 - page 27, paragraph 1 -----	1-21
Y	JUBB A M ET AL: "Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia" ONCOGENE, vol. 25, no. 24, June 2006 (2006-06), pages 3445-3457, XP002598199 ISSN: 0950-9232 the whole document -----	1-21
Y	WO 2004/019857 A2 (GENENTECH INC [US]) 11 March 2004 (2004-03-11) page 124, paragraph 5 - page 126, paragraph 1; example 8 -----	1-21
A	ESPOSITO D ET AL: "Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.COPBIO.2006.06.003, vol. 17, no. 4, 1 August 2006 (2006-08-01) , pages 353-358, XP024962788 ISSN: 0958-1669 [retrieved on 2006-08-01] the whole document -----	1-21
A	DYSON MICHAEL R ET AL: "Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression" BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB LNKD- DOI:10.1186/1472-6750-4-32, vol. 4, no. 1, 14 December 2004 (2004-12-14), page 32, XP021005950 ISSN: 1472-6750 the whole document -----	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2010/057141

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0162778	A2	30-08-2001	AU 5615601 A	03-09-2001
			AU 2006201042 A1	30-03-2006
			BR 0108654 A	29-04-2003
			CA 2400842 A1	30-08-2001
			CN 1426421 A	25-06-2003
			CZ 20022874 A3	12-02-2003
			EP 1265915 A2	18-12-2002
			HU 0300054 A2	28-05-2003
			JP 2003530088 T	14-10-2003
			KR 20080029007 A	02-04-2008
			KR 20090085697 A	07-08-2009
			MX PA02008279 A	29-11-2002
			NO 20024002 A	22-10-2002
			NZ 520673 A	24-09-2004
			PL 362698 A1	02-11-2004
			US 2003157118 A1	21-08-2003
WO 02092627	A2	21-11-2002	AU 2002342250 A1	25-11-2002
WO 02066506	A2	29-08-2002	AU 2002249221 A1	04-09-2002
WO 2008030559	A2	13-03-2008	CA 2662915 A1	13-03-2008
			EP 2066810 A2	10-06-2009
			US 2008108070 A1	08-05-2008
WO 2004019857	A2	11-03-2004	AU 2003243398 A1	19-03-2004
			CA 2496925 A1	11-03-2004
			EP 1575515 A2	21-09-2005
			JP 2006512901 T	20-04-2006
			KR 20050057047 A	16-06-2005
			MX PA05002287 A	18-08-2005
			US 2005260634 A1	24-11-2005
			ZA 200501839 A	25-10-2006

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
2 December 2010 (02.12.2010)

(10) International Publication Number
WO 2010/136443 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/47 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2010/057141

(22) International Filing Date:

25 May 2010 (25.05.2010)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/181,380 27 May 2009 (27.05.2009) US
61/220,396 25 June 2009 (25.06.2009) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BLAIS, Normand** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Canada, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 (CA). **HARVEY, Martine** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Canada, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 (CA). **PILORGET, Anthony** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Canada, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 (CA). **RIOUX, Clément** [CA/CA]; GlaxoSmithKline Biologicals Canada, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 (CA).

(74) Agents: **CHIAPPINELLI, Susan** et al.; GlaxoSmithKline, Global Patents CN925.1, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: CASB7439 CONSTRUCTS

(57) Abstract: The present disclosure relates to compounds and methods for increasing the recombinant production of CASB7439 polypeptides, and for methods of utilizing the same.

WO 2010/136443 A1

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

To:

see form PCT/ISA/220

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2010/057141

International filing date (day/month/year)
25.05.2010

Priority date (day/month/year)
27.05.2009

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/47 A61K39/00 A61P35/00

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer Domingues, Helena Telephone No. +49 89 2399-7810 
---	---	--

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2010/057141

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☒ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>3</u>
	No: Claims	<u>1, 2, 4-21</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-21</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/EP2010/057141

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

1. Concerning section VII

Disclosure, Art. 5 PCT

1.1 Claim 1 is a product claim directed to a modified CASB7439 polypeptide comprising at least one expression enhancing modification which comprises at least the deletion of *part or all of the proline-rich region of SEQ ID NO: 13* (CASB7439 polypeptide). The application only discloses expression enhancing modifications which comprise the deletion of the entire proline-rich region of SEQ ID NO: 13 (see for example table on pg. 43). Although the proline-rich region is said to be truncated in the LAVL055 variant (SEQ ID NO: 1), the truncation has actually been made at residue 117 of SEQ ID NO: 13, i.e. before the starting of the proline-rich region (amino acid 133; see pg. 15, §1). Therefore, claim 1, as presently worded, covers the variants disclosed in the present application (CASB7439 those in which the entire *proline-rich region* has been deleted and which show enhanced expression) and a future invention (CASB7439 variants comprising a partial deletion of the *proline-rich region which might show enhanced expression*).

After reading the application, the skilled person would not know if a partial deletion of the proline-rich region would enhance the expression of CASB7439. In order to answer this question, the skilled in the art would have to obtain variants comprising partial deletions of the region in question and to assess the expression of each of those variants. Although the skilled person would have been able to obtain this type of variants using standard molecular biology approaches, he/she would have to investigate the expression levels of each of them without any hint as to which of those variants, if any at all, would have increased expression. This would amount to starting a new research project and would imply tackling problems neither discussed nor envisaged in the present application which would put undue burden on the skilled person.

1.2 According to the data described in the application, for example on pg. 43, the deletion of the *proline-rich region of SEQ ID NO: 13* is not sufficient *per se* to increase the expression of the protein. In fact, variants LVL138 (SEQ ID NO: 33) and LVL160 (SEQ ID NO: 37) comprising a deletion of the entire *proline-rich region* and a N-terminal 6His tag and show a level of expression similar to that of the wild-type protein. In contrast, variants LVL055, LVL111, LVL137, LVL141, LVL144, LVL168 show enhanced expression levels. All of these variants comprise a deletion of the entire *proline-rich region*. Additionally, LVL055, LVL111, LVL137 comprise a 23

residue N-terminal Tag comprising 10 consecutive histidine residues (see legend to table 1 on pg. 40); LVL141, LVL144 are fused N-terminal to a protein D construct; and LVL168 comprises a 10His N-terminal tag.

From the above, it is clear that at least some CASB7439 variants comprising a deletion of the entire proline-rich domain do not show enhanced expression. Hence, the skilled person would not be able to carry out the invention over the entire scope of claim 1.

For the foregoing reasons, claim 1 and claims dependent thereupon do not meet the requirements of Art. 5 PCT.

2. Concerning section VIII

Clarity and support, Art. 6 PCT

The application only describes CASB7439 variants in which the entire proline-rich domain has been deleted. Therefore, the skilled person would not know which other CASB7439 variants, among the many possible ones having at least part of the proline-rich domain deleted, fall under the scope of the claim. Claim 1 and its dependent claims thus lack clarity and support over their entire scope.

3. Novelty (Art. 33(2) PCT) and inventive step (Art. 33(3) PCT)

This opinion is based on the following prior art documents cited in the ISR:

- | | |
|----|--|
| D1 | WO 01/62778 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; CABEZON SILVA TERESA ELISA VIR [BE]; C) 30 August 2001 (2001-08-30) |
| D2 | WO 02/092627 A2 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; COCHE THIERRY [BE]; GAULIS SWANN ROMAN) 21 November 2002 (2002-11-21) |
| D3 | WO 02/066506 A2 (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG [BE]; VINALS Y DE BASSOLS CARLOTA [BE]; CASS) 29 August 2002 (2002-08-29) |

- D4 WO 2008/030559 A2 (CORIXA CORP [US]; XU JIANGCHUN [US]; KING GORDON E [US]; MEAGHER MADEL) 13 March 2008 (2008-03-13)
- D5 JUBB A M ET AL: "Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia" ONCOGENE, vol. 25, no. 24, June 2006 (2006-06) , pages 3445-3457, XP002598199 ISSN: 0950-9232
- D6 WO 2004/019857 A2 (GENENTECH INC [US]) 11 March 2004 (2004-03-11)
- D7 ESPOSITO D ET AL: "Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags" CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY, LONDON, GB LNKD- DOI:10.1016/J.COPBIO.2006.06.003, vol. 17, no. 4, 1 August 2006 (2006-08-01) , pages 353-358, XP024962788 ISSN: 0958-1669 [retrieved on 2006-08-01]
- D8 DYSON MICHAEL R ET AL: "Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: Identification of protein features that correlate with successful expression" BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB LNKD- DOI:10.1186/1472-6750-4-32, vol. 4, no. 1, 14 December 2004 (2004-12-14) , page 32, XP021005950 ISSN: 1472-6750

3.1 The available prior art does not describe CASB7439 variants comprising a deletion of part or all of the proline-rich region of SEQ ID NO: 13. Hence, claims 1-21 appear to be novel.

3.2 Any of D1-D3, D5 or D6 can be considered the closest prior art for claim 1. These documents disclose the sequence of the CASB7439 polypeptide and that this molecule is overexpressed in different forms of cancer, namely colorectal (D1, D4-D6), lung (D2) and breast (D3) tumors, compared to normal tissue. Immunogenic compositions comprising this molecule are suggested in D1 (pgs. 25-28 and claims) and D2 (pgs. 25-30).

The difference between the polypeptide of claim 1 and the CASB7439 polypeptide described in the closest prior art resides in the fact that the former comprises at least one expression enhancement modification which comprises at least the deletion of *part or all of the proline-rich region*.

The technical effect associated with the deletion of *part or all of the proline-rich region* is, as recited in the claim, the enhancement of protein expression.

The technical problem is the provision of CASB7439 variants showing enhanced expression.

The skilled person when faced with this problem would have thought of various approaches common in the art, such as, for example, the use of fusion tags (see D7). The skilled person would also be aware of protein engineering strategies which may help increase expression levels, such as truncation to minimise the molecular weight, the number of low complexity regions or the number of hydrophobic residues (see D8, e.g. pg. 12, §2). However, no hint could be found in the available prior art, that deletion of *part or all of the proline-rich domain of CASB7439* would result in increased expression levels. In fact, no suggestion could be found in the prior art which would lead the skilled person to think that this approach would result in increased expression whereas other approaches common in the art, such as a N-terminal fusion to a protein D construct (LVL016) would not (see pg. 43). The prior art also contains no indication that deletion of the proline-rich domain would increase expression levels whereas deletion of other domains would not (see pg. 43). In view of this, it seems possible to acknowledge inventive step over the prior art in as far as the technical problem has been solved. In this regard, attention is drawn to the fact that, as discussed under item 1.2 (see above), not all the variants comprising a deletion of the *proline-rich region*, such as LVL138 and LVL160, solve the technical problem. For this reason, it is not presently possible to recognise inventive step over the entire scope of claims 1, 2 and 15.

In light of the above and given the fact that CASB7439 is known to be immunogenic in rabbits (D2, pgs. 65-66), the immunogenic compositions of claims 4-14 and their use in a method of inducing an immune response to CASB7439 (claims 18 and 20) also lack inventive step over their entire scope.

In view of the results described in the examples and summarised in table 3 (pg. 43), it seems possible to acknowledge inventive step for claim 3.

3.3 D2 shows that CASB7439 is immunogenic in rabbits and that when formulated with adjuvant, as a vaccine, it is able to induce a strong and specific antibody immune response (see pg. 65, §3 and pg. 66). This document can be considered the closest prior art for claims 16 and 17.

The technical problem is the provision of an alternative immunogenic variant of CASB7439 useful to induce an immunogenic response against this molecule and in the treatment of cancer. As discussed above the available prior art does not disclose or suggest CASB7439 variants comprising a deletion of the *proline-rich region*, such as LVL144 (SEQ ID NO: 9) and LVL168 (SEQ ID NO: 11) or that these variants would be immunogenic. It would therefore appear possible to recognise inventive merit for claims 16 and 17 over the prior art. However, the technical problem does not appear

to be solved over the entire scope of the claims. In fact, the examples show that the variants in question generate a protective immune response against challenge with colorectal cancer cells expressing CASB7439 in CB6f1 mice (study 1.2, 2.1 and 2.3) but not in the same mice in another study (1.4) or in C57Bl/6 mice. From these data it is questionable whether the administration of LVL144 or LVL168 will induce an immune response, particularly a protective immune response, in a human or in (any) non-human animal. Consequently, it does not presently appear possible to recognise inventive step for claims 16, 17, 19 and 21.

4. Attention is drawn to the fact that claims 16 and 17 are directed to a method of treatment of the human and animal body and may not be accepted in the regional phase in Europe.

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, OJ 11/2003, OJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

CONSTRUCCIONES DE CASB7439

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

La presente divulgación se refiere a compuestos y métodos para aumentar la producción recombinante de los polipéptidos CASB7439, y a los métodos para utilizarlos.

10

SECTOR: Industria farmacéutica, en particular, polipéptidos
15 CASB7439 modificados y constructos de proteínas que los comprenden, para la preparación de medicamentos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

20

25

CONSTRUCCIONES DE CASB7439

ANTECEDENTES

Los homólogos de Achaete-Scute de mamífero son
5 cognados de mamífero conservados del complejo Achaete-Scute
de *Drosophila*. Son miembros de la familia genética básica de
hélice-ciclo-hélice (bHLH o HLH), que funcionan como factores
de transcripción específicos del linaje, esenciales para el
10 desarrollo. Un miembro de murino de la familia, MASH2, es
esencial para el desarrollo de una placenta, pero no es
importante para el desarrollo del embrión apropiado. HASH2, el
ortólogo humano del gen MASH2, fue clonado en 1997 por
Alders y colaboradores (designado como "ASCL2" por los
15 autores). Alders y colaboradores (1997) *Hum. Molec. Genet.* 6:
859-867.

Como se describe en la Publicación Internacional Número
WO01/62778, los estudios de expresión revelaron que la
transcripción de HASH2 (denominada como CASB7439 en la
20 misma) se sobre-expresa en los tumores colo-rectales
comparándose con el colon normal adyacente, y con otros
tejidos normales probados. Este gen se sobre-expresa en los
pacientes con adenocarcinoma en etapas I a IV. Por
25 consiguiente, la proteína se puede considerar como un antígeno

de cáncer útil en un planteamiento inmunoterapéutico para mitigar el cáncer de un sujeto, por ejemplo, utilizando el CASB7439 recombinante como un producto inmuno-terapéutico de cáncer específico del antígeno (ASCI).

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En la presente se proporcionan compuestos y métodos para aumentar la producción recombinante de los polipéptidos CASB7439. En algunas modalidades, se proporcionan los polipéptidos CASB7439 modificados, así como construcciones de proteínas que comprenden estos polipéptidos CASB7439 modificados. Los polipéptidos CASB7439 modificados mencionados comprenden cuando menos una modificación para la producción mejorada del CASB7439. Los Solicitantes también dan a conocer moléculas de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de polinucleótido que codifica los polipéptidos CASB7439 modificados y las construcciones de proteínas que comprenden estos polipéptidos CASB7439 modificados, como se describen en la presente. En ciertos aspectos, los Solicitantes dan a conocer construcciones de proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos (aa) y las secuencias de nucleótidos (ADN) que las codifican, como sigue:

- LVL055 [SEQ ID NO: 1 (aa); SEQ ID NO: 2 (ADN)];
- LVL111 [SEQ ID NO: 3 (aa); SEQ ID NO: 4 (ADN)];

25

- LVL137 [SEQ ID NO: 5 (aa); SEQ ID NO: 6 (ADN)];
- LVL141 [SEQ ID NO: 7 (aa); SEQ ID NO: 8 (ADN)];
- LVL144 [SEQ ID NO: 9 (aa); SEQ ID NO: 10 (ADN)]; y
- LVL168 [SEQ ID NO: 11 (aa); SEQ ID NO: 12 (ADN)].

5 También se dan a conocer métodos y procesos que utilizan las moléculas de ácidos nucleicos descritas en la presente, para la producción de construcciones de proteínas.

10 Los Solicitantes también dan a conocer composiciones inmunogénicas, comprendiendo estas composiciones uno o más de los polipéptidos CASB7439 modificados o de las construcciones descritas en la presente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo o excipiente puede comprender opcionalmente un regulador.

15 En algunas modalidades, se da a conocer el uso del los polipéptidos CASB7439 modificados o las construcciones de proteínas descritas en la presente — o las moléculas de ácidos nucleicos que las codifican — en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer colo-rectal. En
20 algunas modalidades, se dan a conocer construcciones de proteínas como se dan a conocer en la presente, para utilizarse en terapia, en particular en la terapia de cáncer colo-rectal. En algunas modalidades, se dan a conocer métodos para provocar
25 una respuesta inmunitaria contra el CASB7439 en un sujeto con

cáncer colo-rectal, comprendiendo el método: (a) seleccionar un sujeto con cáncer colo-rectal; y (b) administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición inmunogénica, la cual comprende los polipéptidos CASB7439 modificados o la construcción como se describe en la presente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo o excipiente puede comprender opcionalmente un regulador.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1/35. Esta Figura presenta un diagrama esquemático que ilustra diferentes regiones del polipéptido CASB7439, de una manera específica: el dominio específico del ADN (de enlace del ADN), el dominio bHLH, y la región rica en prolina. Véase el Ejemplo 2 para los detalles. También se muestran representaciones esquemáticas de las siguientes regiones: Dirección al núcleo (flecha gris); hélice alfa (cilindros grises); bobina enrollada (cilindros negros); trastorno intrínseco (flechas negras); y baja complejidad (cuadro gris).

Figura 2/35. Esta Figura presenta un diagrama esquemático que ilustra diferentes truncados del polipéptido CASB7439 (flechas negras) alineados con el polipéptido CASB7439 completo. Véase el Ejemplo 4 para los detalles.

Figura 3/35. Esta Figura presenta un diagrama esquemático del CASB7439 que muestra la localización

aproximada de la región rica en prolina, y los epítomos identificados y predictivos. Diferentes modalidades comprenden un polipéptido CASB7439 modificado mediante la remoción de algunos o todos los aminoácidos dentro de la región rica en prolina. Estos polipéptidos CASB7439 modificados conservan una alta porción de epítomos dentro del polipéptido CASB7439.

Figura 4/35. Se muestra una alineación entre la secuencia del polipéptido CASB7439 no modificado (SEQ ID NO: 13), y la secuencia de polipéptido resultante de dos posibles modificaciones al polipéptido CASB7439: la primera en donde se suprimen 21 residuos de aminoácidos contiguos (133-153, inclusive); la segunda en donde se suprimen 21 residuos de aminoácidos contiguos (131-151, inclusive). Además, se puede prever una tercera modificación al polipéptido CASB7439, en donde se suprimen 21 residuos de aminoácidos contiguos (132-152, inclusive). Como se muestra en la Figura, la secuencia del polipéptido CASB7439 modificada resultante (insertada, encerrada en un círculo) en la región de la supresión es la misma para las tres modificaciones. Esto es debido a los residuos de aminoácidos RG repetidos en las posiciones 131-132 y 152-153 de la SEQ ID NO: 13.

Figura 5/35. Esta Figura presenta la alineación de una secuencia de aminoácidos entre las construcciones de proteínas

del Ejemplo 6. CASB7439 = la secuencia de aminoácidos de HASH2 (SEQ ID NO: 13); LVL088 (SEQ ID NO: 27); LVL111 (SEQ ID NO: 3); LVL137 (SEQ ID NO: 5); LVL138 (SEQ ID NO: 33); LVL168 (SEQ ID NO: 11).

5 Figura 6/35. Esta Figura presenta una alineación entre la secuencia de aminoácidos de HASH2 (CASB7439) (SEQ ID NO: 13), y las siguientes construcciones de proteínas: LVL168 (SEQ ID NO: 11); pD1/3 (SEQ ID NO: 39); y LVL144 (SEQ ID
10 NO: 9).

Figura 7/35. Análisis de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real de la expresión del ARNm de CASB7439 in tejidos normales (12), y de cáncer colo-rectal (83). Véase el Ejemplo 9.

15 Figura 8/35. Correspondencia entre el ARNm de CASB7439 y la expresión de la proteína in diferentes muestras de cáncer colo-rectal (CRC) humano. ● (círculos negros) representan la expresión del ARNm de CASB7439 en las
20 muestras de cáncer de colon, mientras que O (círculos huecos) representan la expresión del ARNm de CASB7439 en los tejidos normales adyacentes. El nivel correspondiente de la proteína CASB7439 detectado mediante la inmunofluorescencia se indica
25 arriba de cada muestra (- ninguna expresión, +/- muy baja expresión, + baja expresión, ++ fuerte expresión, y +++ muy

fuerte expresión). CRC: tumores primarios, METS: metástasis, NAT: tejidos normales adyacentes. Todas las muestras son adenocarcinomas de colon excepto las muestras 22440 y 24762, las cuales son carcinomas mucinosos. Véase el Ejemplo 9.

5 Figura 9/35: El banco de péptidos que cubren la secuencia de la proteína CASB7439 entera utilizada para la re-estimulación de los esplenocitos después de la inmunización con diferentes construcciones de CASB7439 se estipula en esta
10 tabla. Véase el Ejemplo 10.

Figura 10/35. Se muestra la matriz peptídica del CASB7439, utilizada para las investigaciones de inmunogenicidad de células-T. Véase el Ejemplo 10.

15 Figura 11/35. Respuesta de CD4 expresada como el porcentaje de células-T CD4 doblemente positivas ($\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$) en cuatro razas de ratones endógamos (C57BL6, BALBC, CB6F1, y C3H) inmunizados con LVL111 + AS01B en seguida de la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (reservas, planteamiento de matriz). Véase el Ejemplo 10,
20 Experimento de comparación de múltiples razas de ratones endógamos.

Figura 12/35. Respuesta de CD4 expresada como el porcentaje de células-T CD4 doblemente positivas ($\text{IFN}\gamma/\text{TNF}\alpha$)
25 en las cuatro razas de ratones endógamos inmunizados con

LVL111 + AS15 en seguida de la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (reservas, planteamiento de matriz). Véase el Ejemplo 10, Experimento de comparación de múltiples razas de ratones endógamos.

5 Figura 13/35. Identificación de péptidos de CASB7439 inmunogénicos CD4 en las cuatro razas de ratones endógamos discutidas en el párrafo anterior. Gris claro = del 0.2 al 0.4 por ciento de células-T CD4 doblemente positivas (IFN γ /TNF α); gris
10 oscuro $\geq$ 0.5 por ciento de células-T CD4 doblemente positivas (IFN γ /TNF α). Véase el Ejemplo 10, Experimento de comparación de múltiples razas de ratones endógamos.

 Figura 14/35. Identificación de péptidos de CASB7439 inmunogénicos CD4 en ratones CD1 exógamos (AS01B Panel
15 superior; AS15 Panel inferior). Gris claro = del 0.2 al 0.4 por ciento de células-T CD4 doblemente positivas (IFN γ /TNF α); gris oscuro $\geq$ 0.5 por ciento de células-T CD4 doblemente positivas (IFN γ /TNF α). Véase el Ejemplo 10, Inmunogenicidad del
20 CASB7439 en los ratones: Inmunogenicidad de células-T de CASB7439 en ratones exógamos.

 Figura 15/35. Respuestas de células-T CD4 y CD8 expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α) en los ratones exógamos CD1 individuales inmunizados con
25 LVL111, LVL168, o LVL144 formulados con AS15, en seguida de

la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (reservas de péptidos inmunodominantes). Véase el Ejemplo 10, Estudios de LVL111, LVL168, y LVL144 en ratones exógamos.

Figura 16/35. Respuestas de células-T CD4 (expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los leucocitos de sangre periférica reservados (PBL) aislados a partir de los ratones transgénicos HLA A2.1/DR-1 inmunizados con cualquiera de LVL168 (SEQ ID NO: 11) o LVL144 (SEQ ID NO: 9), formulados con AS15, en seguida de la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (7 reservas de 7 péptidos/reserva + péptido 24 (SEQ ID NO: 76)).

Figura 17/35. Respuestas de células-T CD8 (expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los leucocitos de sangre periférica (PBL) reservados aislados a partir de los ratones transgénicos HLA A2.1/DR-1 inmunizados con cualquiera de LVL168 (SEQ ID NO: 11) o LVL144 (SEQ ID NO: 9), formulados con AS15, en seguida de la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (7 reservas de 7 péptidos + péptido 24 (SEQ ID NO: 76)).

Figura 18/35. Respuestas de células-T CD4 (expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los esplenocitos aislados a partir de los ratones transgénicos HLA A2.1/DR-1 inmunizados con cualquiera de LVL168 (SEQ ID NO:

11) o LVL144 (SEQ ID NO: 9), formulados con AS15, en seguida de la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (7 reservas de 7 péptidos + péptido 24 (SEQ ID NO: 76)).

5 Figura 19/35. Respuestas de células-T CD8 (expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los esplenocitos aislados a partir de los ratones transgénicos HLA A2.1/DR-1 inmunizados con cualquiera de LVL168 (SEQ ID NO: 11) o LVL144 (SEQ ID NO: 9), formulados con AS15, en seguida
10 de la re-estimulación con los péptidos traslapados CASB7439 (7 reservas de 7 péptidos + péptido 24 (SEQ ID NO: 76)).

 Figura 20/35. Análisis del transcurso del tiempo de la respuesta de anticuerpos específica del CASB7439 (IgG1 e IgG2a) desencadenada después de las inmunizaciones con
15 LVL111 + AS01B o LVL111 + AS15 en los ratones endógamos CB6f1. Véase el Ejemplo 10, Inmunogenicidad del CASB7439 en los ratones: Respuesta humoral mediada por CASB7439.

 Figura 21/35. Respuesta humoral específica de CASB7439 en los ratones CB6f1 endógamos (IgG1 e IgG2a)
20 después de las inmunizaciones con LVL111, LVL168, o LVL144 formulados con el adyuvante AS15 o con el adyuvante AS15 solo. Véase el Ejemplo 10, Inmunogenicidad del CASB7439 en los ratones: Respuesta humoral mediada por CASB7439.

25 Figura 22/35. Respuesta inmunitaria humoral específica

de CASB7439 (Titulación de IgG) en ratones exógamos CD1 inmunizados con LVL111, LVL168, o LVL144 formulados con el adyuvante AS15, o con el adyuvante AS15 solo; se utilizaron ratones limpios como control. Véase el Ejemplo 10, Estudios de

5 Ratones CD1.

Figura 23/35. Injerto de tumor TC1/CASB7439 #14 en los ratones CB6f1 inmunizados con LVL111 formulado con AS01B (arriba) o AS15 (abajo). Véase el Ejemplo 11, Estudio #1.1. En

10 el panel superior, el orden de las curvas en la gráfica de arriba a abajo es 'regulador', LVL111 (10 microgramos), LVL111 (10 microgramos) + AS01B, y LVL111 (1 microgramo) + AS01B. En el panel inferior, la curva de la parte inferior es LVL111 (10 microgramos) + AS15.

15 Figura 24/35. Las curvas de sobrevivencia a partir del Ejemplo 11, Estudio #1.2, se presentan en los paneles superior, medio, e inferior. TF: sin tumor. (arriba) La curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con regulador de solución salina, LVL111 sin adyuvante, o adyuvante solo

20 (AS01 o AS15), y estimulados con células TC1/CASB7439 #14. El último ratón sobreviviente a partir del grupo inmunizado con LVL111 murió primero, seguido por el último ratón sobreviviente a partir del grupo con AS01B, seguido por el último ratón

25 sobreviviente a partir del grupo con AS15, y el último ratón

sobreviviente a partir del grupo con regulador. (Parte media)
Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con
AS15 solo o con las dosificaciones indicadas de LVL111
formulado con AS15 y estimulados con células TC1/CASB7439
#14. El último ratón sobreviviente a partir del grupo con AS15
murió primero. De los otros grupos, el grupo con 30
microgramos tuvo la menor cantidad de sobrevivientes, seguido
por el grupo con 1 microgramo, luego el grupo con 10
microgramos, que tuvo la mayor cantidad de sobrevivientes.
(Abajo) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1
inmunizados con AS01B solo o con las dosificaciones indicadas
de LVL111 formulado con AS01B y estimulados con células
TC1/CASB7439 #14. En este panel, los últimos ratones
sobrevivientes a partir de los grupos con 10 microgramos y con
AS01B, murieron el mismo día. Los grupos con 1 microgramo y
con 30 microgramos tuvieron el mismo porcentaje de
sobrevivencia en el día final.

Figura 25/35. Se presentan las curvas de sobrevivencia
a partir del Ejemplo 11, Estudio #1.3. TF: sin tumor. (Arriba)
Curva de sobrevivencia para los ratones CB6f1 inmunizados con
LVL111, LVL144, o LVL168 formulados con AS15, o AS15 solo,
y estimulados con las células TC1/CASB7439#14. (Abajo) Curva
de sobrevivencia para los ratones CB6f1 inmunizados con

LVL111, LVL144, o LVL168 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células MC38/CASB7439#35.

Figura 26/35. Se presentan las curvas de sobrevivencia a partir del Ejemplo 11, Estudio #1.4. TF: sin tumor. (Arriba) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con LVL144 o LVL168 formulados con AS15, o con AS15 solo, y estimulados con células TC1/CASB7439 #14. El grupo inmunizado con LVL144 tuvo un porcentaje de sobrevivencia marginalmente mayor. (Parte media) Curva de sobrevivencia para los ratones CB6f1 inmunizados con LVL144 o LVL168 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2 clonales. Los ratones inoculados con LVL144 tuvieron un porcentaje de sobrevivencia ligeramente más alto. (Abajo) Curva de sobrevivencia para los ratones CB6f1 inmunizados con LVL144 o LVL168 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células MC38/CASB7439 #35. Los ratones inoculados con LVL144 no tuvieron sobrevivientes.

Figura 27/35. Se presentan las curvas de sobrevivencia a partir del Ejemplo 11, Estudio #2.1. TF: sin tumor. (Arriba) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 6.25 microgramos de LVL168 y 10 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las

células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de ratones inoculados con LVL168 tuvo un porcentaje de sobrevivencia ligeramente más alto. (Parte media superior) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 3.1 microgramos de LVL168 y 5 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de ratones inoculados con LVL144 tuvo un porcentaje de sobrevivencia ligeramente más alto. (Parte media inferior) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 1.55 microgramos de LVL168 y 2.5 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o con AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de ratones inoculados con LVL144 tuvo el porcentaje de sobrevivencia más alto. (Abajo) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 0.77 microgramos de LVL168 y 1.25 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o con AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de ratones inoculados con LVL168 tuvo un porcentaje de sobrevivencia ligeramente más alto.

Figura 28/35. Se presentan las curvas de sobrevivencia a partir del Ejemplo 11, Estudio #2.2. TF: sin tumor. (Arriba) Curva de sobrevivencia de los ratones C57Bl/6 inmunizados con 6.25 microgramos de LVL168 ó 10 microgramos de LVL144

formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. (Parte media superior) Curva de supervivencia de los ratones C57Bl/6 inmunizados con 3.1 microgramos de LVL168 ó 5 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. (Parte media inferior) Curva de supervivencia de los ratones C57Bl/6 inmunizados con 1.55 microgramos de LVL168 ó 2.5 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. (Abajo) Curva de supervivencia de los ratones C57Bl/6 inmunizados con 0.77 microgramos de LVL168 o 1.25 microgramos de LVL144 formulados con AS15, o AS15 solo, y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2.

Figura 29/35. Se presentan las curvas de supervivencia a partir del Ejemplo 11, Estudio #2.3. TF: sin tumor. (Arriba) Curva de supervivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 6.25 microgramos de LVL168 ó 10 microgramos de LVL144 formulados con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de los ratones que recibieron LVL168, tuvo el porcentaje de supervivencia más alto, seguido por el grupo que recibió LVL144. No hubo supervivientes en el grupo que recibió solamente AS15. (Parte media) Curva de supervivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 3.1

microgramos de LVL168 y 5 microgramos de LVL144 formulados con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de los ratones que recibieron LVL168, tuvo el porcentaje de sobrevivencia más alto, seguido por el grupo que recibió LVL144. No hubo sobrevivientes en el grupo que recibió solamente AS15. (Abajo) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 1.55 microgramos de LVL168 y 2.5 microgramos de LVL144 formulados con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de los ratones que recibieron LVL168, tuvo el porcentaje de sobrevivencia más alto, seguido por el grupo que recibió LVL144. No hubo sobrevivientes en el grupo que recibió solamente AS15. Se utilizó el regulador de solución salina o el AS15 solo como control.

Figura 30/35. Curvas de sobrevivencia a partir del Ejemplo 11, Estudio #2.3. TF: sin tumor. (Arriba) Curva de sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 0.77 microgramos de LVL168 o 1.25 microgramos de LVL144 formulados con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de los ratones que recibieron LVL168, tuvo el porcentaje de sobrevivencia más alto, seguido por el grupo que recibió LVL144. No hubo sobrevivientes en el grupo que recibió solamente AS15. (Parte media) Curva de

sobrevivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 0.19 microgramos de LVL168 o 0.31 microgramos de LVL144 formulados con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de los ratones que recibieron LVL168, tuvo el porcentaje de supervivencia más alto. El último ratón sobreviviente a partir del grupo que recibió LVL144 sobrevivió al último sobreviviente a partir de tanto el grupo con AS15 como el grupo con regulador. (Abajo) Curva de supervivencia de los ratones CB6f1 inmunizados con 0.048 microgramos de LVL168 o 0.078 microgramos de LVL144 formulados con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. El grupo de los ratones que recibieron LVL168, tuvo el porcentaje de supervivencia más alto. El último ratón sobreviviente a partir del grupo que recibió LVL144 sobrevivió al último sobreviviente a partir de tanto el grupo con AS15 como el grupo con regulador. Se utilizó el regulador de solución salina o el AS15 solo como control.

Figura 31/35. Injerto de tumor TC1/CASB7439 #14-2 en ratones CB6f1 machos y hembras inmunizados con 1 microgramo de LVL168 formulado con AS15; se utilizó el AS15 solo como control (arriba). Injerto de tumor TC1/CASB7439 #14-2 en los ratones C57Bl/6 inmunizados con 1 microgramo de LVL168 formulado con AS15; se utilizó el AS15 solo como

control (abajo).

Figura 32/35. Panel superior: Curva de supervivencia de los ratones CB6f1 machos y hembras inmunizados con 1 microgramo de LVL168 formulado con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. Se utilizó el AS15 solo como control en los ratones CB6f1 tanto machos como hembras. Entre los ratones CB6f1 inmunizados con LVL168 más AS15, hubo 7 machos sin tumor (TF) y 3 hembras sin tumor (TF). No hubo TF entre los ratones que recibieron AS15 solo. Panel inferior: Curva de supervivencia de los ratones C57Bl/6 inmunizados con 1 microgramo de LVL168 formulado con AS15 y estimulados con las células TC1/CASB7439 #14-2. Se utilizó el AS15 solo como control en los ratones C57Bl/6 tanto machos como hembras. Entre los ratones C57Bl/6 inmunizados con LVL168 más AS15, hubo 2 machos sin tumor (TF) y 1 hembra sin tumor (TF). Entre los ratones que recibieron AS15 solo, hubo 5 machos sin tumor (TF) y 1 hembra sin tumor (TF).

Figura 33/35. Respuesta inmunitaria humoral específica de CASB7439 (Titulación de IgG) en los ratones CB6f1 machos (círculos negros), y hembras (círculos grises) inmunizados con 1 microgramo de LVL168 formulado con AS15, o con AS15 solo (izquierda). Respuesta inmunitaria humoral específica de CASB7439 (Titulación de IgG) en los ratones C57/BL6 machos

(círculos negros), y hembras (círculos grises) inmunizados con 1 microgramo de LVL168 formulado con AS15, o con AS15 solo (derecha).

Figura 34/35. Respuestas de células-T CD4 (expresadas
5 como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los leucocitos de sangre periférica (PBL) reservados aislados a partir de los ratones CB6f1 inmunizados con cualquiera de 1 microgramo de LVL168 (SEQ ID NO: 11) formulado con AS15, o
10 AS15 solo, en seguida de la re-estimulación con un banco de 46 péptidos (Véase la Figura 9) que cubren la secuencia de la proteína CASB7439 entera (arriba). Respuestas de células-T CD4 (expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los leucocitos de sangre periférica (PBL)
15 reservados aislados a partir de los ratones C57/BL6 inmunizados con cualquiera de 1 microgramo de LVL168 (SEQ ID NO: 11) formulado con AS15, o AS15 solo, en seguida de la re-estimulación con los péptidos reservados de CASB7439 de un banco de 46 péptidos (Véase la Figura 9) que cubren la
20 secuencia de la proteína CASB7439 entera (parte inferior izquierda); péptido 39 de CASB7439 (SEQ ID NO: 91) (Parte media inferior); o RPMI (parte inferior derecha).

Figura 35/35. Respuestas de células-T CD8 (expresadas
25 como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los

leucocitos de sangre periférica (PBL) reservados aislados a partir de los ratones CB6f1 inmunizados con cualquiera de 1 microgramo de LVL168 (SEQ ID NO: 11) formulado con AS15, o AS15 solo, en seguida de la re-estimulación con un banco de 46
5 péptidos (Véase la Figura 9) que cubren la secuencia de la proteína CASB7439 entera (arriba). Respuestas de células-T CD8 (expresadas como el porcentaje del doble positivo (IFN γ /TNF α)) en los leucocitos de sangre periférica (PBL) reservados aislados a partir de los ratones C57/BL6
10 inmunizados con cualquiera de 1 microgramo de LVL168 (SEQ ID NO: 11) formulado con AS15, o AS15 solo, en seguida de la re-estimulación con un banco de 46 péptidos (Véase la Figura 9) que cubren la secuencia de la proteína CASB7439 entera (parte inferior izquierda); péptido 39 de CASB7439 (SEQ ID NO: 91)
15 (parte media inferior); o RPMI (parte inferior derecha).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un obstáculo para un producto inmunoterapéutico
20 comercialmente aceptable es la producción de cantidades comercialmente aceptables del antígeno de cáncer recombinante. En general y sin limitación, un nivel de producción comercialmente aceptable para un polipéptido recombinante es de alrededor del 5 por ciento de la proteína
25 total producida por la célula huésped, como se estima en un gel

de SDS-PAGE teñido con azul Coomassie.

Hay numerosas razones por las cuales una secuencia de polipéptido nativa puede proporcionar solamente pequeñas cantidades cuando se produce por medios recombinantes. Los planteamientos para aumentar la producción del polipéptido incluyen variar los sistemas de expresión del huésped o la optimización de codones. Sin embargo, estos planteamientos convencionales no siempre dan como resultado una producción aceptable del polipéptido, y la producción para algunos polipéptidos sigue siendo comercialmente prohibitiva. Como se describe con mayor detalle más adelante, los Solicitantes investigaron si un polipéptido CASB7439 modificado produciría niveles aceptables de proteína por medios recombinantes.

En algunas modalidades, se proporcionan los polipéptidos CASB7439 modificados, en donde la modificación consiste en, o comprende, el truncamiento C-terminal del polipéptido CASB7439, de tal manera que se remueve toda o una porción de la región rica en prolina. En algunas modalidades, la modificación del polipéptido CASB7439 consiste en, o comprende, la supresión de toda o una porción de la región rica en prolina. En algunas modalidades, se proporcionan los polipéptidos CASB7439 modificados que conservan cuando menos el residuo de aminoácido 193 de la SEQ ID NO: 13, pero

en donde se suprime toda o una porción de la región rica en prolina.

En otras modalidades, se proporcionan construcciones de proteínas que comprenden un polipéptido CASB7439 modificado
5 como se describe en la presente. En algunas modalidades, estas construcciones de proteínas comprenden además uno o más polipéptidos heterólogos. En algunas modalidades, el polipéptido heterólogo es un componente de fusión, como se describe con mayor detalle en cualquier otra parte. En las
10 modalidades particularmente adecuadas, estas construcciones de proteínas comprenden un polipéptido heterólogo localizado N-terminal del polipéptido CASB7439 modificado. En las modalidades particularmente adecuadas adicionales, se proporcionan construcciones de proteínas en donde el
15 polipéptido heterólogo es un fragmento de la Proteína D de *H. influenzae* (como se describe con mayor detalle más adelante) localizada N-terminal del polipéptido CASB7439 modificado.

En algunas modalidades, se proporcionan construcciones
20 de proteínas en donde el polipéptido heterólogo comprende una región de poli-histidina. En las modalidades adicionales, la secuencia de poli-histidina se localiza en la porción C-terminal de la construcción de la proteína. En otras modalidades, la
25 secuencia de poli-histidina se localiza en el término C de la

construcción de la proteína. En las modalidades adicionales, la
secuencia de poli-histidina se localiza en la porción N-terminal
de la construcción de la proteína. En otras modalidades, la
secuencia de poli-histidina se localiza en el término N de la
5 construcción de la proteína. En las modalidades adecuadas, la
región de poli-histidina comprende diez o más residuos de
histidina consecutivos. En las modalidades particularmente
adecuadas, la región de poli-histidina comprende diez o más
10 residuos de histidina consecutivos localizados N-terminales del
polipéptido CASB7439 modificado. En algunas modalidades, se
puede incluir más de una región de poli-histidina en una o más
de las localizaciones descritas en la presente.

En algunas modalidades, se proporcionan construcciones
15 de proteínas en donde el polipéptido heterólogo es una proteína
portadora químicamente conjugada con el polipéptido
CASB7439 modificado.

En algunas modalidades, se proporcionan construcciones
20 de proteínas que comprenden un polipéptido heterólogo que es
una región de poli-histidina, y un polipéptido heterólogo que es
una proteína portadora. En algunas modalidades, se
proporcionan construcciones de proteínas que comprenden un
polipéptido heterólogo que es una región de poli-histidina, y un
25 polipéptido heterólogo que es un componente de fusión. En

algunas modalidades, se proporcionan construcciones de proteínas que comprenden un polipéptido heterólogo que es una región de poli-histidina, un polipéptido heterólogo que es un componente de fusión, y un polipéptido heterólogo que es una
5 proteína portadora.

Los Solicitantes también dan a conocer modalidades de cada una de las construcciones descritas en los párrafos de la presente, en donde se han removido algunos o todos los
10 polipéptidos heterólogos, tales como una región de poli-histidina. Las composiciones y los métodos para la remoción de los polipéptidos heterólogos son conocidos en la materia, incluyendo, sin limitación, la digestión con endo- o exo-peptidasas, la modificación química o el rompimiento del enlace
15 entre el polipéptido heterólogo y el resto de la molécula, y similares.

Los Solicitantes también dan a conocer en la presente composiciones inmunogénicas, comprendiendo estas composiciones cualquier polipéptido CASB7439 modificado o
20 construcción de proteína que comprende un polipéptido CASB7439 modificado como se describe en la presente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo o excipiente puede comprender opcionalmente un
25 regulador. En ciertos aspectos, estas composiciones

comprenden además un adyuvante. En ciertos aspectos, estas composiciones comprenden un adyuvante que provoca cuando menos una respuesta inmunitaria de Th1. En ciertos aspectos, el adyuvante descrito en la presente comprende cuando menos uno de: 3D-MPL, QS21, y CpG. En algunas modalidades, la composición comprende 3D-MPL. En otras modalidades, la composición comprende CpG. En algunas modalidades, la composición comprende QS21. En algunas modalidades, la composición comprende QS21 y colesterol. En algunas modalidades, la composición comprende colesterol, 3D-MPL, y QS21 en una formulación liposomal.

Los Solicitantes también dan a conocer en la presente moléculas de ácidos nucleicos, las cuales comprenden las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos CASB7439 modificados y las construcciones como se describen en la presente. En algunas modalidades, se da a conocer un vector que comprende estas moléculas de ácidos nucleicos como se describen en la presente. En algunas modalidades, el vector comprende un vector de expresión procariótico. En algunas modalidades, el vector comprende un vector de expresión eucariótico. En algunas modalidades, la secuencia de polinucleótido que codifica la construcción ha sido optimizada en los codones para la expresión en una célula huésped.

Los Solicitantes también dan a conocer las células huésped que comprenden: (i) una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente, o (ii) un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente. En algunas modalidades, la célula huésped se selecciona a partir del grupo de: células bacterianas, células de insectos, y células de mamíferos.

Algunas modalidades proporcionan una composición inmunogénica, la cual comprende: (i) una molécula de ácido nucleico descrita en la presente, o (ii) un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se describe en la presente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de los polipéptidos CASB7439 modificados o de las construcciones de proteínas descritas en la presente (o las moléculas de ácidos nucleicos que las codifican), en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer colo-rectal. En algunas modalidades, se dan a conocer los polipéptidos CASB7439 modificados o las construcciones de proteínas descritas en la presente (o las moléculas de ácidos nucleicos que las codifican) para utilizarse en terapia, en particular en la terapia de cáncer colo-rectal. En algunas modalidades, se

proporcionan métodos para provocar una respuesta inmunitaria contra el CASB7439 en un sujeto con cáncer colo-rectal, comprendiendo el método: (i) seleccionar un sujeto con cáncer colo-rectal; y (ii) administrar al sujeto una cantidad efectiva de una composición inmunogénica, la cual comprende un polipéptido CASB7439 modificado o una construcción de proteína como se describe en la presente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo o excipiente puede comprender opcionalmente un regulador. En algunas modalidades de los métodos que se dan a conocer en la presente, la composición inmunogénica comprende además un adyuvante. En algunas modalidades del método descrito en la presente, el adyuvante provoca cuando menos una respuesta inmunitaria de Th1. En algunas modalidades del método que se da a conocer en la presente, el adyuvante comprende cuando menos uno de: 3D-MPL, QS21, y CpG. En algunas modalidades del método descrito en la presente, el sujeto es un sujeto humano.

CONSTRUCCIONES DE PROTEÍNAS

Polipéptidos CASB7439

CASB7439, como se ha denominado en la presente, también es conocido como HASH2 o ASCL2. HASH2 es un polipéptido de 193 residuos de aminoácidos de origen humano

(SEQ ID NO: 13). Véase, por ejemplo, Número de Acceso AAB86993. En la presente, se hará referencia a las características del CASB7439 en términos de la secuencia de polipéptido proporcionada en la SEQ ID NO: 13.

5 ***Región rica en prolina***

Una región de alta periodicidad de prolina se encuentra en la SEQ ID NO: 13 en la región de los aminoácidos 127-158. Los Solicitantes denominaron a la región de la SEQ ID NO: 13 desde el aminoácido 133 hasta el aminoácido 153, inclusive, como el dominio o la región "rica en prolina", "de poli-prolina", "tipo poli-prolina", o "poli-pro". De conformidad con lo anterior, como se utiliza en la presente, "rica en prolina", "poli-prolina", "tipo poli-prolina", y "poli-pro" se refiere a esta región (o dominio) de la proteína CASB7439.

15 ***Modificaciones***

Esta divulgación proporciona construcciones de proteínas que comprenden un polipéptido CASB7439, el cual comprende cuando menos una modificación de mejoramiento de expresión. En algunas modalidades, se remueve una porción del polipéptido CASB7439, la porción que comprende toda o una porción de la región rica en prolina. En algunas modalidades, se remueve la porción C-terminal entera del polipéptido CASB7439, lo cual da como resultado un polipéptido CASB7439 truncado

que comprende los residuos de aminoácidos 1-117 de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, un polipéptido heterólogo se coloca N-terminal del polipéptido CASB7439.

5 Como se utiliza en la presente, "mejoramiento de expresión" o "expresión mejorada", en el contexto de un polipéptido CASB7439 modificado, se refiere a una modificación pretendida para aumentar los niveles de expresión de una construcción de proteína que comprende el polipéptido
10 CASB7439 modificado, comparándose con la expresión de una construcción de proteína de otra manera equivalente que comprende un polipéptido CASB7439 no modificado de la SEQ ID NO: 13, es decir, el mismo vector, célula huésped, etc. Cualesquiera de los métodos conocidos en este campo para
15 determinar la cantidad de proteína, son aceptables para determinar si una construcción dada que comprenda un polipéptido CASB7439 modificado, tiene un aumento en el nivel de expresión, comparándose con una construcción de proteína de otra manera equivalente que comprenda un polipéptido
20 CASB7439 no modificado. En algunas modalidades, la producción se puede evaluar utilizando SDS-PAGE y teñido con azul Coomassie.

Remoción de la región rica en prolina

25 En algunas modalidades, la modificación del polipéptido

CASB7439 comprende la supresión de algo de la región rica en prolina. En algunas modalidades, la modificación del polipéptido CASB7439 comprende la supresión de toda la región rica en prolina. En algunas modalidades, la modificación del polipéptido
5 CASB7439 comprende la supresión de los aminoácidos fuera de la región rica en prolina, en adición a la supresión de la región rica en prolina.

En algunas modalidades, la modificación se lleva a cabo
10 mediante el truncamiento de la porción C-terminal de la SEQ ID NO: 13. Por consiguiente, en algunas modalidades, se genera una construcción de proteína, en donde el residuo de aminoácido C-terminal del polipéptido CASB7439 modificado corresponde a un residuo localizado N-terminal de la región rica
15 en prolina de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, se genera una construcción de proteína, en donde el residuo de aminoácido C-terminal del polipéptido CASB7439 modificado corresponde a un residuo localizado dentro de la región rica en prolina de la SEQ ID NO: 13. En algunas modalidades, el
20 residuo de aminoácido C-terminal del polipéptido CASB7439 modificado corresponde al residuo de aminoácido 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143,
25 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, o 152 de la SEQ ID NO:

13.

En algunas modalidades, la modificación comprende la supresión de parte o toda la región rica en prolina. En algunas modalidades, una secuencia del polipéptido CASB7439
 5 modificado corresponde a la SEQ ID NO: 13, de la cual se han suprimido 21 o más residuos de aminoácidos contiguos. Estos 21 o más residuos contiguos corresponden a una secuencia de aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 13 empezando en
 10 cualquiera de los residuos 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, o 152, inclusive. En las modalidades adicionales, una secuencia del polipéptido CASB7439
 15 modificado corresponde a la SEQ ID NO: 13, de la cual se han suprimido 21 residuos de aminoácidos contiguos, empezando estos 21 residuos contiguos en cualquiera de los residuos 131, 132, y 133.

20 En algunas modalidades, la secuencia del polipéptido CASB7439 modificado corresponde a la SEQ ID NO: 13, de la cual se han suprimido uno o más de los residuos 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153. En algunas modalidades, la
 25 secuencia del polipéptido CASB7439 modificado corresponde a

la SEQ ID NO: 13, de la cual se han suprimido dos o más residuos de aminoácidos contiguos en la región de los residuos de aminoácidos 133-153, inclusive.

5 En algunas modalidades, la secuencia del polipéptido CASB7439 modificado corresponde a la SEQ ID NO: 13, de la cual se han suprimido los residuos 133 a 153, inclusive, de la SEQ ID NO: 13. Las modalidades no limitantes de ejemplo incluyen las siguientes:

- 10 ▪ LVL055, SEQ ID NO: 1 (aa);
- LVL111, SEQ ID NO: 3 (aa);
- LVL137, SEQ ID NO: 5 (aa);
- LVL141, SEQ ID NO: 7 (aa);
- LVL144, SEQ ID NO: 9 (aa); y
- 15 ▪ LVL168, SEQ ID NO: 11 (aa).

Secuencias Heterólogas

En algunas modalidades, el polipéptido CASB7439 modificado se combina con un polipéptido heterólogo. El término "heterólogo" con respecto a una molécula de ácido nucleico, a
20 un polipéptido, o a otro componente celular, indica que el componente se presenta en donde no se encuentra normalmente en la naturaleza y/o que se origina a partir de una fuente o especie diferente de una molécula de referencia. Como
25 se utiliza en la presente, las moléculas "heterólogas" incluyen,

sin limitación, proteínas de fusión, proteínas portadoras, y marcas de purificación.

En algunas modalidades, el polipéptido heterólogo se puede conjugar químicamente con el polipéptido CASB7439
5 modificado, es decir, una proteína portadora. En otras modalidades, el polipéptido heterólogo y el polipéptido CASB7439 modificado se pueden expresar como una sola proteína de fusión recombinante. En otras modalidades, un
10 polipéptido CASB7439 modificado y el polipéptido heterólogo se expresan como una sola proteína de fusión recombinante y se conjugan químicamente con otro polipéptido heterólogo.

El polipéptido heterólogo puede ayudar a proporcionar epítopos auxiliares T, incluyendo los epítopos auxiliares T
15 reconocidos por los seres humanos. En el caso de una construcción de proteína que comprende un polipéptido CASB7439 y un polipéptido heterólogo que es una proteína de fusión, el polipéptido heterólogo (componente de fusión) puede
20 ayudar a proporcionar estos epítopos o puede ayudar a expresar la proteína (mejorador de expresión) en rendimientos más altos que la proteína recombinante nativo. El componente de fusión puede ser tanto un componente de fusión inmunológico como un componente mejorador de expresión.

25 ***Proteínas Portadoras***

Una proteína portadora se conjuga químicamente con otro polipéptido de interés. El acoplamiento químico de un polipéptido a una proteína portadora se puede llevar a cabo de cualquier manera conocida en la materia. Por consiguiente, para el acoplamiento covalente directo, es posible utilizar una carbodi-imida, glutaraldehído, o éster de N-[γ-maleimido-butiriloxi]-succinimida, utilizando los enlazadores hetero-bifuncionales comercialmente disponibles comunes, tales como CDAP y SPDP (empleando las instrucciones del fabricante). Después de la reacción de acoplamiento, el conjugado del polipéptido-proteína portadora se puede aislar fácilmente, y se purificó por medio de un método de diálisis, un método de filtración de gel, un método de fraccionamiento, etc.

Los tipos de proteínas portadoras utilizadas en algunas modalidades serán fácilmente conocidas por la persona experta en este campo. La función de algunas proteínas portadoras es proporcionar ayuda de citoquina, con el objeto de ayudar a inducir una respuesta inmunitaria contra el polipéptido acoplado. Por ejemplo, una lista no exhaustiva de proteínas portadoras que se pueden utilizar en la presente invención incluye: Hemocianina de lapa californiana (KLH), albúminas de suero, tales como albúmina de suero bovino (BSA), toxinas bacterianas inactivadas, tales como toxinas de tétanos y de

difteria (TT y DT), o fragmentos recombinantes de las mismas (por ejemplo, Dominio 1 del Fragmento C de TT, o el dominio de translocalización de DT), o el derivado de proteína purificado de tuberculina (PPD).

5 **Componentes de fusión**

A pesar de la disponibilidad de numerosos sistemas de fusión genética, sigue siendo difícil la expresión recombinante de la proteína en *Escherichia coli*. El establecimiento del
 10 componente de fusión que mejore mejor la expresión de las proteínas difíciles de expresarse sigue siendo empírico. Los componentes de fusión comunes incluyen los términos C de la proteína de enlace de maltosa (MBP), S-transferasa de glutatona (GST), tiorredoxina (TRX), NUS A, ubiquitina (Ub), y
 15 las marcas del Modificador tipo Ubiquitina Pequeño (SUMO), cada uno de los cuales se describe en la literatura. Véase, por ejemplo, Marblestone (2006) *Prot. Sci.* 15: 182-7; Hunt (2005) *Protein Exp. & Purif* 40: 1-22; Hammarstrom y colaboradores (2002) *Protein Sci.* 11: 313-321.

20 Los componentes de fusión inmunogénicos incluyen proteína D de *Haemophilus influenza B* y la proteína no estructural del virus de influenza, NS1 (hemaglutinina). Otro componente de fusión inmunológico es la proteína conocida
 25 como LYTA. Se puede utilizar la porción C-terminal de la

molécula. LYTA se deriva a partir de *Streptococcus pneumoniae*, que sintetiza una amidasa de N-acetil-L-alanina, la amidasa LYTA, (codificada por el gen *lytA*, García y colaboradores (1986) *Gene* 43: 265-272). Es posible utilizar la
5 porción de repetición de la molécula Lyta que se encuentra en el extremo C-terminal empezando en el residuo 178, por ejemplo, los residuos 188-305. Otro componente de fusión adecuado es una proteína de ciclase de adenilato (CyaA) o de
10 un fragmento de la misma, en donde este fragmento de CyaA conserva la propiedad de la proteína de ciclase de adenilato mencionada de dirigirse a las células presentadoras de antígeno. Véase la Publicación Internacional Número WO2005089792.

15 En una modalidad de la invención, un polipéptido heterólogo es la Proteína D a partir de *Haemophilus influenzae* (Patente Europea Número EP 0 594 610 B1), o un fragmento de la misma. La Proteína D es una proteína de enlace de IgD a partir de *Haemophilus influenzae* (Publicación Internacional
20 Número WO 91/18926, Patente Europea Otorgada Número EP 0 594 610 B1). En algunas circunstancias, por ejemplo, en los sistemas de expresión de inmunógeno recombinantes puede ser deseable utilizar los fragmentos N-terminales de la Proteína D,
25 por ejemplo, que comprenden de aproximadamente 100 a

aproximadamente 110 aminoácidos N-terminales de la Proteína D (Patente Británica Número GB 9717953.5) (pD1/3, SEQ ID NO: 39).

La Proteína D de *H. influenzae* se sintetiza como un precursor con una secuencia de señal de 18 aminoácidos (SEQ ID NO: 41, véase también Número de Acceso AAA24998). Cuando la secuencia de señal se procesa durante la secreción, el residuo de cisteína en la posición 19 de la molécula precursora llega a ser el residuo amino-terminal.

En una modalidad, una secuencia de polipéptido heterólogo comprende aproximadamente la primera tercera parte de la molécula de Proteína D de *H. influenzae* procesada, o los 100-110 aminoácidos N-terminales de la Proteína D procesada. En una modalidad, la proteína heteróloga comprende los residuos de aminoácidos Met-Asp-Pro unidos a los 109 aminoácidos N-terminales de la Proteína D procesada. En otra modalidad, la proteína heteróloga comprende los residuos de aminoácidos Met-Asp-Pro unidos a los residuos de aminoácidos 2-109 de la Proteína D procesada (SEQ ID NO: 39).

En una modalidad, un polipéptido CASB7439 modificado o una construcción de proteína se acopla químicamente con la proteína CyaA o con un fragmento de la misma. Véase la

Publicación Internacional Número WO2005054851. En otra modalidad, un polipéptido CASB7439 modificado o una construcción de proteína se acopla químicamente con la subunidad B de la Toxina Shiga o con un equivalente
5 inmunológicamente funcional de la misma. Véase la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,613,882; y las Publicaciones Internacionales Números WO02060937 y WO2005112991.

10 ***Marcas de poli-histidina, aminoácidos no relacionados.***

Con frecuencia es conveniente incluir un polipéptido heterólogo que contenga secuencias secretoras o líderes, pro-secuencias, secuencias que ayuden a la purificación, tales como una marca de histidina, por ejemplo, una secuencia de poli-
15 histidina (comprendida de múltiples residuos de histidina), o una secuencia adicional para la estabilidad durante la producción recombinante.

Los vectores y kits de marcas de histidina están comercialmente disponibles. Por ejemplo, los vectores para
20 agregar una marca de seis histidinas a un polipéptido están disponibles en Roche. Los kits para la elaboración y utilización de los polipéptidos marcados con histidina están disponibles en Qiagen, Sigma, Thermo Scientific, GE Healthcare, y otros. La
25 marca de histidina también puede ser seguida por una

secuencia de aminoácidos adecuada que facilite la remoción de la secuencia de poli-histidina utilizando endopeptidasas. Se puede utilizar una exopeptidasa, por ejemplo, la TAGZima de Qiagen, para remover una secuencia de poli-histidina terminal
5 sin la secuencia adicional.

En algunas modalidades, la secuencia de poli-histidina se localiza en la región N-terminal de la construcción de la proteína. En las modalidades adicionales, la secuencia de poli-histidina se localiza en el término N de la construcción de la
10 proteína. En algunas modalidades, la secuencia de poli-histidina comprende 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o más histidinas consecutivas. En las modalidades adicionales, la secuencia de poli-histidina comprende diez histidinas consecutivas.

15 En algunas modalidades, el polipéptido heterólogo incluye una secuencia de poli-histidina y uno o más aminoácidos no relacionados. "Aminoácidos no relacionados" significa uno o más aminoácidos que no son una parte de la secuencia de poli-histidina, o de la proteína de fusión, y no son naturalmente una
20 parte de la secuencia del polipéptido CASB7439. Por ejemplo, los aminoácidos no relacionados pueden ser aquéllos incluidos para proporcionar un sitio de peptidasa, y pueden ser simplemente una secuencia extraña, tal como un artificio de
25 clonación, o similares.

MOLÉCULAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS QUE CODIFICAN LAS CONSTRUCCIONES CASB7439

Otras modalidades de esta divulgación se refieren a los ácidos nucleicos recombinantes que codifican los polipéptidos CASB7439 modificados y las construcciones de proteínas como se describen en la presente. En ciertas modalidades, los ácidos nucleicos recombinantes se optimizan en los codones para la expresión en una célula huésped procariótica o eucariótica seleccionada. Con el objeto de facilitar la réplica y la expresión, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector, tal como un vector de expresión procariótico o eucariótico. Las células huésped que incluyen los polipéptidos CASB7439 modificados recombinantes o los ácidos nucleicos que codifican la construcción de la proteína, también son una característica de esta divulgación. Las células huésped favorables incluyen las células huésped procarióticas (es decir, bacterianas), tales como *E. coli*, así como numerosas células huésped eucarióticas, incluyendo las células fúngicas (por ejemplo, de levadura), las células de insectos, y las células de mamíferos (tales como las células HEK293, CHO y VERO).

Vectores de Expresión

Con el objeto de facilitar la réplica y expresión, los ácidos nucleicos se pueden incorporar en un vector, tal como un vector

de expresión procariótico o eucariótico. Aunque los ácidos nucleicos que se dan a conocer en la presente se pueden incluir en cualquiera de una variedad de vectores (incluyendo, por ejemplo, los plásmidos bacterianos; ADN de fagos; baculovirus; los plásmidos de levadura; vectores derivados a partir de combinaciones de los plásmidos y los ADNs de fagos, ADN viral, tal como vacuna, adenovirus, virus de varicela de aves de corral, pseudo-rabia, adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus, y muchos otros), más comúnmente, el vector será un vector de expresión adecuado para generar productos de expresión de polipéptidos. En un vector de expresión, el ácido nucleico que codifica la construcción de proteína se arregla típicamente en proximidad y orientación a una secuencia de control de transcripción apropiada (promotor, y opcionalmente, uno o más potenciadores) para dirigir la síntesis del ARNm. Es decir, la secuencia de polinucleótido de interés se enlaza operablemente a una secuencia de control de transcripción apropiada. Los ejemplos de estos promotores incluyen: el promotor temprano inmediato de CMV, LTR, o el promotor de SV40, el promotor polihédrico de baculovirus, el promotor lac o trp de *E. coli*, el promotor de fago T7 y lambda PL, y otros promotores que se sepa que controlan la expresión de los genes en las células procarióticas o eucarióticas o sus virus. La vector

de expresión típicamente también contiene un sitio de enlace de ribosoma para el inicio de la traducción, y un terminador de transcripción. El vector opcionalmente incluye secuencias apropiadas para amplificar la expresión. En adición, los
5 vectores de expresión opcionalmente comprenden uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células huésped transformadas, tal como reductasa de dihidrofolato o resistencia
10 a la neomicina para el cultivo celular eucariótico, o tal como resistencia a la tetraciclina o a la ampicilina en *E. coli*.

Los procedimientos de ejemplo suficientes para guiar a un experto ordinario en este campo a través de la producción de los ácidos nucleicos recombinantes de CASB7439 se pueden
15 encontrar en Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Press, 2001;
20 Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, 1992 (y los Suplementos hasta 2003); y Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 4ª Edición, Wiley & Sons, 1999.

25 Las moléculas de ácidos nucleicos de ejemplo que

codifican las construcciones de las proteínas están representadas por las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO: 12. Las variantes de secuencia adicionales que comparten identidad de
5 secuencia con las moléculas de ácidos nucleicos de ejemplo pueden ser producidas por los expertos en este campo. Típicamente, las variantes de ácidos nucleicos codificarán polipéptidos que difieran por no más del 1 por ciento, o del 2
10 por ciento, o del 5 por ciento, o del 10 por ciento, o del 15 por ciento, o del 20 por ciento de los residuos de aminoácidos. Es decir, los polipéptidos codificados comparten cuando menos el 80 por ciento, o el 85 por ciento, más comúnmente cuando menos aproximadamente el 90 por ciento o más, tal como el 95
15 por ciento, el 98 por ciento, el 99 por ciento, o el 99.5 por ciento de identidad de secuencia. Será inmediatamente entendido por los expertos en este campo, que las secuencias de polinucleótidos que codifican las construcciones de proteínas
20 can por sí mismas compartir menos identidad de secuencia debido a la redundancia del código genético. En algunas instancias, el polipéptido CASB7439 modificado o la construcción de la proteína tiene una o más modificaciones de aminoácidos en relación con la secuencia de aminoácidos de las
25 construcciones de ejemplo estipuladas en la presente (por

ejemplo, en adición a las modificaciones anteriormente mencionadas). Estas diferencias pueden ser una adición, supresión o sustitución de uno o más nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Una variante típicamente difiere por no más de aproximadamente el 1 por ciento, o el 2 por ciento, o el 5 por ciento, o el 10 por ciento, o el 15 por ciento, o el 20 por ciento, o el 25 por ciento ó el 30 por ciento de los residuos de nucleótidos. Por ejemplo, un polipéptido CASB7439 variante o una construcción de proteína que codifique el ácido nucleico, puede incluir 1 ó 2, ó hasta 5, o hasta aproximadamente 10, o hasta aproximadamente 15, o hasta aproximadamente 50, o hasta aproximadamente 100 diferencias de nucleótidos, comparándose con el polipéptido CASB7439 de ejemplo o la construcción de proteína que codifica los ácidos nucleicos de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO: 12. Por consiguiente, una variante en el contexto de un polipéptido CASB7439 o de una construcción de proteína que codifica el ácido nucleico, típicamente comparte cuando menos el 70 por ciento, o el 75 por ciento, o el 80 por ciento, o el 85 por ciento, o el 90 por ciento, o el 95 por ciento, o el 98 por ciento, o el 99 por ciento, o el 99.5 por ciento de identidad de secuencia con una secuencia de referencia, por ejemplo, las secuencias de

referencia ilustradas por las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO: 12, o cualquiera de los otros polipéptidos CASB7439 de ejemplo o las construcciones de proteína que codifican los ácidos nucleicos que se dan a conocer en la presente. Se pueden presentar variantes adicionales a través del arrastre genético, o se pueden producir artificialmente utilizando la mutagénesis dirigida al sitio o aleatoria, o mediante la recombinación de dos o más variantes previamente existentes. Estas variantes adicionales también son adecuadas en el contexto del polipéptido CASB7439 o de las construcciones de proteínas que se dan a conocer en la presente.

En adición a los ácidos nucleicos variantes anteriormente descritos, también se pueden utilizar los ácidos nucleicos que se hibridan a uno o más de los ácidos nucleicos de ejemplo representados por las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO: 12, para codificar los polipéptidos CASB7439 o las construcciones de proteínas que se dan a conocer en la presente. Un experto en la materia apreciará que, en adición a la medida del porcentaje (por ciento) de identidad de secuencia discutida en la presente, otra indicación de la similitud de secuencias entre dos ácidos nucleicos es la capacidad para hibridarse. Mientras más

similares sean las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más restrictivas serán las condiciones en las que se hibridarán. La restrictividad de las condiciones de hibridación depende de la secuencia y es diferente bajo diferentes parámetros ambientales. Por consiguiente, las condiciones de hibridación que den como resultado grados particulares de restrictividad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación que se elija, y de la composición y longitud de las secuencias de ácidos nucleicos que se hibriden. En términos generales, la temperatura de la hibridación y la concentración iónica (en especial la concentración de Na^+ y/o Mg^{++}) del regulador de hibridación determinarán la restrictividad de hibridación, aunque los tiempos de lavado también tienen influencia sobre la restrictividad. En términos generales, las condiciones restrictivas se seleccionan para ser de aproximadamente 5°C a 20°C más bajas que el punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica en una concentración iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una concentración iónica y un pH definidos) a la cual se hibrida el 50 por ciento de la secuencia objetivo a una sonda perfectamente emparejada. Las condiciones para la hibridación de ácidos nucleicos y el cálculo de las restrictividades se pueden encontrar, por ejemplo, en Sambrook y colaboradores,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, *Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I: Theory and Nucleic Acid Preparation*, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993, y Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Para los propósitos de la presente divulgación, "condiciones restringentes" abarcan las condiciones bajo las cuales se presentará la hibridación solamente si hay menos del 25 por ciento de mal emparejamiento entre la molécula de hibridación y la secuencia objetivo. Las "condiciones restringentes" se pueden descomponer en niveles particulares de restringencia para una definición más precisa. Por consiguiente, como se utiliza en la presente, condiciones de "restringencia moderada" son aquéllas bajo las cuales no se hibridarán las moléculas con más del 25 por ciento de mal emparejamiento de secuencias; condiciones de "restringencia media" son aquéllas bajo las cuales no se hibridarán las moléculas con más del 15 por ciento de mal emparejamiento, y condiciones de "alta restringencia" son aquéllas bajo las cuales no se hibridarán las secuencias con más del 10 por ciento de mal emparejamiento. Las condiciones de "muy alta

restringencia" son aquéllas bajo las cuales no se hibridarán las secuencias con más del 6 por ciento de mal emparejamiento. En contraste, los ácidos nucleicos que se hibridan bajo "condiciones de baja restringencia" incluyen aquéllos con mucho menos identidad de secuencia, o con identidad de secuencia solamente sobre subsecuencias cortas del ácido nucleico. Por consiguiente, se entenderá que las diferentes variantes de ácidos nucleicos que están abarcadas por esta divulgación son capaces de hibridarse bajo condiciones restringentes a cuando menos una de las SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, y SEQ ID NO: 12, sobre sustancialmente toda su longitud.

PRODUCCIÓN DE CONSTRUCCIONES DE PROTEÍNAS

Las construcciones de proteínas que se dan a conocer en la presente, se pueden producir empleando los procedimientos bien establecidos para la expresión y la purificación de proteínas recombinantes. Los procedimientos suficientes para guiar a un experto en la materia se pueden encontrar en las siguientes referencias: Sambrook y colaboradores, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 200; y Ausubel y colaboradores, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª Edición, John Wiley & Sons, Inc., 1999. S proporcionan detalles adicionales y

específicos más adelante en la presente.

Los ácidos nucleicos recombinantes que codifican las construcciones de proteínas se pueden introducir en las células huésped mediante cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos, tales como electroporación, transfección mediada por liposomas (por ejemplo, utilizando un reactivo de transfección liposomal comercialmente disponible, tal como LIPOFECTAMINE^{MR}2000 ó TRANSFECTIN^{MR}), precipitación en fosfato de calcio, infección, transfección, y similares, dependiendo de la selección de vectores y de las células huésped.

Las células huésped se pueden cultivar en un medio nutriente convencional modificado como sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar las secuencias de polinucleótidos insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son típicamente aquéllas anteriormente utilizadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para los expertos en este campo, y en las referencias citadas en la presente, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, Tercera Edición, Wiley-Liss, Nueva York, y las referencias citadas en el mismo. En algunas modalidades, una temperatura de cultivo adecuada

es de 16°C; en otras es de 37°C. Los productos de expresión correspondientes a los ácidos nucleicos de la invención también se pueden producir en células no animales, tales como plantas, levadura, hongos, bacterias, y similares. En adición a
 5 Sambrook, Berger y Ausubel, los detalles con respecto al cultivo celular se pueden encontrar en Payne y colaboradores (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, NY; Gamborg y Phillips (Editores)
 10 (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*; Fundamental Methods, Springer Lab Manual, Springer-Verlag. (Berlín Heidelberg Nueva York), y Atlas y Parks (Editores) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL.

15 **Células Huésped**

Las células huésped que incluyen los ácidos nucleicos recombinantes que codifican la construcción de la proteína, por consiguiente, también son una característica de esta divulgación. Las células huésped favorables incluyen las células
 20 huésped procarióticas (es decir, bacterianas), tales como *E. coli*, así como numerosas células huésped eucarióticas, incluyendo la células fúngicas (por ejemplo, levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae* y *Picchia pastoris*), las células de
 25 insectos, las células de plantas, y las células de mamíferos

(tales como células CHO). Los ácidos nucleicos de construcción de proteínas recombinantes se introducen (por ejemplo, se transducen, se transforman, o se transfectan) en las células huésped, por ejemplo, por medio de un vector, tal como un vector de expresión. Como se describe en la presente, el vector es más típicamente un plásmido, pero estos vectores también pueden ser, por ejemplo, una partícula viral, un fago, etc. Los ejemplos de los huéspedes de expresión apropiados incluyen: las células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; las células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; las células de insectos, tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; las células de mamíferos, tales como 3T3, COS, CHO, BHK, HEK293 o melanoma de Bowes; las células de plantas, incluyendo las células de algas, etc.

Una célula huésped se selecciona opcionalmente por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. Estas modificaciones de la proteína incluyen, pero no se limitan a, glicosilación, (así como, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, lipidación y acilación). El procesamiento posterior a la traducción, por ejemplo, que disocia una forma precursora en una forma madura de la

proteína (por ejemplo, mediante una proteasa de furina) se lleva a cabo opcionalmente en el contexto de la célula huésped. Diferentes células huésped, tales como 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, HEK293, WI38, etc. tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para las actividades posteriores a la traducción, y se pueden seleccionar para asegurar la modificación y el procesamiento correcto de la proteína extraña introducida.

Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de las construcciones de proteínas recombinantes que se dan a conocer en la presente, típicamente se utilizan sistemas de expresión estables. Por ejemplo, se introducen moléculas de ácidos nucleicos que expresen establemente una construcción de proteína en la célula huésped, utilizando vectores de expresión que contengan orígenes de réplica virales o elementos de expresión endógenos y un gen marcador seleccionable. En seguida de la introducción del vector, se permite a las células crecer durante 1 a 2 días en un medio enriquecido antes de cambiarse al medio selectivo. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y la recuperación de las células que expresen con éxito las secuencias introducidas. Por ejemplo, los grupos o colonias de

células establemente transformadas resistentes se pueden hacer proliferar empleando las técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Las células huésped transformadas con un ácido nucleico que codifique una construcción de proteína, se cultivan opcionalmente bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo celular.

Las construcciones de proteínas expresadas se pueden recuperar y purificar a partir de cultivos celulares recombinantes mediante cualquiera de un número de métodos bien conocidos en la materia, incluyendo precipitación en sulfato de amonio o en etanol, extracción de ácido, filtración, ultrafiltración, centrifugación, cromatografía de intercambio de aniones o de cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando cualquiera de los sistemas de marcado mencionados en la presente), cromatografía de hidroxilapatita, y cromatografía de lectina. Se pueden emplear pasos de repliegue de proteína, como sea deseado, para realizar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) en los pasos finales de purificación. En adición a las referencias mencionadas en la presente, una variedad de métodos de

purificación son bien conocidos en la materia, incluyendo, por ejemplo, aquéllos estipulados en Sandana (1997) *Bioseparation of Proteins*, Academic Press, Inc.; y Bollag y colaboradores (1996) *Protein Methods*, Segunda Edición, Wiley-Liss, NY; Walker (1996), *Protein Protocols Handbook*, Humana Press, NJ, Harris y Angal (1990) *Protein Purification Applications: A Practical Approach*, IRL Press en Oxford, Oxford, Reino Unido; Scopes (1993), *Protein Purification: Principles and Practice*, 3ª Edición, Springer Verlag, NY; Janson y Ryden (1998), *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications*, Segunda Edición, Wiley-VCH, NY; y Walker (1998), *Protein Protocols on CD-ROM*, Humana Press, NJ.

En ciertos ejemplos, los ácidos nucleicos se introducen en las células por medio de vectores adecuados para la introducción y expresión en células procarióticas, por ejemplo, células de *E. coli*. Por ejemplo, un ácido nucleico que incluye una secuencia de polinucleótido que codifica una construcción de proteína se puede introducir en cualquiera de una variedad de vectores comercialmente disponibles y registrados, tales como la serie de vectores de expresión pET (por ejemplo, pET9b y pET2d). La expresión de la secuencia de codificación es inducible mediante la β -D-1-tiogalactopiranosida de isopropilo (IPTG), que da como resultado altos niveles de

expresión de la proteína. La secuencia de polinucleótido que codifica la construcción de la proteína CASB7439 se transcribe bajo el promotor de fago T7. También son adecuados los vectores alternativos, tales como pURV22, que incluye un
5 promotor lambda-pL inducible por calor.

El vector de expresión se introduce (por ejemplo, mediante electroporación) en un huésped bacteriano adecuado. Hay numerosas cepas de *E. coli* disponibles, y pueden ser
10 seleccionadas por un experto en la materia (por ejemplo, las cepas BLR DE3, BL21 DE3 y Rosetta DE3 han probado ser favorables para la expresión de los vectores recombinantes que contienen las secuencias de polinucleótidos que codifican las construcciones de proteínas).

Opcionalmente, los polinucleótidos que codifican las construcciones de proteínas se incorporan en vectores de expresión que son adecuados para la introducción y expresión en células eucarióticas (por ejemplo, células de insectos o de
15 mamíferos). Favorablemente, los ácidos nucleicos se optimizan en los codones para la expresión en el vector/la célula huésped seleccionada. Las células seleccionadas se pueden expandir clonalmente y se pueden caracterizar para la expresión de la construcción de proteína deseada. Las técnicas para la
20 optimización de codones son conocidas en la materia. En
25

adición, los proveedores de servicios de biología molecular comerciales ofrecen optimización de codones, entre otros servicios técnicos de rutina.

Procarióticos

5 En los sistemas bacterianos, se pueden seleccionar un número de vectores de expresión, dependiendo del uso pretendido para el producto expresado. Por ejemplo, cuando se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o de fragmentos
10 del mismo para la producción de anticuerpos, favorablemente se emplean vectores que dirijan un alto nivel de expresión de proteínas de fusión que se purifiquen fácilmente. Estos vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores de clonación y expresión en *E. coli* multi-funcionales, tales como BLUESCRIPT
15 (Stratagene), en donde la secuencia de codificación de interés, por ejemplo, un polinucleótido de la invención como se describe en la presente, se puede ligar en el vector dentro del marco, con secuencias para la Metionina iniciadora de traducción amino-terminal y los siguientes 7 residuos de beta-galactosidasa, produciendo una proteína de fusión de beta-galactosidasa catalíticamente activa; los vectores pIN (Van
20 Heeke y Schuster (1989) *J Biol Chem* 264: 5503-5509); los vectores pET (Novagen, Madison WI), en donde la metionina amino-terminal se liga dentro del marco con una marca de
25

histidina; y similares. En algunas modalidades, un vector adecuado es el pET19; en otras, el pET24; en otras, el pET26.

Eucarióticos

De una manera similar, en levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, se pueden utilizar un número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como factor alfa, oxidasa de alcohol, y PGH, para la producción de los productos de expresión deseados. Para las reseñas, véase Berger, Ausubel, y, por ejemplo, Grant y colaboradores (1987; *Methods in Enzymology* 153: 516-544). En las células huésped de mamífero, se pueden utilizar un número de sistemas de expresión, incluyendo tanto los plásmidos como los sistemas basados en virus.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

Vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables

Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y pueden ser seleccionados por los expertos en este campo. Por ejemplo, el vehículo o excipiente puede incluir favorablemente un regulador. Opcionalmente, el vehículo o excipiente también contiene cuando menos un componente que estabiliza la solubilidad y/o estabilidad. Los ejemplos de los agentes de solubilización/estabilización incluyen detergentes, por ejemplo, lauril-sarcosina y/o Tween. Los agentes de

solubilización/estabilización alternativos incluyen arginina, y polioles formadores de vidrio (tales como sacarosa, trehalosa, y similares). Se conocen en la técnica numerosos vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5ª Edición (1975).

De conformidad con lo anterior, los excipientes y vehículos adecuados pueden ser seleccionados por los expertos en este campo para producir una formulación adecuada para suministrarse a un sujeto por una vía de administración seleccionada.

Los excipientes adecuados incluyen, sin limitación: glicerol, polietilenglicol (PEG), sorbitol, trehalosa, sal sódica de N-lauroil-sarcosina, L-prolina, sulfobetaina no detergente, clorhidrato de guanidina, urea, óxido de trimetil-amina, KCl, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y otras sales relacionadas con cationes divalentes, ditioeritritol, ditioeritrol, y β -mercapto-etanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (incluyendo: Tween80, Tween20, Triton X-00, NP-40, Empigen BB, octil-glucósido, lauroil-maltosida, Zwittergente 3-08, Zwittergente 3-0, Zwittergente 3-2, Zwittergente 3-4, Zwittergente 3-6, CHAPS, desoxicolato de sodio, dodecil-sulfato de sodio, bromuro de

cetil-trimetil-amonio).

Adyuvantes

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas también incluyen un adyuvante. En el contexto de una composición
5 inmunogénica adecuada para su administración a un sujeto, tal como a un sujeto humano, para el propósito de provocar una respuesta inmunitaria contra el CASB7439, el adyuvante se selecciona para provocar una respuesta inmunitaria basada en
10 Th1. El adyuvante típicamente se selecciona para potenciar una respuesta inmunitaria basada en Th1 en el sujeto, o en la población de sujetos, a quienes se administre la composición.

Respuesta Inmunitaria de Th1

Una respuesta inmunitaria de tipo "Th1" se caracteriza por
15 la inducción de células auxiliares T CD4+ que producen IL-2 e IFN- γ . En contraste, una respuesta inmunitaria de tipo "Th2" se caracteriza por la inducción de células auxiliares CD4+ que producen IL-4, IL-5, e IL-13.

Afectadores de TLR, incluyendo, sin limitación, 3D-MPL

20 Un adyuvante adecuado para utilizarse en combinación con los polipéptidos CASB7439 modificados es un modulador de TLR-4. Un ejemplo es un derivado no tóxico del lípido A, tal como monofosforilo-lípido A o más particularmente
25 monofosforilo-lípido A 3-desacilado (3D-MPL). El 3D-MPL se

vende bajo el nombre de MPL en GlaxoSmithKline Biologicals S.A., y es referido a través de todo el documento como MPL ó 3D-MPL. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,436,727; 4,877,611; 5 4,866,034 y 4,912,094. El 3D-MPL promueve primordialmente las respuestas de células-T CD4+ con un fenotipo de IFN- γ (Th1). El 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los métodos que se dan a conocer en la Patente Británica Número 10 GB2220211 A. Químicamente, es una mezcla de monofosforilolípido A 3-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención se puede utilizar el 3D-MPL de partículas pequeñas. El 3D-MPL de partículas pequeñas tiene un tamaño de partículas tal que se puede filtrar para 15 esterilizarse a través de un filtro de 0.22 micras. Estas preparaciones se describen en la Publicación Internacional Número WO94/21292.

En otras modalidades, el lipopolisacárido puede ser un 20 disacárido de β (1-6)-glucosamina, como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,005,099 y en la Patente Europea Número EP 0 729 473 B1. Un experto en la materia sería fácilmente capaz de producir diferentes lipopolisacáridos, tales como 3D-MPL, basándose en 25 las enseñanzas de estas referencias. En adición a los

inmunoestimulantes anteriormente mencionados (que son
 similares en estructura a aquél de LPS o MPL ó 3D-MPL), los
 derivados de monosacáridos y disacáridos acilados que son una
 sub-porción para la estructura de MPL de la presente, también
 5 son adyuvantes adecuados. En otras modalidades, el adyuvante
 es un derivado sintético del lípido A, algunos de los cuales se
 describen como agonistas de TLR-4, e incluyen, pero no se
 limitan a: OM174 (difosfato ácido de 2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-
 10 [(R)-3-dodecanoiloxi-tetra-decanoil-amino]-4-o-fosfono- β -D-
 glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]- α -D-
 glucopiranosilo), (Publicación Internacional Número WO
 95/14026); OM 294 DP (1,10-bis-(difosfato ácido) de (3S,9R)-3-
 -[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-
 15 3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decan-1,10-diol) (Publicaciones
 Internacionales Números WO 99/64301 y WO 00/0462); y OM
 197 MP-Ac DP 10-(6-amino-hexanoato) de 1-difosfato ácido de
 (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-
 9-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decano-1,10-diol,
 20 (Publicación Internacional Número WO 01/46127).

Otros ligandos de TLR-4 que se pueden utilizar son los
 fosfatos de alquil-glucosamidina (AGPs), tales como aquéllos
 que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número
 25 WO 98/50399 o en la Patente de los Estados Unidos de

Norteamérica Número 6,303,347 (también se dan a conocer los procesos para la preparación de los fosfatos de alquil-glucosamidina (AGPs)), de una manera adecuada RC527 o RC529, o las sales farmacéuticamente aceptables de los fosfatos de alquil-glucosamidina (AGPs), como se dan a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,764,840. Algunos fosfatos de alquil-glucosamidina (AGPs) son los agonistas de TLR-4, y algunos son los antagonistas de TLR-4. Se piensa que ambos son útiles como adyuvantes.

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de provocar una respuesta de señalización a través del TLR-4 (Sabroe y colaboradores, JI 2003 p1630-5) son, por ejemplo, los lipopolisacáridos a partir de las bacterias gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de los lipopolisacáridos (LPS) (tales como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque por calor (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; tensoactivo de Proteína A, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno, b-defensina-2, y dipéptido de muramilo (MDP). En una modalidad, el agonista de TLR es HSP 60, 70 ó 90. Otros ligandos de TLR-4 adecuados son como se describen en la Publicación Internacional Número WO 2003/011223 y en la

Publicación Internacional Número WO 2003/099195, tales como el compuesto I, el compuesto II y el compuesto III que se dan a conocer en las páginas 4-5 de la Publicación Internacional Número WO2003/011223, o en las páginas 3-4 de la Publicación Internacional Número WO2003/099195, y en particular los compuestos que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, y ER804764. Por ejemplo, un ligando de TLR-4 adecuado es el ER804057.

Adyuvantes de Saponina

Otros adyuvantes que se pueden utilizar en las composiciones inmunogénicas con CASB7439, por ejemplo, por sí mismos o en combinación con el 3D-MPL, u otro adyuvante descrito en la presente, son las saponinas, tales como QS21.

Las saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine, Volumen 2, páginas 363-386). Las saponinas son glicósidos de esteroides o de triterpeno ampliamente distribuidos en el reino vegetal y en el reino animal marino. Se observa que las saponinas forman soluciones coloidales en agua que hacen espuma al agitarse, y para precipitar el colesterol. Cuando las

saponinas están cerca de las membranas celulares, crean estructuras de tipo poroso en la membrana, que hacen que explote la membrana. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, la cual es una propiedad de ciertas saponinas, pero no de todas.

Las saponinas, en particular las fracciones de saponina inmunológicamente activas, son conocidas como adyuvantes en las vacunas para administración sistémica. El adyuvante y la actividad hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado extensamente en la materia (Lacaille-Dubois y Wagner, *supra*). Por ejemplo, Quil A (derivado a partir de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina), y las fracciones del mismo, se describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,057,540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y en la Patente Europea Número EP 0 362 279 B1. Las estructuras en partículas, denominadas como Complejos Inmunoestimulantes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A, son hemolíticas y se han utilizado en la elaboración de vacunas (Morein, B., Patente Europea Número EP 0 109 942 B1; y Publicaciones Internacionales Números WO 96/11711 y WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (las fracciones purificadas mediante HPLC de Quil A) se

han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el método de su producción se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos Número 5,057,540 y en la Patente Europea Número EP 0 362 279 B1. Otras saponinas que se han utilizado en los estudios sistémicos de vacunación incluyen aquéllas derivadas a partir de otras especies de plantas, tales como Gipsofila y Saponaria (Bomford y colaboradores, Vaccinia, 10(9): 572-577, 1992).

Se ha demostrado que estas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son adyuvantes estimulantes de Th1 de éxito cuando se formulan junto con un antígeno. Por consiguiente, por ejemplo, el CASB7439 se puede emplear favorablemente en las composiciones inmunogénicas con un adyuvante que comprenda una combinación de QS21 y colesterol.

Ácidos oligonucleicos inmunoestimulantes

Un adyuvante adecuado para utilizarse en combinación con CASB7439 es un agonista de TLR de ADN bacteriano capaz de provocar una respuesta de señalización a través del TLR-9, es decir, un agonista de TLR-9, más específicamente ADN que contiene nucleótidos CpG no metilados, en particular los contextos de secuencia conocidos como motivos CpG. Los oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta

predominantemente de Th1. Estos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Números WO 96/02555 y WO 99/33488, y en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5 6,008,200 y 5,856,462. De una manera adecuada, los nucleótidos CpG son oligonucleótidos de CpG. Los oligonucleótidos adecuados para utilizarse en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos 10 que contienen CpG, que opcionalmente contienen dos o más motivos de dinucleótidos CpG separados por cuando menos tres, de una manera adecuada por cuando menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de citosina seguido por un nucleótido de guanina. Los oligonucleótidos de 15 CpG de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una modalidad específica, el internucleótido en el oligonucleótido es un enlace de fosforoditioato, o de una manera adecuada, un enlace de fosforotioato, aunque los enlaces de fosfodiéster y otros enlaces 20 internucleótidos están dentro del alcance de la invención. En algunas modalidades están los oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mixtos. Los métodos para producir los oligonucleótidos de fosforotioato o de fosforoditioato se 25 describen en las Patentes de los Estados Unidos de

Norteamérica Números 5,666,153 y 5,278,302 y en la
Publicación Internacional Número WO 95/26204.

En una modalidad, alternativa, se utiliza un agonista de
TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a
5 través de TLR-9. En una modalidad, el agonista de TLR capaz
de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es
HSP90. Las combinaciones de diferentes adyuvantes, tales
como aquéllos mencionados en la presente, también se pueden
10 utilizar en las composiciones con CASB7439. Por ejemplo, como
ya se mencionó, QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La
proporción de QS21 : 3D-MPL típicamente será del orden de 1 :
10 a 10 : 1; tal como de 1:5 a 5 : 1, y con frecuencia
sustancialmente de 1 : 1. Típicamente, la proporción está en el
15 intervalo de 2.5 : 1 a 1 : 1 de 3D-MPL: QS21. Otro adyuvante de
combinación es 3DMPL más QS21 en una formulación
liposomal, también en combinación con CpG.

Sujetos con Cáncer Colo-Rectal

20 La selección de un sujeto con cáncer colo-rectal para su
participación en los métodos descritos en la presente, puede ser
mediante un diagnóstico clínico, un diagnóstico molecular, o
una combinación de los mismos. En algunas modalidades, se
prueba un sujeto para determinar si sus células cancerosas
25 expresan el CASB7439 (HASH2). Los métodos clínicos para

diagnosticar cáncer colo-rectal son conocidos en la materia. Las técnicas y los métodos moleculares para determinar si una célula o tejido canceroso expresa el CASB7439 (HASH2), se dan a conocer en la Publicación Internacional Número
5 WO01/62778.

EJEMPLOS EXPERIMENTALES

Ejemplo 1

Se generaron dos moléculas de ácidos nucleicos que
10 codifican las construcciones de proteínas que comprenden un polipéptido CASB7439 en el vector pET19b. Una marca His se yuxtapuso en el extremo N-terminal de la secuencia de CASB7439. Estos clones se denominaron como LVL007 [SEQ ID NO: 15 (aa); SEQ ID NO: 16 (ADN)] y LVL010 [SEQ ID NO: 17
15 (aa); SEQ ID NO: 18 (ADN)], respectivamente). Se observó que se había presentado una mutación no intencional en el clon LVL007, lo cual dio como resultado una sustitución de un amino de la prolina hasta leucina (en el residuo de aminoácido 17 con referencia a la SEQ ID NO: 13). Las moléculas de ácidos
20 nucleicos se utilizaron con tres tipos de células huésped diferentes, es decir, las cepas de *E. coli* BLR DE3, BL21 DE3, y Rosetta DE3. Las inducciones se llevaron a cabo a dos temperaturas por inducción (16°C ó 37°C), y con 1 mM de IPTG.
25 Véase la sección de Materiales y Métodos, más adelante, para

ver los detalles del protocolo.

Se cosecharon las proteínas para cada inducción, y se analizaron mediante Western blot y mediante SDS-PAGE con teñido con azul Coomassie. En estos experimentos, la detección
5 de la proteína fue visible solamente en el Western blot.

Ejemplo 2

Se llevaron a cabo análisis bioinformáticos del gen de CASB7439, revelando las siguientes características
10 estructurales:

- un elemento estructural de ARN de horquilla localizado entre los nucleótidos 2 y 27 de la SEQ ID NO: 14;
- contenido de GC del 62 por ciento de la secuencia de nucleótidos;
- 15 ▪ secuencia de nucleótidos rica en codones de arginina (26/193 aminoácidos codificados);
- secuencia de aminoácidos con un alto nivel de residuos de aminoácidos básicos;
- 20 ▪ secuencia de aminoácidos con un alto punto isoeléctrico (11.18);
- una región de baja complejidad dentro de la secuencia de aminoácidos (residuos 7-27 de la SEQ ID NO: 13);
- dominio de hélice-ciclo-hélice (HLH) (IPR000014)
- 25 dentro de la secuencia de aminoácidos (residuos 56-108 de la

SEQ ID NO: 13);

- una primera región de trastorno intrínseco dentro de la secuencia de aminoácidos (residuos 118-164 de la SEQ ID NO: 13);

5 ▪ una segunda región de trastorno intrínseco dentro de la secuencia de aminoácidos (residuos 118-164 de la SEQ ID NO: 13).

10 Los Solicitantes también identificaron una región con una alta periodicidad de prolina desde el aminoácido 127 hasta el 158. Los Solicitantes designaron la región desde el aminoácido 133 hasta el 153, inclusive, de la SEQ ID NO: 13 (aa), la región rica en prolina. La región rica en prolina, junto con algunas de las otras características mencionadas en este ejemplo se
15 ilustran en una forma esquemática en la Figura 1/35, junto con las regiones mencionadas en cualquier otra parte en la presente.

Ejemplo 3

20 La secuencia de nucleótidos del ADN del CASB7439 no modificada (SEQ ID NO: 14) fue optimizada en los codones por el proveedor de servicios de síntesis de ADN comercial, Geneart (identificador único 0606597), y se clonó. Geneart AG, BioPark, Josef-Engert-Str. 11D-93053 Regensburg, Alemania. La
25 secuencia de nucleótidos del CASB7439 se obtuvo a partir del

clon mediante amplificación con reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se utilizó para generar dos construcciones. En la primera construcción, LVL016 [SEQ ID NO: 29 (aa), SEQ ID NO: 30 (ADN)], la secuencia de CASB7439 se insertó en el
5 vector pET21b (+) en fusión con la proteína pD1/3 (a partir de *Haemophilus influenzae*) en el extremo N-terminal de la secuencia de CASB7439. En la segunda construcción, LVL018 [SEQ ID NO: 31 (aa); SEQ ID NO: 32 (ADN)], el CASB7439 se
10 insertó en el vector pET21b (+) (sin componente alguno de Proteína D). Estas construcciones se evaluaron para la producción en el BLR DE3 de *E. coli* a 16°C y 37°C con 1 mM de IPTG. La producción fue detectable mediante Western blot como una proteína insoluble, principalmente producida a 16°C.

15 Se seleccionaron cuatro de los dominios CASB7439 para una investigación adicional con el fin de mejorar la producción de proteína: el dominio de dirección al núcleo, la región rica en prolina, el dominio de enlace de ADN, y el dominio HLH.

20 Ejemplo 4

Se seleccionaron el dominio de dirección al núcleo, el dominio de enlace de ADN, el dominio bHLH y la región rica en prolina del CASB7439, para investigar la producción de proteína a partir de las construcciones que comprenden las secuencias
25 de nucleótidos que codifican los polipéptidos CASB7439.

Diferentes secciones de la secuencia de nucleótidos del CASB7439 se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del clon Geneart de codones optimizados descrito en la presente, y se insertaron en el vector pET19b (+), que da como resultado cinco construcciones que tienen una secuencia diferente del CASB7439 (truncada en alguna forma o completa); cada construcción con una cola de poli-histidina en el extremo N-terminal de la secuencia de CASB7439. Véase la Figura 2/35.

Las construcciones mostradas en la Figura 2/35 se evaluaron para determinar la expresión de la proteína en la cepa de *E.coli* BLR DE3 a 37°C y a 16°C con 1 mM de IPTG. Como se ilustra en la Figura 2/35, estas construcciones comprendieron el CASB7439 de longitud completa [LVL060, SEQ ID NO: 19 (aa), SEQ ID NO: 20 (ADN)]; el CASB7439 truncado para remover el dominio de dirección al núcleo [Const-1, SEQ ID NO: 21 (aa), SEQ ID NO: 22 (ADN)]; el CASB7439 truncado para remover la región rica en prolina [LVL055, SEQ ID NO: 1 (aa), SEQ ID NO: 2 (ADN)]; el CASB7439 truncado para remover el dominio de enlace de ADN [LVL056, SEQ ID NO: 23 (aa), SEQ ID NO: 24 (ADN)]; el CASB7439 truncado para dejar el dominio básico de hélice-ciclo-hélice (bHLH) [LVL057, SEQ ID NO: 25 (aa), SEQ ID NO: 26 (ADN)]. Debido al

error experimental, Const-1 careció de un codón de paro, lo cual dio como resultado la traducción de una porción de la secuencia de nucleótidos del vector (dando como resultado con 21 aminoácidos adicionales en la región C-terminal, empezando con LED...). La producción de LVL055 en seguida de la incubación a 16°C (C-terminal truncado) fue claramente detectable en un gel de SDS-PAGE teñido con azul Coomassie.

Ejemplo 5

Basándose en los resultados descritos en el Ejemplo 4, las nuevas construcciones se diseñaron para: (i) remover la región rica en prolina, mientras que (ii) se conservan otras regiones de la porción C-terminal del polipéptido. Véase la descripción de las Figuras 3/35 y 4/35, las cuales discuten (i) diferentes epítopos identificados o predichos dentro del polipéptido, y (ii) diferentes planteamientos alternativos para la remoción de la región rica en prolina.

Entonces se ordenó una secuencia genética de ácido nucleico sintética con los codones optimizados que codificaba para un polipéptido CASB7439 modificado en Geneart (identificador único 0706840), digerido e insertado en paralelo en dos vectores diferentes para generar las siguientes construcciones:

(i) LVL088, el cual comprende el gen de CASB7439 con

la región de 21 aminoácidos rica en prolina suprimida, fusionada con una cola de poli-histidina en el término C del vector pET26b (+) (SEQ ID NO: 27 (aa), SEQ ID NO: 28 (ADN)), y

5 (ii) LVL111, el cual comprende el gen de CASB7439 con la región de 21 aminoácidos rica en prolina suprimida, y una cola de poli-histidina tanto N-terminal como C-terminal en el vector pET19b (+) (SEQ ID NO: 3 (aa), SEQ ID NO: 4 (ADN)).

10 La construcción del LVL111 (véase la SEQ ID NO: 3) se clonó siguiendo la misma estrategia utilizada para el LVL055, es decir, utilizando el vector pET19 (+) que incluye una cola de poli-histidina compuesta de 10 histidinas seguidas por el sitio de enterocinasa. Esto dio como resultado en un componente de fusión de 23 aminoácidos (SEQ ID NO: 42) en el término-N.

15 Otras construcciones se generaron con el gen sintético de codones optimizados discutido en el Ejemplo 3 (identificador único 0606597), incluyendo los siguientes:

20 ▪ LVL090 (una construcción de proteína que comprende (desde el término N) Proteína D, CASB7439 optimizado de longitud completa, y una 6-His en el vector pET21) (SEQ ID NO: 43 (aa); SEQ ID NO: 44 (ADN));

25 ▪ LVL112 (una construcción de proteína que comprende (desde el término N) Proteína SUMO, CASB7439 optimizado de longitud completa en un vector pSUMO) (SEQ ID

NO: 45 (aa); SEQ ID NO: 46 (ADN));

5 ▪ LVL113 (una construcción de proteína que comprende (desde el término N) Proteína SUMO, proteína pD1/3, CASB7439 optimizado de longitud completa en un vector pSUMO) (SEQ ID NO: 47 (aa); SEQ ID NO: 48 (ADN));

10 ▪ LVL114 (una construcción de proteína que comprende (desde el término N) Proteína SUMO, CASB7439 truncado en el aminoácido 117 en un vector pSUMO) (SEQ ID NO: 49 (aa); SEQ ID NO: 50 (ADN));

15 ▪ LVL115 (una construcción de proteína que comprende (desde el término N) Proteína SUMO, CASB7439 modificado con la región rica en prolina removida en un vector pSUMO) (SEQ ID NO: 51 (aa); SEQ ID NO: 52 (ADN)).

20 No se observó mejora alguna en la producción, aunque solamente se llevó a cabo una repetición (No se muestran los datos).

25 La producción de LVL088 se analizó después de una inducción durante la noche con 1 mM de IPTG a 37°C y a 16°C. Cuando se analizó electroforéticamente, la producción de LVL088 se visualizó solamente mediante Western blot. Un lote de purificación a partir de cuatro matraces de cultivo de 800 mililitros dio como resultado 0.4 miligramos de proteína. Por otra parte, LVL111 fue fácilmente detectable en seguida del

teñido con azul Coomassie. La proteína recombinante LVL111 se produjo y se purificó en 8 lotes. Se estimó que varios lotes de LVL111 (cada uno a partir de cuatro matraces de cultivo de 800 mililitros) producían el intervalo de 3.3 miligramos/lote a 10 miligramos/lote de proteína purificada. Por consiguiente, la producción de LVL088 fue más baja que la que se ve para el LVL111. La proteína purificada también se probó para determinar su reactividad con varios anticuerpos monoclonales anti-CASB7439 y se obtuvo una reactividad positiva en todos los casos.

Ejemplo 6

Se investigó la remoción de la cola de poli-histidina C-terminal a partir de la construcción del LVL111. La molécula de ácido nucleico que codificaba el polipéptido poli-pro (-) del CASB7439 sin la porción que codificaba la poli-histidina C-terminal se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la construcción del LVL111 y se clonó en el vector pET19b. Esta construcción se designó como LVL137. La construcción LVL137 fue esencialmente LVL111 sin la secuencia de nucleótidos que codifica una cola de poli-histidina C-terminal. SEQ ID NO: 5 (aa); SEQ ID NO: 6 (ADN). La remoción de la cola de poli-histidina C-terminal no tuvo ningún impacto evidente sobre el nivel de producción. Como se

analizó mediante gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie, el LVL137 produjo el mismo nivel de proteína que el LVL111.

Entonces se amplificó la molécula de ácido nucleico que codificó el polipéptido poli-pro (-) CASB7439, mediante reacción
5 en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la secuencia sintética del gen de CASB7439art (0706840), y se clonó en un vector pET26 con una marca de seis poli-histidinas en el término N (LVL138). SEQ ID NO: 33 (aa); SEQ ID NO: 34 (ADN).

10 Esta construcción exhibió un nivel significativamente reducido de la producción de proteína, y fue difícil de detectar mediante Western blot.

Se generó una molécula de ácido nucleico que codificó una marca de seis poli-histidinas en el término N del polipéptido
15 poli-pro (-) CASB7439 en un vector resistente a la canamicina pET24. Se utilizó un nuevo diseño de enlazador para remover una estructura de horquilla creada entre la secuencia de la marca de poli-histidina y el extremo 5' del gen de CASB7439.
20 De una manera específica, los codones para los primeros ocho residuos de aminoácidos de la construcción de la proteína se alteraron hasta la siguiente secuencia de nucleótidos: 5' ATG CAT CAT CAT CAT CAT CAT GAC... 3' (SEQ ID NO: 35). (Los codones originales fueron 5' ATG CAC CAT CAC CAT CAC CAT
25 GAT... 3' (SEQ ID NO: 36).) Esta construcción se designó como

LVL160. SEQ ID NO: 37 (aa); SEQ ID NO: 38 (ADN). Mediante análisis de gel y Western blot, la producción de proteína pareció ser tan débil como la obtenida con el LVL138.

5 Se generó una molécula de ácido nucleico que codificaba una construcción de proteína con una marca de diez poli-histidinas en el término N del polipéptido poli-pro (-) de CASB7439 en un vector resistente a la canamicina pET24. Esta construcción se identificó como LVL168. SEQ ID NO: 11 (aa);
10 SEQ ID NO: 12 (ADN). El nivel de producción fue comparable con el nivel observado para el LVL111. En la Figura 5/35 se encuentra una alineación de varias construcciones discutidas en este Ejemplo.

15 Los resultados para las construcciones discutidas en este Ejemplo y en el Ejemplo 1 se resumen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1

	# LVL	Descripción	Vector	Producción
20	LVL00 7	His-CASB7439 largo	pET19b(+)	gel-/blot+
	LVL01 0	His-CASB7439 largo	pET19b(+)	gel-/blot+

25

5

10

15

20

25

# LVL	Descripción	Vector	Producción
LVL01 6	pD1/3-CASB7439-OPT- 6His	pET21b(+)	gel-/blot +
LVL11 1	His-Del-poli-Pro- dominio-His-OPT largo	pET19b(+)	gel+++/blot +++
LVL13 7	His-Del-poli-Pro- dominio-OPT largo	pET19b(+)	gel+++/blot +++
LVL13 8	6His-Del-poli-Pro- dominio-OPT	pET26b(+)	gel-/blot +
LVL16 0	Hismodif--Del-poli-pro- dominio-OPT	pET24b(+)	gel-/blot +
LVL16 8	10His-del-poli-pro- dominio-OPT	pET24b(+)	gel+++/blot +++

Tabla 1. Niveles de expresión para las construcciones discutidas en los Ejemplos 1, 3, y 6. Una construcción que da como resultado "gel-/blot+" la producción es generalmente visible solamente mediante Western blot cuando se somete al lisado de células enteras a SDS-PAGE. Una construcción que

507

da como resultado "gel+++/blot +++" la producción es claramente visible mediante teñido con azul Coomassie cuando se somete al lisado de células enteras a SDS-PAGE.

6His: Marca de histidina = 6 residuos de histidina.

5 **His Largo** = 23aa (MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKH) (SEQ ID NO: 42)

Dominio Del-poli-Pro: CASB7439 modificado mediante la supresión de la región rica en prolina,

10 **OPT:** Codones optimizados.

Hismodif: Marca de histidina modificada para la selección de codones (véase en la presente, Ejemplo 6).

1/3pD: Construcción de Proteína D descrita en la presente.

10His: Marca de histidina con 10 residuos de histidina.

15 **Ejemplo 7**

Se generó otra construcción de CASB7439 en fusión con un fragmento de Proteína D a partir de *Haemophilus influenzae*. Como se muestra en la SEQ ID NO: 39 (aa) (SEQ ID NO: 40 (ADN)), los aminoácidos Met-Asp-Pro se fusionaron con 108
20 aminoácidos N-terminales de la Proteína D procesada (residuos de aminoácidos 2-109 de la Proteína D procesada). La SEQ ID NO: 39 es referida en la presente como 1/3pD o 1/3 Proteína D. La secuencia de nucleótidos sintética de CASB7439 obtenida en
25 Geneart (0706840) (región rica en prolina suprimida) se sub-

clonó en pET26-1/3pD, un plásmido resistente a la canamicina que contenía la 1/3pD, para obtener el LVL141. La secuencia del LVL141 se estipula en la SEQ ID NO: 7 (aa) y en la SEQ ID NO: 8 (ADN). La producción fue comparable con el LVL111.

5 Este clon se mutó entonces mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para remover el enlazador de cuatro aminoácidos (Ala-Ala-Ala-His) entre los componentes 1/3pD y CASB7439. La secuencia de la construcción resultante, designada como LVL144, se estipula en la SEQ ID NO: 9 (aa) y
10 en la SEQ ID NO: 10 (ADN). La producción fue comparable con el LVL111. La Figura 6/35 muestra una alineación de CASB7439 (SEQ ID NO: 13); LVL168 (SEQ ID NO: 12), PD1/3 (SEQ ID NO: 39), y LVL144 (SEQ ID NO: 9).

15 **Ejemplo 8**

Pruebas de solubilización de LVL168

En términos generales, las construcciones de proteínas purificadas que comprendían el CASB7439 se solubilizaron en regulador de guanidina 6M, se transfirieron al regulador de urea
20 8M, y se almacenaron en Urea 4 M, HEPES 20 mM, TCEP 1 mM, NaCl 150 mM, pH de 7.0. Los resultados preliminares llevados a cabo en pequeños volúmenes sugirieron que el LVL168 también se podría solubilizar en un regulador de fosfato
25 sin urea ni agentes reductores, tales como EDTA o TCEP, y con

o sin NaCl. No se observó precipitación alguna después de la diálisis en estos reguladores. Los ensayos de solubilización se llevaron a cabo para caracterizar la proteína LVL168 en los dieciséis reguladores enlistados en la Tabla 2. Cien microlitros de las muestras de proteína LVL168 purificadas en regulador de urea 8 M, HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, TCEP 1 mM, pH de 7.0, se pusieron en la unidad de mini-diálisis 10000 MWCO (Biolynx), previamente acondicionada con el regulador mediante dos enjuagues. La diálisis se llevó a cabo durante la noche en 100 mililitros de cada uno de los dieciséis reguladores enlistados en la Tabla 2 con agitación a 4°C. Las muestras entonces se cosecharon a partir de las unidades, se pusieron en Eppendorfs, y se centrifugaron durante 5 minutos a 20,000g. Las proteínas solubles permanecieron en suspensión, pero las proteínas no solubles se precipitaron y condujeron a gránulos después de la centrifugación. Los reguladores en donde fue soluble la proteína LVL168 se enlistan en la Tabla 2.

Los sobrenadantes se probaron mediante gel SDS-PAGE, y las concentraciones de las proteínas solubles restantes se midieron mediante el método de RC DC utilizando las instrucciones del fabricante. Un kit para llevar a cabo el método de RC DC del método de Lowry modificado está disponible en BioRad Laboratories, 1000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA

94547. Las muestras se mantuvieron a 4°C para una prueba de estabilidad.

Pruebas de estabilidad del LVL168

5 Las proteínas de LVL168 a partir del ensayo de solubilidad se mantuvieron durante 7 días a 4°C. Se transfirieron veinte microlitros de cada una de las muestras 2, 3, 5, 6, 9 a 16 a otros tubos, y se probaron para determinar su estabilidad a 4°C, a 37°C, o a la temperatura ambiente durante 2 días adicionales.

10 Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 20,000g. Los sobrenadantes se resolvieron mediante SDS-PAGE, y se analizaron los perfiles para determinar la degradación, la aglomeración, o la pérdida de proteína mediante una comparación con la proteína purificada original. La proteína fue

15 estable en la mayoría de los reguladores probados.

Tabla 2

Muestra #	Regulador	Solubilidad
1	PBS 1X pH de 7.3	Insoluble
2	Urea 2M, Tris 20 mM, NaCl 150 mM + TCEP 1 mM, pH de 8.0	Soluble
3	Urea 4M, Tris 20 mM, NaCl 150 mM	Soluble

Muestra #	Regulador	Solubilidad
	+ TCEP 1 mM, pH de 7.0	
4	PBS 1X, TCEP 1 mM, EDTA 1 mM, pH de 7.3	Insoluble
5	NaAc 10 mM, EDTA 1 mM. TCEP 1 mM, NaCl 5 mM, pH de 5.01	Soluble
6	Imidazol 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM, pH de 6.0	Soluble
7	Bicina 20 mM, NaCl 138 mM, EDTA 1 mM, TCEP 1 mM, pH de 8.7	Insoluble
8	Tris 50 mM, NaCl 250 mM, Sacarosa 27 mM, Tween80 al 0.1 por ciento, TCEP 1 mM, pH de 8.5	Insoluble
9	Tris 50 mM, NaCl 250 mM, Sacarosa 270 mM, 0.3 mililitros-Arginina, TCEP 1 mM, pH de 8.5	Soluble
10	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 150 mM,	Soluble

5

10

15

20

Muestra #	Regulador	Solubilidad
	EDTA 1 mM + TCEP 1 mM, pH de 6.0	
11	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 5 mM, EDTA 1 mM + TCEP 1 mM, pH de 6.0	Soluble
12	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 5 mM, EDTA 1 mM, pH de 6.0	Soluble
13.	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 5 mM + TCEP 1 mM + pH de 6.0	Soluble
14	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 5 mM, pH de 6.0	Soluble
15	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 5 mM, pH de 6.5	Soluble
16	Na ₂ HPO ₄ 20 mM, NaCl 150 mM, pH de 6.0	Soluble

Tabla 2. Pruebas de solubilidad y estabilidad del LVL168.

25

Para mayor conveniencia del lector, en la Tabla 3 se

proporciona un compendio de las construcciones mencionadas en la presente, y su producción relativa.

Tabla 3

5	# LVL	Descripción	Vector	Producción
	LVL007	His-CASB7439 largo	pET19b(+)	gel-/blot+
10	LVL010	His-CASB7439 largo	pET19b(+)	gel-/blot+
	LVL016	pD1/3-CASB7439-OPT- 6His	pET21b(+)	gel-/blot +
15	LVL018	CASB7439-OPT-6His	pET21b(+)	gel-/blot +
20	Const-1	His-CASB7439-OPT- Const-1 largo (truncamiento de dirección al núcleo)	pET19b(+)	gel-/blot +
	LVL055	His-poli-Pro-dominio- trunc-OPT largo	pET19b(+)	gel+++/blot +++
25	LVL056	His-ADN largo se	pET19b(+	gel-/blot -

# LVL	Descripción	Vector	Producción
	enlaza a trunc-OPT	)	
5 LVL057	His-bHLH solo-OPT largo	pET19b(+)	gel-/blot -
LVL060	His-C7439-OPT largo	pET19b(+)	gel-/blot +
10 LVL088	Del-poli-Pro-dominio- OPT-6His	pET26b(+)	gel-/blot +
LVL111	His-Del-poli-Pro- dominio-His-OPT largo	pET19b(+)	gel+++ / blot +++
15 LVL137	His-Del-poli-Pro- dominio-OPT largo	pET19b(+)	gel+++ / blot +++
LVL138	6His-Del-poli-Pro- dominio-OPT	pET26b(+)	gel-/blot +
20 LVL141	1/3pD-Del-poli-Pro- dominio-OPT-6His	pET26b(+)	gel+++ / blot +++
25 LVL144	enlazador mut de 1/3pD-Del-poli-Pro-	pET26b(+)	gel+++ / blot +++

5

# LVL	Descripción	Vector	Producción
	dominio-OPTHis		
LVL160	Hismodif--Del-poli-pro- dominio-OPT	pET24b(+)	gel-/blot +
LVL168	10His-del-poli-pro- dominio-OPT	pET24b(+)	gel+++/blot +++

10

Tabla 3. Véanse las abreviaturas de la Tabla 1. Se utilizan las siguientes abreviaturas adicionales en la Tabla 3:

trunc: Truncado.

const: Construcción.

15

mut: Secuencia mutada para remover aminoácidos no relacionados entre la pD1/3 y el polipéptido CASB7439 modificado.

20

enlazador: Aminoácidos no relacionados entre dos partes de la molécula.

ADN enlace: Dominio de enlace de ADN.

bHLH solo: Dominio básico de hélice-ciclo-hélice.

25

Materiales y Métodos

Expresión - Inducciones a pequeña escala:

Las cepas de *E. coli* BLR (DE3) se transformaron con las construcciones mencionadas en la presente, se pusieron en
5 placas de agar con Caldo Luria (LB) que contenían el antibiótico apropiado (40 microgramos/mililitro de Canamicina ó 100 microgramos/mililitro de carbenicilina), y se incubaron durante la noche a 37°C. El prado bacteriano resultante se utilizó para
10 inocular 20 mililitros del medio de LB y la Fuente de Proteína Alternativa (APS) con el antibiótico apropiado (40 microgramos/mililitro de Canamicina ó 100 microgramos por mililitro de carbenicilina), y se pusieron a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5 a 1.0.

15 Las inducciones se hicieron mediante la adición de IPTG 1 mM, ya sea a 16°C o bien a 37°C. Con el objeto de inducir a 16°C, el cultivo en crecimiento se enfrió sobre hielo 1 hora antes de inducir la expresión de la proteína recombinante. El
20 cultivo se puso entonces de regreso para crecer a 16°C, y se mantuvo bajo estas condiciones durante 16 horas. Con el objeto de inducir a 37°C, se indujo inmediatamente la expresión de las proteínas recombinantes mediante la adición de IPTG al cultivo en crecimiento. La inducción se mantuvo a 37°C durante 3
25 horas. Se tomaron pequeñas alícuotas de 1 mililitro antes y

después de la inducción.

Entonces las alícuotas se centrifugaron (10 minutos, 4°C, 20000 x g), y los gránulos bacterianos se mantuvieron a -20°C hasta el análisis. El análisis se llevó a cabo en seguida de la extracción de la proteína BugBuster de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. BugBuster, elaborada por Novagen, está comercialmente disponible en VWR. El nivel de expresión se determinó mediante tñido con azul Coomassie de los geles de SDS-PAGE y mediante Western blots. La solubilidad se evaluó después de la detección de la proteína en los gránulos o en los sobrenadantes a partir de la extracción de la BugBuster.

Expresión - Inducciones a gran escala:

Las cepas de *E. coli* BLR (DE3) se transformaron con las construcciones como se describen en la presente, se pusieron en placas de agar y LB que contenían el antibiótico apropiado, y se incubaron durante la noche a 37°C. El prado bacteriano resultante se utilizó para inocular el número deseado de matraces de 800 mililitros del medio LB-APS con el antibiótico apropiado (40 microgramos/ mililitro de Canamicina ó 100 microgramos por mililitro de carbenicilina), y se pusieron a 37°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.5 a 1.0. Los matraces de 2.5 litros que contenían 800 mililitros del cultivo en crecimiento se

enfriaron entonces sobre hielo 1 hora antes de inducir la expresión de la proteína recombinante mediante la adición de IPTG 1 mM. Con el objeto de inducir a 16°C, el cultivo en crecimiento se enfrió sobre hielo una hora antes de la inducción. Los cultivos se pusieron entonces de regreso para crecer a 16°C, y se mantuvieron bajo estas condiciones durante 16 horas.

Los cultivos se centrifugaron (15 minutos, 4°C, 6000 x g), y los gránulos bacterianos se mantuvieron a -80°C hasta el proceso de purificación. También se tomaron pequeñas alícuotas de 1 mililitro antes y después de la inducción para BugBuster, y se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blots antes de la purificación.

Purificación

Los gránulos bacterianos se volvieron a suspender en el regulador de lisis (regulador Tris 20 mM (pH de 8.0) que contenía NaCl 500 mM, TCEP 10 mM), y una mezcla de inhibidores de proteasa (Complete sin EDTA). Las bacterias se lisaron ya sea mediante sonicación utilizando una sonda de 13 milímetros en un procesador ultrasónico de células Vibra, de Emulsiflex C3 (Avestin) o con el sistema de alteración celular Constant (Sistema Constant). Los componentes solubles

(sobrenadante) e insolubles (gránulos) se separaron mediante centrifugación a 20 000 g durante 20 minutos a 4°C. Debido a que se esperan las proteínas recombinantes CASB7439 en los gránulos, se desecharon los sobrenadantes.

5 Usualmente, los componentes insolubles (gránulos) se volvieron a solubilizar en regulador de bicina 50 mM, pH de 8.0, que contenía guanidina HCl 6M, NaCl 500 mM, TCEP 10 mM, y entonces se centrifugaron (20 000 x g durante 20 minutos). El
10 sobrenadante se cargó en una columna His Trap de 5 mililitros(GE Healthcare) ya equilibrada previamente en el regulador anterior, pero bajando la concentración de TCEP hasta 1 mM. Después de cargarse, la columna se lavó una vez con el mismo regulador. El agente caotrópico GnHCl 6M fue
15 reemplazado por Urea 8M (Urea 8M, HEPES 20 mM, NaCl 500 mM, TCEP 1 mM, pH de 8.0). La elución se llevó a cabo utilizando un regulador de HEPES 20 mM (pH de 8.0) que contenía Urea 8M, NaCl 500 mM, TCEP 1 mM e imidazol 250
20 mM. Las muestras a partir de las fracciones de la elución se analizaron mediante SDS-PAGE, y se reservaron las fracciones que contenían la proteína de interés, se concentraron en un dispositivo centrífugo si era necesario, y se utilizaron para el segundo paso de purificación.

25 Se hicieron uno o dos pasos de SEC (cromatografía por

exclusión de tamaños) (Superdex 200, GE Healthcare), dependiendo de la pureza necesaria, en Urea 8M, HEPES 20 mM, NaCl 500 mM, TCEP 1 mM, pH de 8,0, antes del último paso de desalación. La desalación se hizo en una columna de desalación G25 previamente equilibrada con el regulador de HEPES 20 mM final (pH de 7.0) que contenía Urea 4M, NaCl 150 mM y TCEP 1 mM.

Las muestras de proteína se pusieron en alícuotas de 1 mililitro en tubos, y se almacenaron a – 80°C.

Análisis de proteína — determinación de la concentración

Se determinó la concentración de proteína utilizando un ensayo de proteína RC DC (Método de Lowry modificado de BioRad). Este ensayo se utilizó debido a la incompatibilidad de algunos componentes del regulador final con los ensayos clásicos de Lowry o BCA (alto contenido de urea y agentes reductores). También se analizaron las cantidades conocidas de la preparación de la proteína final mediante SDS-PAGE, Western blot, y para determinar el contenido de LAL con el fin de evaluar la aglomeración o la degradación, la proteína de *E. coli*, y el nivel de contaminación con LPS.

Ejemplo 9

Validación de Expresión de CASB7439 en los Tejidos

Normales y con Cáncer Colo-Rectal (CRC)

Los Solicitantes llevaron a cabo el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real de la expresión del ARNm de CASB7439 en 83 muestras de CRC y 12 muestras de colon normal obtenidas en Corixa Corporation. El ARNm de CASB7439 se sobre-expresó cuando menos 10 veces en el CRC, comparándose con el colon normal en el 63 por ciento de las muestras de CRC probadas, comparándose con los tejidos normales (los datos se reportan como la proporción de expresión promedio de CASB7439/ β -actina) (Figura 7/35). En adición, los Solicitantes detectaron la proteína CASB7439 mediante inmunofluorescencia (IF) en los tejidos de CRC humanos utilizando un anticuerpo monoclonal de conejo anti-CASB7439 (40-12) (el anticuerpo se discute en cualquier otra parte de la presente); no se detectó ninguna proteína CASB7439 en las secciones adyacentes del tejido normal.

Se generaron datos de expresión adicionales para CASB7439 mediante el análisis GeneLogic (Gene Microarray), empleando las técnicas convencionales. Se encontró que el ARNm de CASB7439 se expresa altamente en las muestras de CRC a partir de todas las etapas de la enfermedad (no se muestran los datos). Los Solicitantes llevaron a cabo el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR)

en tiempo real de la expresión del ARNm del CASB7439 en 83 muestras de CRC y 12 muestras de colon normal obtenidas en Corixa Corporation. El ARNm de CASB7439 se sobre-expresó cuando menos 10 veces en el CRC, comparándose con el colon normal en el 63 por ciento de las muestras de CRC probadas, comparándose con los tejidos normales (los datos se reportan como la proporción de expresión promedio de CASB7439/ β -actina) (Figura 7/35).

La literatura independiente reporta la detección del CASB7439, es decir, HASH-2, ARNm mediante hibridación *in situ* (ISH) en un nivel muy bajo en el fondo de las criptas colónicas, pero no en cualesquiera otros tejidos normales, exceptuando la placenta. Jubb y colaboradores (2006) *Oncogene* 25: 3445-3457. En los tejidos de cáncer colo-rectal (CRC), se ha demostrado que el ARNm de CASB7439 se sobre-expresa 15 veces en el 70 por ciento de los tejidos humanos probados.

Expresión de la proteína CASB7439 en los Tejidos de CRC y en los Tejidos de Colon Normal Adyacentes

Con el objeto de analizar la expresión de la proteína CASB7439 mediante inmunofluorescencia en los tejidos normales y de CRC, se desarrolló un anticuerpo monoclonal de conejo específico anti-CASB7439 (40-12). Se obtuvieron

hibridomas de conejo reproducidos contra el CASB7439 del proveedor comercial Epitomics Inc., y fueron rastreados por los Solicitantes. Los mAbs producidos por los hibridomas se rastrearon primero mediante ELISA utilizando la proteína recombinante LVL111 (SEQ ID NO: 3). La especificidad de los mAbs se verificó mediante Western blot utilizando el LVL111 y el lisado celular obtenido a partir de una línea celular recombinante diseñada para expresar el CASB7439 (véase más adelante, TC1/CASB7439). Se evaluó la expresión de la proteína CASB7439 en los tumores de TC1/CASB7439 (cultivados en los ratones), en las células SW-620 y SW-480 (línea celular de cáncer colo-rectal humano positiva para CASB7439), y en las células HCT-116 (línea celular de cáncer colo-rectal humano negativa para CASB7439), mediante inmunofluorescencia con los mAbs. Se seleccionó el mAb 40-12 para la validación de la expresión de la proteína CASB7439.

Los Solicitantes obtuvieron en NDRI (National Disease Research Interchange, 8 Penn Center, 8th Floor, 1628 JFK Boulevard, Filadelfia, PA 19103), las muestras de tejido congeladas empotradas en OCT de tanto el tejido de CRC como el tejido adyacente normal a partir de 17 individuos diferentes; para 5 de estos individuos, también se obtuvieron los tejidos metastásicos. Los Solicitantes rastrearon 17 tumores primarios,

17 tejidos normales adyacentes, y 5 metástasis. De los 17 tumores de CRC primarios analizados, 13 fueron positivos para la expresión de la proteína CASB7439 (76.5 por ciento). Todas estas muestras positivas para CASB7439 fueron
 5 adenocarcinomas. Ninguno de los tejidos normales adyacentes expresó niveles detectables de proteína CASB7439. De los tejidos metastásicos, 3 de 5 fueron positivos (60 por ciento) para la expresión de la proteína CASB7439.

10 Se estudió la correlación entre la proteína CASB7439 y la expresión del ARNm en 16 tejidos de CRC mediante el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real llevada a cabo utilizando las técnicas de rutina tanto en los tejidos de cáncer como en los tejidos de colon
 15 normal adyacentes. El teñido con Ki67 se utilizó como un marcador de proliferación. La correlación entre la proteína CASB7439 y la expresión del ARNm se presenta en la Figura 8/35. Las muestras de tejido que exhibieron la proteína CASB7439 mediante inmunofluorescencia, también exhibieron
 20 los niveles más altos de ARNm de CASB7439.

Ejemplo 10

Inmunogenicidad del CASB7439 en los ratones:

Inmunogenicidad de células-T de CASB7439 en ratones

endógamos

Con el objeto de estudiar la inmunogenicidad de células-T del CASB7439 en los ratones, se generó un banco de péptidos mediante los métodos de síntesis de rutina, para cubrir la secuencia entera de la proteína CASB7439 (Figura 9/35). Cada péptido fue un 15-mer, que traslapaba al siguiente péptido por 11 aminoácidos. Con el fin de investigar las regiones inmunodominantes, se arreglaron 14 reservas de péptidos de acuerdo con una matriz, de tal manera que cualesquiera dos reservas de péptidos tuvieran solamente un péptido común (Figura 10/35).

Para los estudios de inmunogenicidad de células-T en los ratones, hasta 15 ratones endógamos y hasta 10 ratones exógamos por grupo recibieron cuatro inmunizaciones intramusculares cada dos semanas, con diferentes dosis (de 0 a 30 microgramos) de diferentes proteínas CASB7439 recombinantes formuladas con AS01B o AS15, ambos de los cuales son adyuvantes GSK registrados. Una vez formulado con el antígeno, el AS01B se compone de MPL (100 microgramos/mililitro), y QS21 (100 microgramos/mililitro) en liposomas. Una vez formulado con el antígeno, el AS15 se compone de MPL (100 microgramos/mililitro), QS21 (100 microgramos/ mililitro), y CpG7909 (840 microgramos/mililitro) en liposomas. Cada inmunización contuvo 25 microlitros de

proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de una concentración 2X de adyuvante. Por consiguiente, cada ratón del grupo con AS01B recibió 5 microgramos de MPL y 5 microgramos de QS21. Cada ratón del grupo con AS15 recibió 5
5 microgramos de MPL, 5 microgramos de QS21, y 5 microgramos de CpG7909. Después de la última inmunización, se obtuvieron los bazos o los PBLs a partir de los ratones. Para el análisis de inmunogenicidad del CASB7439 en ratones endógamos, se
10 analizaron los bazos o los PBLs individualmente o agrupados. Para el análisis de inmunogenicidad del CASB7439 en los ratones exógamos CD1, cada bazo se procesó individualmente.

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) o los esplenocitos aislados se volvieron a suspender en una
15 concentración final de 10×10^6 células por mililitro en el medio de cultivo de RPMI 1640 con los siguientes aditivos: Penicilina-Estreptomicina (1X), aminoácidos no esenciales (1X), 2-Mercapto-etanol (55 mM), piruvato de sodio (100 mM), L-Glutamina (200 mM). Las células se estimularon con los
20 péptidos a partir de la secuencia de CASB7439 (utilizados en una concentración final de 1 microgramo/mililitro/péptido en RPMI 1640 + aditivos + suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 5 por ciento). Se llevó a cabo un teñido intracelular
25 (ICS) para CD4, CD8, IL-2, IL-5, IFN γ y TNF α , de acuerdo con

los procedimientos clásicos. Después de la estimulación, las células se trataron con brefeldina A y se fijaron. El teñido superficial de CD4 y CD8 se hizo con anticuerpos monoclonales específicos de CD4 y CD8. Entonces, las células se
5 permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpos monoclonales específicos reproducidos contra las proteínas de IL-2, IL-5, IFN γ y TNF α . Las células se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSCanto II. Los datos se expresan en
10 porcentajes de células-T CD4 o CD8 de IFN γ + y TNF α + doblemente positivas.

Experimento de comparación de inmunogenicidad de Células-T de Múltiples Razas de Ratones Endógamos

Los Solicitantes compararon la inmunogenicidad de la
15 proteína CASB7439, formulada con cualquiera de AS01B o AS15, en los ratones endógamos C57Bl/6, Balb/C, CB6f1 (progenie de primera generación de C57Bl/6 cruzada con ratones Balb/C), y C3H adquiridos en Charles River, Senneville,
QC, Canadá. Se inmunizaron cinco ratones por grupo con 10
20 microgramos de la proteína CASB7439 recombinante (LVL111) formulada con cualquiera de AS01B o AS15. Los bazos se recolectaron y se reservaron (una reserva de cinco bazos por grupo). En la Figura 11/35 se presenta la respuesta de las
25 células-T CD4 (IFN γ + y TNF α + doblemente positivos) al LVL111

para cada raza, para la formulación del AS01B, y en la Figura 12/35 para la formulación del AS15. No se observó ninguna respuesta de las células-T CD8 (IFN γ + y TNF α + doblemente positivos) en cualquiera de las cuatro razas de ratones endógamos.

Los péptidos inmunodominantes CASB7439 identificados en ratones endógamos inmunizados con CASB7439+AS15 se presentan en la Figura 13/35. Los péptidos inmunodominantes y las regiones correspondientes de la SEQ ID NO: 13 son:

- C57Bl/6: péptido 39 (SEQ ID NO: 91) (aminoácidos 153 a 167 de la SEQ ID NO: 13).
- Balb/c: péptido 24 (aminoácidos 93 a 107 de la SEQ ID NO: 13).
- CB6f1: péptidos 7-8 (aminoácidos 25 a 43 de la SEQ ID NO: 13), y 23-24 (aminoácidos 89 a 107 de la SEQ ID NO: 13).
- C3H: péptidos 9-11 (aminoácidos 33 a 55 de la SEQ ID NO: 13), 16-19 (aminoácidos 61 a 87 de la SEQ ID NO: 13), y 41-43 (aminoácidos 161 a 183 de la SEQ ID NO: 13).

Estudios de Inmunogenicidad de Células-T de LVL111, LVL168 y LVL144 en Ratones Endógamos

Se estudió la inmunogenicidad de LVL111, LVL168, y

LVL144 en los ratones CB6f1 endógamos. En este experimento, se inmunizaron cinco ratones por grupo (Charles River, Senneville, QC, Canadá) cuatro veces cada dos semanas con las proteínas CASB7439 recombinantes (LVL111, LVL168 y LVL144) formuladas con AS15. Cada inmunización contuvo 25 microlitros de la proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de una concentración 2X de adyuvante, como se describe en cualquier otra parte en la presente. Las respuestas de células-T CD4 y CD8 (IFN γ y TNF α doblemente positivos) se midieron mediante teñido intracelular y análisis de citometría de flujo en los ratones CB6f1 endógamos individuales, después de la reestimulación de los esplenocitos con la matriz peptídica de CASB7439. (No se muestran los datos) Las inmunizaciones con las tres construcciones desencadenaron una respuesta inmunitaria de células-T CD4 contra las mismas regiones inmunogénicas (aminoácidos 25 a 43 de la SEQ ID NO: 13 y aminoácidos 89 a 107 de la SEQ ID NO: 13) en los ratones endógamos CB6f1.

Inmunogenicidad del CASB7439 en los ratones:
Inmunogenicidad de células-T de CASB7439 en ratones exógamos

Los ratones exógamos CD1 (Charles River, Senneville, QC, Canadá) se inmunizaron cuatro veces cada dos semanas

con la proteína CASB7439 recombinante (LVL111) formulada con cualquiera de AS01B o AS15. Cada inmunización contuvo 25 microlitros de la proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de una concentración 2X de
5 adyuvante, como se describe en cualquier otra parte en la presente. Las respuestas de células-T CD4 y CD8 (IFN γ y TNF α doblemente positivos) se midieron mediante teñido intracelular y análisis de citometría de flujo in los ratones CD1 individuales,
10 después de la reestimulación de los esplenocitos con la matriz peptídica de CASB7439.

Las Tablas de los péptidos inmunogénicos CD4 de CASB7439 identificados en ratones exógamos inmunizados con cualquiera de CASB7439+AS01B o CASB7439+AS15 se
15 presentan en la Figura 14/35, arriba y abajo, respectivamente. Las regiones inmunogénicas de células-T CD4 identificadas en los ratones exógamos CD1 cubren las siguientes regiones del CASB7439 (expresadas en términos de las posiciones de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13): péptidos 8-10 (aminoácidos
20 29 a 51 de la SEQ ID NO: 13), péptidos 16-18 (aminoácidos 61 a 83 de la SEQ ID NO: 13), y péptidos 24-26 (aminoácidos 93 a 115 de la SEQ ID NO: 13). Las regiones inmunodominantes de células-T CD8 identificadas en los ratones exógamos CD1
25 cubren las siguientes porciones de CASB7439 (SEQ ID NO: 13):

péptidos 16-18 (aminoácidos 61 a 83 de la SEQ ID NO: 13),
péptidos 24-26 (aminoácidos 93 a 115 de la SEQ ID NO: 13), y
péptido 32 (aminoácidos 125 a 139 de la SEQ ID NO: 13). (No
se muestran los datos.)

5 **Estudios de Inmunogenicidad de Células-T de LVL111,
LVL168 y LVL144 en Ratones Exógamos**

Las respuestas de células-T CD4 y CD8 mediadas por
CASB7439+AS15 inducidas por LVL111, LVL168 y LVL144 se
10 probaron en los ratones CD1 exógamos individuales adquiridos
en Charles River, Senneville, QC, Canadá. Cinco ratones por
grupo recibieron cuatro inmunizaciones intramusculares cada
dos semanas compuestas de 10 microgramos de la proteína
CASB7439 recombinante (LVL111, LVL168 o LVL144) formulada
15 con AS15. Cada inmunización contuvo 25 microlitros de la
proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros
de una concentración 2X de adyuvante, como se describe en
cualquier otra parte en la presente. Cinco ratones del grupo de
control se inmunizaron con un regulador de solución salina.
20

os semanas después de la cuarta inmunización, los
ratones se sacrificaron. Las respuestas de células-T CD4 y CD8
(IFN γ y TNF α doblemente positivos) se midieron mediante
teñido intracelular y análisis de citometría de flujo después de la
25 re-estimulación de los esplenocitos con cuatro reservas de

péptidos (reserva 1: péptidos 8-9-10, reserva 2: péptidos 16-17-18, reserva 3: péptidos 24-25-26 y reserva 4: péptidos 30-31-32). Los datos se presentan en la Figura 15/35. Las mismas regiones inmunogénicas de células-T CD4 de la SEQ ID NO: 13, específicamente los péptidos 16-18 (aminoácidos 61 a 83 de la SEQ ID NO: 13), y péptidos 24-26 (aminoácidos 93 a 115 de la SEQ ID NO: 13) se activaron después de las inmunizaciones con cada una de las tres construcciones de CASB7439 formuladas con AS15.

Estudios de Inmunogenicidad de Células-T de los LVL144 y LVL168 en Ratones Transgénicos HLA A2.1/DR1

Las respuestas de células-T CD4 y CD8 mediadas por CASB7439+AS15 inducidas por dos construcciones (LVL168 o LVL144) se probaron en los ratones transgénicos HLA A2.1/DR1 reservados (3 reservas de 3 ratones) adquiridos en el Pasteur Institute, París, Francia. 9 ratones por grupo recibieron cuatro inmunizaciones intramusculares cada dos semanas, compuestas de 6.25 microgramos de LVL168 ó 10 microgramos de LVL144, formulados con AS15. Cada inmunización contuvo 25 microlitros de la proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de una concentración 2X de adyuvante, como se describe en cualquier otra parte en la presente. Dos ratones del grupo de control se inmunizaron con el adyuvante solo.

Dos semanas después de la cuarta inmunización, los ratones se sacrificaron. Las respuestas de células-T CD4 y CD8 (IFN γ y TNF α doblemente positivos) se midieron mediante teñido intracelular y análisis de citometría de flujo después de los PBLs y la re-estimulación de los esplenocitos con 7 reservas de péptidos que cubrían la secuencia de CASB7439 entera [reserva 1: péptidos 1-7 (SEQ ID NOs: 53-59), reserva 2: péptidos 8-14 (SEQ ID NOs: 60-66), reserva 3: péptidos 15-21 (SEQ ID NOs: 67-73), reserva 4: péptidos 22-28 (SEQ ID NOs: 74-80), reserva 5: péptidos 29-35 (SEQ ID NOs: 81-87), reserva 6: péptidos 36-42 (SEQ ID NOs: 88-94), y reserva 7: péptidos 43-46 (SEQ ID NOs: 95-98)]. Más aún, el péptido inmunodominante de HLA DR humano 24 (SEQ ID NO: 76) se probó individualmente. Los resultados presentados en las Figuras 16 a 19 muestran que se activa la misma región inmunodominante de células-T CD4 y CD8 T (péptidos 22-28 + péptido 24) después de las inmunizaciones con cada una de las dos construcciones de CASB7439 formuladas con AS15. Por consiguiente, el péptido 24 también es un péptido inmunodominante de HLA A2.1 humano. Estos resultados se confirmaron en un segundo experimento en donde se utilizaron los mismos péptidos de CASB7439 para reestimar los esplenocitos obtenidos a partir de 5 ratones individuales por

grupo inmunizados con cualquiera de LVL168 o LVL144 formulados con AS15. (No se muestran los datos.)

Inmunogenicidad del CASB7439 en los ratones: Estudios de Respuesta Humoral Mediada por CASB7439 CB6f1 en

5 **Ratones**

Se evaluó la respuesta humoral mediada por CASB7439 a 10 microgramos de CASB7439 (LVL111) formulado con cualquiera de AS01B o AS15, utilizados en una dosis de 1/10 de la humana, en los ratones CB6f1 endógamos (Charles River, Senneville, QC, Canadá). Diecinueve ratones por grupo recibieron cuatro inmunizaciones intramusculares cada dos semanas. Cada inmunización contuvo 25 microlitros de la proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de adyuvante (concentración 2X). Los ratones se sangraron justo antes de cada inmunización y dos semanas después de la cuarta inmunización. En otro experimento, se evaluó la respuesta humoral mediada por CASB7439 a los LVL111, LVL168 o LVL144 en los ratones CB6f1 endógamos (Charles River, Senneville, QC, Canadá). Cincuenta ratones por grupo recibieron cuatro inmunizaciones intramusculares cada dos semanas con 10 microgramos de la proteína CASB7439 recombinante (LVL111, LVL168 o LVL144) formulada con AS15, o el AS15 solo como un grupo de control. Cada inmunización

contuvo 25 microlitros de la proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de una concentración 2X de adyuvante, como se describe en cualquier otra parte en la presente. Los ratones se sangraron dos semanas después de la
5 cuarta inmunización.

Las titulaciones de anticuerpos IgG1 e IgG2a anti-CASB7439 en suero se determinaron mediante ELISA, de acuerdo con los procedimientos convencionales. Dicho de una
10 manera breve, la proteína CASB7439 recombinante se recubrió en una placa de 96 pozos en suero regulado con fosfato (PBS). Después del bloqueo con albúmina de suero bovino al 1 por ciento en suero regulado con fosfato (PBS)-Tween (al 0.1 por ciento), el suero de los ratones inmunizados se incubó en las
15 placas durante una hora a 37°C. Después de lavar la placa, se agregó un anticuerpo de ratón marcado con anticuerpo de cabra anti-IgG1 o IgG2a-HRP específico (Southern Biotech Associates, Birmingham, AL, EUA) durante una hora a 37°C. Después de lavar la placa, se agregó un reactivo de sustrato
20 TMB (BD Pharmingen, Mississauga, ON, Canadá) durante 15 minutos. La reacción colorimétrica se interrumpió mediante la adición de ácido sulfúrico 1M. La OD se midió a 450 nanómetros utilizando un espectrofotómetro Spectramax (Molecular Devices,
25 Sunnyvale, CA, EUA). La titulación de anticuerpos se determinó

con una curva estándar, utilizando los anticuerpos de captura IgG, IgG1 o IgG2a en total específicos y un suero de ratón interno positivo para CASB7439.

La Figura 20/35 ilustra el análisis del transcurso del tiempo de las titulaciones de los anticuerpos IgG1 e IgG2a en el suero de los ratones inmunizados con CASB7439 (LVL111) formulados con cualquiera de AS01B o AS15. Los datos demuestran que AS15 desencadena una Th1 más alta (una proporción de IgG2a/IgG1 aproximadamente 10 veces más alta después de 4 inmunizaciones, comparándose con AS01B (IgG2a es un marcador subrogado de la respuesta inmunitaria tipo 1). Como se muestra en la Figura 21/35, la proteína CASB7439 formulada con AS15 desencadena una respuesta muy fuerte de los anticuerpos IgG1 e IgG2a en los ratones CB6f1 endógamos, cualquiera que sea la construcción utilizada (LVL111, LVL168 o LVL144).

Inmunogenicidad de CASB7439 en los Ratones: Respuesta Humoral Mediada por CASB7439 - Estudios en Ratones CD1

Se evaluó la respuesta humoral mediada por CASB7439 después de las inmunizaciones con CASB7439 (LVL111, LVL168 o LVL144) en los ratones CD1 exógamos (Charles River, Senneville, QC, Canadá). Diez ratones por grupo recibieron cuatro inmunizaciones intramusculares cada dos semanas con

10 microgramos de la proteína CASB7439 recombinante (LVL111, LVL168 o LVL144) formulada con AS15 (o AS15 solo como un grupo de control). Cada inmunización contuvo 25 microlitros de la proteína CASB7439 recombinante mezclados con 25 microlitros de una concentración 2X de adyuvante, como se describe en cualquier otra parte en la presente.

Dos semanas después de la cuarta inmunización, los ratones se sangraron, y se determinaron las titulaciones totales en suero de IgG anti-CASB7439 mediante un ELISA, como ya se describió. Los ratones CD1 inmunizados con diferentes construcciones de CASB7439 (LVL111, LVL168 o LVL144) desarrollan una respuesta inmunitaria humoral específica de CASB7439 muy fuerte (Figura 22/35). Los datos indican que se indujo una titulación total de IgG anti-CASB7439 de 8 a 10 veces más alta mediante el LVL144, comparándose con los LVL168 y LVL111, respectivamente, en los ratones exógamos CD1.

Ejemplo 11

Eficacia Anti-Tumoral de CASB7439 ASCI en los Ratones:

Desarrollo de Modelo de Tumor de Murino

Se desarrolló un modelo de tumor de murino que expresa la proteína CASB7439 utilizando células tumorales de murino TC-1 o células de cáncer colo-rectal de murino MC38 para

estudiar la protección de tumores *in vivo* mediada por CASB7439 en los ratones. Las células tumorales TC-1 fueron amablemente proporcionadas por T. C. Wu (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). Se generaron a partir de células primarias de pulmón de los ratones C57Bl/6 mediante la transferencia sucesiva de los genes E6 y E7 de HPV16, y un oncogén ras activado, como se describe anteriormente (Lin y colaboradores (1996) *Cancer Res. 1 de Enero*; 56(1): 21-6. Las células MC38, una línea celular de adenocarcinoma colo-rectal de murino, se adquirieron en ATCC (Manassas, VA).

Estas células se transfectaron establemente con una construcción que codificaba CASB7439 utilizando el reactivo transfectante no liposomal Eugene-6 (Roche, Mississauga, ON, Canadá), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Dicho de una manera breve, un plásmido (pcDNA3.1/Zeocina) que codificaba para la secuencia entera de la proteína CASB7439, y que contenía un gen de resistencia a Zeocina, se mezcló con Eugene-6, y se agregó encima de las células tumorales TC-1 o MC38 en un medio sin suero durante la noche. Después de la transfección, las células se dejaron recuperarse durante 24 horas en el medio de cultivo + suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10 por ciento. Las células entonces se cosecharon y se distribuyeron en placas de 96

pozos (50 microlitros de suspensión celular por pozo) para las diluciones limitantes. Después de la siembra de células, el medio fue reemplazado con el medio de cultivo + suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor al 10 por ciento que contenía
5 100 microgramos/ mililitro de Zeocina (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá). Después de la selección, cada clon se cosechó y se dejó crecer en placas de 24 pozos, y se congeló. La expresión del ARNm de CASB7439 en las células
10 TC1/CASB7439 y MC38/CASB7439 se verificó mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) en tiempo real, utilizando los cebadores y la sonda TaqMan específicos de CASB7439. Las reacciones en cadena de la polimerasa cuantitativas (qPCR) en tiempo real se llevaron a
15 cabo con un kit de reacción TaqMan utilizando una máquina TaqMan 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). La expresión de la proteína CASB7439 se evaluó mediante Western blot e inmunofluorescencia, utilizando un anticuerpo monoclonal específico anti-CASB7439 (40-12).

20 La población de células TC-1/CASB7439#14 no es completamente clónica sino que, más bien, está compuesta de cuando menos dos subclones diferentes. Por consiguiente, se hizo otro paso de dilución limitante con el objeto de generar una
25 población de células TC-1/CASB7439 completamente clónica:

las células TC-1/CASB7439#14-2.

Con el fin de determinar la dosis óptima de células TC-1 o MC38 para estimular el tumor en los ratones, se inyectaron diferentes dosis de las células (desde 1×10^5 hasta 2×10^6 células por ratón) en los ratones endógamos CB6f1. La dosis óptima se determinó en 2.5×10^5 células por ratón para los estímulos con TC-1/CASB7439#14 y TC1/CASB7439#14-2; se encontró que 1×10^5 células por ratón era óptimo para el estímulo con las células MC38/CASB7439#35.

Eficacia Anti-tumoral en los Ratones: Inmunizaciones y Experimentos de Estímulo

Se diseñó una serie de cuatro estudios (1.1-1.4) para evaluar la protección de tumores *in vivo* mediada por CASB7439. En términos generales, en cada uno de estos cuatro estudios, a los grupos de ratones CB6f1 se les dieron cuatro inmunizaciones intramusculares a intervalos de dos semanas, con diferentes dosis (0, 1, 10 ó 30 microgramos) de la proteína CASB7439 recombinante específica seleccionada para el estudio, formulada con cualquiera de AS01B o AS15 en una concentración final como se describe en cualquier otra parte de la presente, con un regulador de solución salina, con la proteína CASB7439 sola, o con los adyuvantes solos. Dos semanas después de la cuarta inmunización, los ratones CB6f1 se

estimularon mediante una inyección subcutánea con 250,000 células TC-1/CASB7439 #14, 100,000 células MC38/CASB7439#35 o 250,000 células tumorales TC-1/CASB7439 #14-2. Después del estímulo, el tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para cada ratón. De acuerdo con el protocolo, los ratones con tumores mayores de 200 mm² se sacrificaron. Entonces se graficaron las curvas de supervivencia.

Se llevaron a cabo tres estudios adicionales (2.1-2.4) para investigar dosis diferentes de 0, 1, 10 ó 30 microgramos de la proteína CASB7439 recombinante. El estudio 2.4 evaluó la correlación entre la inmunogenicidad y la protección de tumores de CASB7439 en los ratones C57Bl/6 machos y hembras; se evaluaron en paralelo los ratones CB6f1.

Los estudios 1.1-2.4 se describen con mayor detalle en seguida.

Estudio #1.1

Los Solicitantes investigaron la protección de tumores conferida por la inmunización con LVL111 (1 ó 10 microgramos) formulado con cualquiera de AS01B o AS15, contra un estímulo con TC1/CASB7439 #14 en los ratones CB6f1. Diez ratones por grupo se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces a intervalos de dos semanas con la proteína CASB7439

recombinante (LVL111) formulada con cualquiera de AS01B o AS15, en una concentración final como se describe en cualquier otra parte en la presente. También se probaron dos grupos de control inmunizados con cualquiera de un regulador de solución salina o la proteína CASB7439 sola. Dos semanas después de la cuarta inmunización, cada ratón se estimuló subcutáneamente con 250,000 células TC-1/CASB7439#14.

El crecimiento tumoral fue seguido durante 42 días, pero no se graficaron curvas de sobrevivencia debido a que se sacrificaron muy pocos ratones en el día 42. Sin embargo, se graficaron las curvas del crecimiento tumoral para cada grupo. La Figura 23/35, paneles superior e inferior, presenta las curvas del crecimiento tumoral obtenidas con las formulaciones de AS01B y AS15, respectivamente. (Nota: AS15 está mal identificado en esta Figura como "AS015".) Las curvas muestran que, en los ratones CB6f1 que recibieron la proteína CASB7439 formulada con cualquiera de AS01B o AS15, el crecimiento tumoral por TC1/CASB7439#14 es más lento.

Estudio #1.2

Los grupos de catorce ratones recibieron una dosificación diferente de LVL111 (1, 10 y 30 microgramos), o el control. Los ratones se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces a intervalos de dos semanas con las diferentes dosis de LVL111

formulado con cualquiera de AS01B o AS15, en una concentración final como se describe en cualquier otra parte en la presente. También se inmunizaron cuatro grupos de control con AS01B-solamente, AS15-solamente, regulador de solución salina-solamente, ó 30 microgramos de LVL111-solamente. Dos semanas después de la cuarta inmunización, cada ratón se estimuló subcutáneamente con 250,000 células TC-1/CASB7439#14. Después del estímulo, el tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para cada ratón. De acuerdo con el protocolo, los ratones con tumores mayores de 200 mm² se sacrificaron. Se trazó una curva de sobrevivencia.

Los resultados indican que los ratones inmunizados con LVL111 formulado con AS15 estuvieron mejor protegidos contra un estímulo tumoral de TC1/CASB7439#14 que los ratones inmunizados con el LVL111 formulado con AS01B. Los resultados óptimos en los ratones CB6f1 se obtuvieron con 10 microgramos de LVL111 formulado con AS15. Véase la Figura 24/35.

Estudio #1.3

Treinta y ocho ratones CB6f1 por grupo se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces a intervalos de dos semanas con 10 microgramos de LVL111, LVL168 o LVL144 formulados con AS15, en una concentración final como se describe en

cualquier otra parte en la presente. También se probó un grupo de control inmunizado con AS15 solo.

Dos semanas después de la cuarta inmunización, veintiocho ratones se estimularon subcutáneamente con 250,000 células TC-1/CASB7439#14 y los diez ratones restantes se estimularon subcutáneamente con 100.000 células MC38/CASB7439#35. Después del estímulo, se midió el tamaño de los tumores tres veces por semana para cada ratón. De acuerdo con el protocolo, los ratones con tumores mayores de 200 mm² se sacrificaron. Los resultados indican que los LVL111, LVL168 y LVL144 formulados con AS15, son todos protectores contra un estímulo con TC1/CASB7439#14 o con MC38/CASB7439#35. Véase la Figura 25/35.

Estudio #1.4

Sesenta y seis ratones CB6f1 por grupo se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces a intervalos de dos semanas, con 10 microgramos de los LVL168 o LVL144 formulados con AS15, en una concentración final como se describe en cualquier otra parte en la presente. También se probó un grupo de control inmunizado con AS15 solo.

Dos semanas después de la cuarta inmunización, veintidós ratones por grupo se estimularon subcutáneamente ya sea con 250,000 células TC-1/CASB7439#14 (población no clónica),

250,000 células TC-1/CASB7439#14-2 (población clónica), ó
100,000 células MC38/CASB7439#35. Después del estímulo, el
tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para
cada ratón. De acuerdo con el protocolo, los ratones con
5 tumores mayores de 200 mm² se sacrificaron. El estímulo con
TC1/CASB7439#14-2 pareció ser más agresivo que el estímulo
con TC1/CASB7439#14, como fue evidenciado por la muerte
más temprana de los ratones de control, y por la ausencia de un
10 efecto protector distinguishable en este estudio particular. Véanse
las Figuras 26/35. Los siguientes experimentos se llevaron a
cabo con la línea celular TC-1/CASB7439#14-2 más agresiva,
como se describe en cualquier otra parte en la presente.

Estudio #2.1

15 Quince ratones CB6f1 por grupo se inmunizaron
intramuscularmente cuatro veces con diferentes dosis
equimolares de cualquiera de LVL168 o LVL144 formulados con
AS15, en una concentración final como se describe en cualquier
otra parte en la presente. Para el LVL168, se utilizaron las
20 siguientes dosis de antígeno: 0.77, 1.5, 3.1 y 6.25 microgramos
por ratón. Para el LVL144, se utilizaron las siguientes dosis de
antígeno: 1.25, 2.5, 5 y 10 microgramos por ratón. También se
probó un grupo de control inmunizado con AS15 solo. Dos
25 semanas después de la cuarta inmunización, todos los ratones

se estimularon subcutáneamente con 250.000 células TC-1/CASB7439 #14-2 (población clónica). Después del estímulo, el tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para cada ratón. Los ratones con tumores mayores de 289 mm² (17 milímetros X 17 milímetros) se sacrificaron. Se trazaron las curvas de sobrevivencia para cada grupo. Véase la Figura 27/35, la cual ilustra las curvas de sobrevivencia obtenidas con las dosis equimolares de LVL168 y LVL144, formulados con AS15, después de un estímulo tumoral con TC1/CASB7439 #14-2. TF representa los ratones sin tumor. En comparación con el grupo de control con AS15, los cuatro conjuntos de dosis equimolares de LVL144 y LVL168 parecen inhibir el crecimiento tumoral de una manera similar en los ratones CB6f1.

Estudio # 2.2

Quince ratones C57Bl/6 por grupo se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces con diferentes dosis equimolares de LVL168 o LVL144 formulados con AS15, en una concentración final como se describe en cualquier otra parte en la presente. Para el LVL168, se utilizaron las siguientes dosis de antígeno: 0.77, 1.5, 3.1 y 6.25 microgramos por ratón. Para el LVL144, se utilizaron las siguientes dosis de antígeno: 1.25, 2.5, 5 y 10 microgramos por ratón. Como los grupos de control, los ratones también se inmunizaron con el AS15 solo, o con un

regulador. Dos semanas después de la cuarta inmunización, todos los ratones se estimularon subcutáneamente con 250.000 células TC-1/CASB7439 #14-2 (población clónica). Después del estímulo, el tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para cada ratón. Los ratones con tumores mayores de 289 mm² (17 milímetros X 17 milímetros) se sacrificaron. Se trazaron las curvas de sobrevivencia para cada grupo. Véase la Figura 28/35, la cual ilustra las curvas de sobrevivencia obtenidas con las diferentes dosis equimolares de LVL168 y LVL144, formulados con AS15, después de un estímulo tumoral con TC1/CASB7439 #14-2. TF representa los ratones sin tumor. En contraste con los estudios conducidos con los ratones CB6f1, en el presente estudio, no se observó ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la sobrevivencia de los ratones C57Bl/6 de los grupos inmunizados, el grupo con AS15, o el grupo con regulador.

Estudio # 2.3

Quince ratones CB6f1 por grupo se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces con diferentes dosis equimolares de LVL168 o LVL144 formulados con AS15, en una concentración final como se describe en cualquier otra parte en la presente. Para el LVL168, se utilizaron las siguientes dosis: 0.04, 0.19, 0.77, 1.5, 3.1 y 6.25 microgramos por ratón. Para el

LVL144, se utilizaron las siguientes dosis: 0.078, 0.31, 1.25, 2.5, 5 y 10 microgramos por ratón. También se probó un grupo de control inmunizado con AS15 solo. También se utilizaron ratones limpios como un segundo grupo de control. Dos
5 semanas después de la cuarta inmunización, todos los ratones se estimularon subcutáneamente con 250,000 células TC-1/CASB7439#14-2 (población clónica). Después del estímulo, el tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para
10 cada ratón. Los ratones con tumores mayores de 289 mm² (17 milímetros X 17 milímetros) se sacrificaron. Se trazaron las curvas de sobrevivencia para cada grupo. Véanse las Figuras 29/35 y 30/35, las cuales ilustran las curvas de sobrevivencia obtenidas con las diferentes dosis equimolares de LVL168 y
15 LVL144, formulados con AS15, después de un estímulo tumoral con TC1/CASB7439 #14-2. TF representa los ratones sin tumor.

Las dos dosis equimolares más bajas probadas no parecieron inhibir de una manera significativa el crecimiento
20 tumoral. En las cuatro dosis más altas, se observó mayor protección de tumores en los ratones inmunizados con LVL168 más AS15, comparándose con el LVL144 más AS15.

Estudio # 2.4

Se investigó adicionalmente la falta de protección
25 observada en los ratones C57Bl/6 inmunizados con CASB7439

formulado con AS15 contra un estímulo tumoral con TC1/CASB7439 #14-2, como se observó en el estudio # 2.2. Quince ratones CB6f1 o C57Bl/6 por grupo se inmunizaron intramuscularmente cuatro veces con 1 microgramo de LVL168
5 formulado con AS15, en una concentración final como se describe en cualquier otra parte en la presente. Los grupos de ratones machos y hembras inmunizados con 1 microgramo de LVL168 + AS15 se estudiaron por separado. También se
10 probaron grupos de ratones machos y hembras de control separados inmunizados con AS15 solo.

Se obtuvieron sangrías parciales 7 días después de la cuarta inmunización, y se determinaron las titulaciones de anticuerpo de IgG anti-CASB7439 total en suero mediante un
15 ELISA, como se describe en el Ejemplo 10. Se obtuvieron respuestas de células-T CD4 específicas de CASB7439 similares (aproximadamente 1×10^6 nanogramos/mililitro de IgG total) en los ratones CB6f1 tanto machos como hembras, inmunizados con LVL168 + AS15; no se detectó respuesta
20 alguna al anticuerpo en los ratones C57Bl/6. Véase la Figura 33/35.

Se obtuvieron sangrías parciales 14 días después de la cuarta inmunización. Las respuestas de células-T CD4 y CD8
25 (IFN γ y TNF α doblemente positivos) se midieron mediante

teñido intracelular y análisis de citometría de flujo, como se describe en el Ejemplo 10, después de que se volvieron a estimular los PBLs a partir de cualquiera de los ratones CB6f1 o C57Bl/6 (5 reservas de 3 ratones por grupo) con una reserva de péptidos que cubrían la secuencia de CASB7439 entera. En adición, el péptido 39 (SEQ ID NO: 91) se probó con los PBLs a partir del C57Bl/6. Se obtuvieron respuestas de células-T CD4 específicas de CASB7439 (frecuencia de aproximadamente el 0.1 por ciento) en los ratones CB6f1, tanto machos como hembras, inmunizados con LVL168 + AS15; se obtuvo una respuesta de células-T CD8 específica de CASB7439 (frecuencia del 0.05 por ciento) solamente en los ratones machos. Véanse las Figuras 34/35 y 35/35, paneles superiores. No se detectó respuesta alguna de células-T CD4 ó CD8 específica de CASB7439 en los ratones C57Bl/6 inmunizados con 1 microgramo de LVL168 + AS15 después de volver a estimular los PBLs con una reserva de péptidos que cubrían la secuencia de CASB7439 entera o el péptido 39 de CASB7439 (SEQ ID NO: 91) (aminoácidos 153 a 167 de la SEQ ID NO: 13). Véanse las Figuras 34/35 y 35/35 (paneles inferiores). Observe que el péptido 39 de CASB7439 (SEQ ID NO: 91) se utilizó aquí de una manera independiente, debido a que anteriormente se había identificado como un péptido inmunogénico de células-T

CD4 bajo en los esplenocitos de los ratones C57Bl/6 inmunizados cuatro veces con 10 microgramos de LVL168 + AS15. Véase la Figura 13 en el Ejemplo 10.

5 Dos semanas después de la cuarta inmunización, todos los ratones se estimularon subcutáneamente con 250,000 células TC-1/CASB7439#14-2. Después del estímulo, el tamaño de los tumores se midió tres veces por semana para cada ratón. Los ratones con tumores mayores de 289 mm² (17 milímetros X 17 milímetros) se sacrificaron. Se trazaron las curvas del crecimiento tumoral y de supervivencia para cada grupo. Las 10 Figuras 31/35 y 32/35 ilustran, respectivamente, las curvas del crecimiento tumoral y de supervivencia obtenidas con los ratones CB6f1 o C57Bl/6 machos y hembras inmunizados con 1 microgramo de LVL168 o LVL144, formulados con AS15, 15 después de un estímulo tumoral con TC1/CASB7439 #14-2. Los resultados indican que el CASB7439 + AS15 tiende a proporcionar un crecimiento tumoral más lento y una mejor supervivencia en los ratones CB6f1 machos, comparándose con 20 los ratones CB6f1 hembras, pero que no tiene efecto alguno sobre la protección de tumores en los ratones C57Bl/6. La falta de protección de tumores del CASB7439 en los ratones C57Bl/6 corresponde a la ausencia de células-T CD4 y CD8 específicas 25 de CASB7439 detectables, así como a la ausencia de una

respuesta de anticuerpo específica de CASB7439 detectable en los ratones C57Bl/6. Esto indica que, bajo las condiciones experimentales empleadas, los ratones C57Bl/6 no son un modelo de ratón ideal para estudiar la inmunogenicidad y la protección de tumores por parte del CASB7439. Por otra parte, en los ratones CB6f1, la protección de tumores del CASB7439 observada corresponde a la presencia significativa de células-T CD4 específicas de CASB7439 [véanse los péptidos inmunogénicos 7-8 (aminoácidos 25 a 43 de la SEQ ID NO: 13), y 23-24 (aminoácidos 89 a 107 de la SEQ ID NO: 13) Figura 13/35, Ejemplo 10] y de células-T CD8 específicas de CASB7439, así como a la respuesta del anticuerpo específica de CASB7439.

SECUENCIAS:**SEQ ID NO: 1**

Proteína LVL055

5 MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMDGGTLPRSAPPAPPVPVGC
AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
KLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAE
HDAVRNALA

SEQ ID NO: 2

10 ADN DE LVL055

atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
gacaagcatatggatggtggcaccctgccgcgtagcgctccgcggcaccgccggttc
cggttggttgctgcggcgctcgtcgtccggcgagcccggaactgctgcgttcagccgctc
gtcgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttgcgcgtcgtaa
15 cgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgctgcgtcagc
atgtgccgcatggcggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctgcgtagcg
cggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtgcgtaacg
cgctggcctaa

SEQ ID NO: 3

20

Proteína LVL111

MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMDGGTLPRSAPPAPPVPVGC
AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
KLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAE
25 HDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSGC

EGALSPAERELLDFFSSWLGGYHHHHH

SEQ ID NO: 4

ADN de LVL111

5 atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
gacaagcatatggatgggtggcaccctgccgcgtagcgcaccgccggctccgccggttc
cggttggttgctgcggcgcgctcgtcgtccggcgagcccggaaactgctgcgttcagccgtc
gtcgccgtccggccaccgcggaaaccgggtgggtggcgccagcgggtgcgcgtcgtaa
cgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactgggtgaacctgggctttcaggcgctgcgtcagc
10 atgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaacctgcgtagcg
cggtggaatatattcgtgcgtgcaacgtctgctggccgaacatgatgcgggtgcgtaacg
cgctggccgggtggtctgcgtccgcaggcgggttcgtccgagcgcgccgcgtggtagc
agcgaaccgggtagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcggctgcgaaggt
gccctgagcccggcggaacgtgaactgctggattttagcagctggctgggcggctatcat
15 catcatcaccatcattaa

SEQ ID NO: 5

Proteína LVL137

MGHHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMDGGTLPRSAPPAPPVPVGC
20 AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
KLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAE
HDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSGC
EGALSPAERELLDFFSSWLGGY

SEQ ID NO: 6

25 ADN de LVL137

atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
 gacaagcatatggatggtggcaccctgccgcgtagcgcaccgccggctccgccggttc
 cggttggttgtgcggcgcgctcgtcgtccggcgagcccggaaactgctgcgttcagccgtc
 gtgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttgcgcgtcgtaa
 5 cgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgctgcgtcagc
 atgtgccgcatggcggtgcgagcaaaaaactgagcaaaagtggaaacctgcgtagcg
 cgggtggaatatattcgtgcgtcgaacgtctgctggccgaacatgatgcggtgcgtaacg
 cgctggccggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcgcgcgcgtggtggtagc
 10 agcgaaccgggtagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcggctgcgaaggt
 gccctgagcccggcggaacgtgaactgctggatttttagcagctggctgggcggctattaa

SEQ ID NO: 7

Proteína LVL141

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQA
 15 QADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGR
 YYVIDFTLKEIQSLEMTENFETAAAHMDGGTLPRSAPPAPPVPVG
 CAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNR
 VKLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLA
 20 EHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSG
 CEGALSPAERELDFSSWLGGYHHHHHH

SEQ ID NO: 8

ADN de LVL141

atggatccaagcagccattcatcaaatatggcgaatacccaaataaaatcagacaaaa
 25 tcattattgctcaccgtggtgctagcgggtatttaccagagcatagcttagaatctaaagca

cttgcgtttgcacaacaggctgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggtc
 gtttagtggttattcacgatcacttttagatggcttgactgatgttgcgaaaaattcccaca
 tcgtcatcgtaaagatggccgttactatgtcatcgactttaccttaaagaaattcaaagttt
 agaaatgacagaaaaactttgaaaccgcggccgcacatatggatggcggcaccctgccg
 5 cgtagcgcaccgccggctccgccggttccggttggttgcgggcgcgctcgtcgtccggcg
 agccccggaactgctgcttgagccgtcgtcgcggtccggccaccgcggaaaccggtg
 gtggtgcggcagcgggtgcgcgtcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtg
 aacctgggctttcaggcgctgcgtcagcatgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaact
 10 gagcaaagtggaaacctgcgtagcgcggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgc
 tggccgaacatgatgcggtgcgtaacgcgctggccggtggtctgcgtccgcaggcggtt
 cgtccgagcgcgcgcgctggtggtagcagcgaaccgggtagcccgctagcgcctata
 gcagcgatgatagcggctgcgaagggtgccctgagccccggcggaacgtgaactgctgg
 atttagcagctggctgggcggtatcatcatcatcaccatcattaa

15 **SEQ ID NO: 9**

Proteína LVL144

MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQA
 QADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGR
 20 YYVIDFTLKEIQSLEMTENFETDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARR
 RPASPELLRCSRRLRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNL
 GFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRS AVEYIRALQRLLAEHDAVR
 NALAGGLRPQAVRPSAPRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALS
 PAERELDFSSWLGGYHHHHHH

25 **SEQ ID NO: 10**

ADN de LVL144

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgaatacccaaataaaatcagacaaaa
 tcattattgctcaccgtggtgctagcgggtatttaccagagcatacgttagaatctaaagca
 cttgcgtttgcacaacaggctgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggc
 5 gtttagtggttattcacgatcacttttagatggcttgactgatgttgcaaaaaattcccaca
 tcgtcatcgtaaagatggcggttactatgtcatcgactttaccttaaaagaaattcaaagttt
 agaaatgacagaaaaactttgaaaccgatgggtggcacccctgccgcgtagcgcaccgccg
 gctccgccgggtccgggtggttggtgctggcgcgctcgctccggcgagcccgggaactgctg
 10 cgttgacagccgctcgctcgccgtccggccaccgcggaaaccgggtggtggtgcggcagcgg
 ttgcgcgctcgtaacgaacgtgaacgtgaacccgtgtgaaactggtgaacctgggcttcagg
 cgctgcgtcagcatgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaa
 ccctgcgtagcgcgggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatg
 cgggtgcgtaacgcgctggccgggtggtctgcgtccgcaggcgggttcgtccgagcgcgccg
 15 cgtggtggttagcagcgaaccgggtagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcg
 gctgcgaaggtgccctgagcccggcggaacgtgaactgctggattttagcagctggctg
 ggccggtatcatcatcatcaccatcattaa

SEQ ID NO: 11

Proteína LVL168

20 MHHHHHHHHHDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLR
 CSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQH
 VPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLR
 PQAVRPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLDF
 25 SSWLGGY

SEQ ID NO: 12

ADN de LVL168

atgcatcatcatcatcatcatcatcatcatcatgacgggtggcaccctgccgcgtagcgca
ccgccggctccgccggttccgggttggttgcgccgcgctcgctcgccggcgagcccgga
5 actgctgcgttgagccgctcgctcgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcgg
cagcgggtgcgcgctgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggc
tttcaggcgctgcgtcagcatgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagt
ggaaaccctgcgtagcgcggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaac
10 atgatgcgggtgcgtaacgcgctggccggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagc
gcgccgcgctggtggttagcagcgaaccgggtagcccgcgtagcgccatatagcagcgatg
atagcggctgcgaaggtgccctgagcccggcggaacgtgaactgctggattttagcagc
tggtggggcggtattaa

SEQ ID NO: 13

15 Número de Acceso AAB86993, Proteína HASH2
MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAE
TGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLS
KVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG
PPGTTTPVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGA
20 LSPAERELLD FSSWLGGY

SEQ ID NO: 14

ADN de HASH2

atggacggcggcacactgcccagggtccgcgccccctgcgccccccgtccctgtcggct
25 gcgctgcccggcgagacccgcgtccccggaactgttgcgctgcagccggcgggcggc

gaccggccaccgcagagaccggaggcggcgcagcggccgtagcgcgggcgaatga
 gcgcgagcgcaaccgcgtgaagctggtgaacttgggcttccaggcgctgcggcagcac
 gtgccgcacggcggcgccagcaagaagctgagcaaggtggagacgctgcgctcagc
 cgtggagtacatccgcgcgtgcagcgcctgctggccgagcacgacgccgtgcgcaac
 5 gcgctggcgggagggtgaggccgcaggccgtgcggccgtctgcgccccgcgggccc
 ccagggaaccaccccggtcgccgcctcgccctcccgcgcttcttcgtccccgggcccgcg
 gggcagctcggagcccggctccccgcgttccgcctactcgtcggacgacagcggctgc
 gaaggcgcgctgagtcctgcggagcgcgagctactcgacttctccagctggttaggggg
 10 ctactga

SEQ ID NO: 15

Proteína LVL007

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMDGGTLPRSAPPAPPVLVGC
 AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
 15 KLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAE
 HDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGR
 GGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLD FSSWLGGY

SEQ ID NO: 16

ADN de LVL007

20 atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
 gacaagcatatggacggcggcacactgcccagggtccgcgccccctgcgccccccgtcc
 ttgtcggctgcgctgcccggcggagaccgcgtccccggaactgttgcgctgcagccgg
 cggcggcgaccggccaccgcagagaccggaggcggcgcagcggccgtagcgcggc
 25 gcaatgagcgcgagcgcaaccgcgtgaagctggtgaacttgggcttccaggcgctgcg

gcagcacgtgccgcacggcggcgccagcaagaagctgagcaaggtggagacgctgc
gctcagccgtggagtacatccgcgcgctgcagcgctgctggccgagcacgacgccgt
gcgcaacgcgctggcgggagggctgaggccgcaggccgtgcggccgtctgcgccccg
cgggccgcccagggaaccaccccggtcgccgcctcgccctccgcgcttcttctgccccg
5 gccgcgggggcagctcggagcccggtccccgcgttccgcctactcgtcggacgacag
cggctgcgaaggcgcgctgagtcctgcggagcgcgagctactcgacttctccagctggt
tagggggctactga

SEQ ID NO: 17

10 Proteína LVL010

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDKHMDGGTLPRSAPPAPPVPVGC
AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
KLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAE
HDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGR
15 GGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGY

SEQ ID NO: 18

ADN de LVL010

atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
20 gacaagcatatggacggcggcacactgcccagggtccgcgccccctgcgcccccgctcc
ctgtcggctgcgctgcccggcggagaccgcgtccccggaactgttgcgctgcagccg
gcggcggcgaccggccaccgcagagaccggaggcggcgcagcggccgtagcgcg
cgcaatgagcgcgagcgcaaccgcgtgaagctggtgaactgggcttccaggcgctgc
ggcagcacgtgccgcacggcggcgccagcaagaagctgagcaaggtggagacgctg
25 cgctcagccgtggagtacatccgcgcgctgcagcgctgctggccgagcacgacgccg

tgcgcaacgcgctggcgggagggctgaggccgcaggccgtgcggccgtctgcgccc
gcgggccgccagggaaccaccccggtcgccgcctcgccctcccgcgcttcttgcgtccccg
ggccgcgggggagctcggagcccggctccccgcgttcgcgcctactcgtcggacgaca
gcggctgcgaaggcgcgctgagtcctgcggagcgcgagctactcgacttctccagctgg
5 ttagggggctactga

SEQ ID NO: 19

Proteína LVL060

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMDGGTLPRSAPPAPPVPVGC
10 AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
KLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRS AVEYIRALQRLLAE
HDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGR
GGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLD FSSWLGGY

SEQ ID NO: 20

15 ADN de LVL060

atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
gacaagcatatggatggtggcaccctgccgcgtagcgctccgccggcaccgccggttc
cggttggttgctgcggcgcgctcgctcgctccggcgagcccggaaactgctgcgttcagccgctc
20 gtcgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttcgcgctcgtaa
cgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggcttccaggcgctgcgtcagc
atgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaacctgcgtagcg
cggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtgcgtaacg
cgctggccgggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcaccgcgtggtccgccg
25 ggtacgacgcgggttcagcgagcccagccgtgcgagcagctctccgggtcgtggtg

gtagcagcgaaccgggtagcccgctagcgcctatagcagcgatgatagcggctgcg
aaggtgccctgtctccggcggaacgtgaactgctggattttagcagctggctgggcggct
attaa

SEQ ID NO: 21

5

Proteína Const-1

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMATAETGGGAAAVARRNERE
RNRVKLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQR
LLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASS
10 SPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWL
GYLEDPAANKARKEAELAAATAEQ

SEQ ID NO: 22

ADN de Const-1

15

atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
gacaagcatatggccaccgcggaaccgggtggtggtgcggcagcgggtgcgcgtcgta
acgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgctgcgtcag
catgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaacctgcgtagc
gcggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcgggtgcgtaac
20 gcgctggccgggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcaccgcgtggtccgcc
gggtacgacgccggttcagcgcagcccgagccgtgcgagcagctctccgggtcggtgt
ggtagcagcgaaccgggtagcccgctagcgcctatagcagcgatgatagcggctgc
gaaggtgccctgtctccggcggaacgtgaactgctggattttagcagctggctgggcggc
tatctcgaggatccggctgctaacaagcccgaaaggaagctgagttggctgctgccac
25 cgctgagcaataa

SEQ ID NO: 23

Proteína LVL056

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMNRVKLVNLGFQALRQHVP
GGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQA
5 VRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSS
DDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGY

SEQ ID NO: 24

ADN de LVL056

10 atgggccatcatcatcatcatcatcatcacagcagcgccatatcgacgacgac
gacaagcatatgaaccgtgtgaaactggtgaacctgggcttcaggcgctgcgtcagca
tgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaacctgcgtagcgc
ggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtgcgtaacgc
gctggccggtggtctgcgtccgcaggcgggttcgtccgagcgcaccgcgtggtccgccgg
15 gtacgacgccggttcagcgcgagcccgagccgtgcgagcagctctccgggtcgtggtgg
tagcagcgaaccgggtagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcggctgcga
aggtgccctgtctccggcggaacgtgaactgctggatttagcagctggctgggcggcta
ttaa

SEQ ID NO: 25

20

Proteína LVL057

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKHMAAAVARRNERERNRVKLVN
LGFQALRQHVP
GGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAV
RNALA

25

SEQ ID NO: 26

ADN de LVL057

atgggccatcatcatcatcatcatcatcatcacagcagcggccatatcgacgacgac
gacaagcatatggcggcagcgggtgcgcgtcgtaacgaacgtgaacgtaacgtgtga
aactggtgaacctgggcttcaggcgcgtgcgtcagcatgtgccgcatggcgggtgcgagc
5 aaaaaactgagcaaagtggaaaccctgcgtagcgcgggtggaatatattcgtgcgcgtgc
aacgtctgctggccgaacatgatgcgggtgcgtaacgcgcgtggcctaa

SEQ ID NO: 27

Proteína LVL088

10 MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAE
TGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLS
KVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG
GSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLD FSSWLGGYHHH
HHH

15 **SEQ ID NO: 28**

ADN de LVL088

atggatggtggcaccctgccgcgtagcgcaccgccggctccgccgggtccgggttggtgt
gcggcgcgtcgtcgtccggcgcgagcccggaaactgctgcgttcagccgctcgtcgcgcgtcc
20 ggccaccgcggaaaccgggtggtggtgcggcagcgggtgcgcgtcgtaacgaacgtga
acgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggcttcaggcgcgtgcgtcagcatgtgccgca
tggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctgcgtagcgcgggtggaata
tattcgtgcgcgtgcaacgtctgctggccgaacatgatgcgggtgcgtaacgcgcgtggccgg
tggtctgcgtccgcaggcgggttcgtccgagcgcgcgcgcgtgggtggtagcagcgaaccg
25 ggtagcccgctagcgcctatagcagcgatgatagcggctgcgaagggtgcctgagcc

cggcggaacgtgaactgctggatttagcagctggctggcggtatcatcatcacc
atcattaa

SEQ ID NO: 29

Proteína LVL016

5 MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQA
QADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGR
YYVIDFTLKEIQSLEMTENFETAAMDGGTLPRSAPPAPPVPVGC
AARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRV
10 KLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAE
HDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTPVAASPSRASSSPGR
GGSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGYLEH
HHHHH

SEQ ID NO: 30

15 ADN de LVL016

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgaatacccaaatgaaatcagacaaaa
tcattattgctcaccgtggtgctagcgggtattaccagagcatagcttagaatctaaagca
cttgcgtttgacacacaggctgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggtc
20 gtttagtggttattcacgatcacttttagatggcttgactgatgttgcgaaaaattcccaca
tcgtcatcgtaaagatggccgttactatgtcatcgactttaccttaaaagaaattcaaagtt
agaaatgacagaaaactttgaaaccgcggccgcaatggatggtggcaccctgccgcgt
agcgctccgccggcaccgccggttcgggttggtgtgcggcgcgctcgctcgccggcgag
cccggaaactgctgcgttgagccgtcgctcgccgtccggccaccgcggaaaccggtggt
25 ggtgcggcagcggttgcgcgctcgtaacgaacgtgaacgttaaccgtgtgaaactggtga

acctgggctttcaggcgctgcgtcagcatgtgccgcatggcgggtgcgagcaaaaaactg
 agcaaagtggaaaccctgcgtagcgcggtggaatatattcgtgcgtgcaacgtctgct
 ggccgaacatgatgcgggtgcgtaacgcgctggccgggtggtctgcgtccgcaggcggttc
 gtccgagcgcaccgcgtggtccgccgggtacgacgccggttcagcgcgagcccgagcc
 5 gtgcgagcagctctccgggtcgtggtggttagcagcgaaccgggtagcccgcgtagcgc
 ctatagcagcgaatgatagcggctgcgaaggtgccctgtctccggcggaacgtgaactgc
 tggatttttagcagctggctgggcggctatctcgagcaccaccaccaccaccactga

SEQ ID NO: 31

10 Proteína LVL018

MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAE
 TGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLS
 KVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG
 PPGTTPVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGA
 15 LSPAERELDFSSWLGGYLEHHHHHH

SEQ ID NO: 32

ADN de LVL018

atggatggtggcaccctgccgcgtagcgctccgccggcaccgccggttcgggttggtgt
 20 gcggcgcgctcgtcgtccggcgagcccggaactgctgcgttcagccgctcgtgccgtcc
 ggccaccgcggaaaccgggtggtggtgcggcagcggttcgcgctcgtaacgaacgtga
 acgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgctgcgtcagcatgtgccgca
 tggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctgcgtagcgcggtggaata
 tattcgtgcgtgcaacgtctgctggccgaacatgatgcgggtgcgtaacgcgctggccgg
 25 tggctcgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcaccgcgtggtccgccgggtacgacgc

cggttcagcgagcccgagccgtgagcagctctccgggtcgtggtgtagcagcga
 accgggtagcccgctagcgcctatagcagcgatgatagcggctgcgaagggtgccctg
 tctccggcggaacgtgaactgctggatttttagcagctggctgggcggctatctcgagcac
 caccaccaccactga

5

SEQ ID NO: 33

Proteína LVL138

MHHHHHDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRR
 RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHG
 GASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAV
 RPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLDFFSSWL
 GGY

10

SEQ ID NO: 34

ADN de LVL138

15

atgcaccatcaccatcaccatgatggtggcaccctgccgcgtagcgcaccgccggctcc
 gccggttcgggttggttgctgcggcgcgctcgctccggcgagcccggaactgctgcgttg
 cagccgctcgctccgctccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttgcg
 cgctcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgct
 gcgtcagcatgtgccgcatggcggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccct
 gccgtagcgcggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggt
 gcgtaacgcgctggccggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcgccgcgtg
 gtggtagcagcgaaccgggtagcccgctagcgcctatagcagcgatgatagcggctg
 cgaagggtgccctgagcccgcggaacgtgaactgctggatttttagcagctggctgggcg

20

25

gctattaa

SEQ ID NO: 35

ADN enlazador modificado

atgcatcatcatcatcatcatgac

SEQ ID NO: 36

5

ADN enlazador no modificado

atgcaccatcacatcacatgat

SEQ ID NO: 37

Proteína LVL160

10

MHHHHHHDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRR
 RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHG
 GASKKLSKVETLRSAYEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAV
 RPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLDFFSSWL
 GGY

15

SEQ ID NO: 38

ADN de LVL160

20

atgcatcatcatcatcatcatgacggtggcaccctgccgcgtagcgcaccgccggctcc
 gccggttcgggttggttggtgcggcgcgctcgctccggcgagcccgggaactgctgcgttg
 cagccgctcgctgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttgcg
 cgctcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgct
 gcgtcagcatgtgccgcattggcggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccct
 gcgtagcgcggtggaatatattcgctgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggt
 gcgtaacgcgctggccggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcgccgcgtg
 gtggtagcagcgaaccgggttagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcggctg

25

cgaaggtgccctgagcccggcggaacgtgaactgctggattttagcagctggctgggcg
gctattaa

SEQ ID NO: 39

Proteína 1/3pD

5 MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQA
QADYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGR
YYVIDFTLKEIQSLEMTENFET

SEQ ID NO: 40

10 ADN de 1/3pD

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgaatacccaaatgaaatcagacaaaa
tcattattgctcaccgtggtagcggttattaccagagcatacgttagaatctaaagca
cttgcgttgcacaacaggctgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggc
gttagtggttattcagatcacttttagatggcttgactgatgttgcaaaaaattcccaca
15 tcgtcatcgtaaagatggccgttactatgtcatcgactttaccttaaaagaaattcaaagtt
agaaatgacagaaaactttgaaacc

SEQ ID NO: 41

H. influenzae - Proteína D

20 MKLKTALSLAAGVLAGCSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASG
YLPEHTLESKALAFQAQADYLEQDLAMTKDGRLVVIHDHFLDGLT
DVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETKDQKQAQV
YPNRFPLWKSHFRIHTFEDEIEFIQGLEKSTGKKVGIYPEIKAPWF
HHQNGKDIAAETLKVLLKKGDKKTDMMVYLQTFDFNELKRIKTELL
25 PQMGMDLKLVLQIAYTDWKETQEKDPKGYWVNYNDWMFKPGA

MAEVLKYADGVGPGWYMLVNKEESKPDNIVYTPLVKELAQYNVE
VHPYTVRKDALPEFFTDVNQMYDALLNKSGATGVFTDFPDTGVE
FLKGIK

SEQ ID NO: 42

5 Marca de poli-histidina larga

MGHHHHHHHHHSSGHIDDDDKH

SEQ ID NO: 43

Proteína LVL090

10 MDPSSHSSNMANTQMKSDKIIAHRGASGYLPEHTLESKALAFQA
QADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLTDVAKKFPHRHRKDGR
YYVIDFTLKEIQSLEMTENFETKDGGKQAQVYPNRFPLWKSHFRIH
TFEDEIEFIQGLEKSTGKKVGIYPEIKAPWFHHQNGKDIAAETLKV
LKKYGYDKKTDMMVYLQTFDFNELKRIKTELLPQMGMMDLKLVLQIA
15 YTDWKETQEKDPKGYWVNNYDWMFKPGAMAEVLKYADGVGP
GWYMLVNKEESKPDNIVYTPLVKELAQYNVEVHPYTVRKDALPAF
FTDVNQMYDVLLNKSGATGVFTDFPDTGVEFLKGIKAAAMDGGT
LPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGA
AAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPFHGGASKKLSKVETLR
20 SAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTT
PVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAE
RELLDFSSWLGGYLEHHHHHHH

SEQ ID NO: 44

25 ADN de LVL090

atggatccaagcagccattcatcaaataatggcgaatacccaaatagaatcagacaaaa
 tcattattgctcacggtggtgctagcgggtatttaccagagcatacgttagagtctaaagca
 cttgcgtttgcacaacaggctgattatttagagcaagatttagcaatgactaaggatggtc
 gtttagtggttattcacgatacacttttagatggcttgactgatgttgcgaaaaattcccaca
 5 tcgtcacgtaaaagatggctggttactatgtcatcgactttaccttaaaagaaattcaaagttt
 agaaatgacagaaaaactttgaaaccaagatggcaaacaagcgcaagttatcctaata
 cgttcccactttggaatacacattttagaattcatacctttgaagatgaaattgaatttatcc
 aaggcttagaaaaatccactggcaaaaaagtagggatttatccagaaatcaaagcacc
 10 ttggttccaccatcaaaaatggtaaagatatgtgctgaaacgctcaaagtgtaaaaaa
 atatggctatgataagaaaaccgatatggtttacttacaaaactttcgattttaatgaattaaa
 acgtatcaaaacggaattacttccacaaatgggaatggattgaaattagttcaattaattg
 cttatacagattggaaagaaacacaagaaaaagacccaaagggttattgggtaaacta
 taattacgattggatgtttaaacctggtgcaatggcagaagtggttaaataatgccgatggt
 15 gttggcccagggttggtatatgttagttaataaagaagaatccaaacctgataatattgtgta
 cactccgttggtaaaagaacttgcaaatataatgtggaagtgcataccttacaccgtgcgt
 aaagatgcactacccgcggttttcacagacgtaaatcaaatagtatgatgtctattgaataa
 atcaggggcaacagggtgtatttactgatttcccagatactggcgtggaattcttaaaggga
 ataaaagcggccgcaatggatggtggcacccctgccgcgtagcgctccgccggcaccg
 20 ccggttccggttggttgtgcggcgcgctcgctccggcgagcccggaactgctgcgttgc
 agccgtcgctcgccgtccggccaccgcggaaccggtggtggtgcggcagcggttgcgc
 gtcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgctg
 cgtcagcatgtgccgatggcgggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaacctg
 25 cgtagcgcggtggaatatattcgctgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtg

cgtaacgcgctggccggtggtctgcgtccgcaggcgggtcgtccgagcgcaccgcgtgg
 tccgccgggtacgacgccggtgcagcgagcccagaccgtgcgagcagctctccgggt
 cgtggtggtagcagcgaaccgggtagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcg
 gctgcgaagggtgccctgtctccggcggaacgtgaactgctggatttttagcagctggctgg
 5 gcggtatctcgagcaccaccaccaccac

SEQ ID NO: 45

Proteína LVL112

MGHHHHHHGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIF
 10 FKI KKT TPL RRL MEAF AKR QGK EMDSL RFL YDG IRIQ ADQ APEDL
 DMEDNDIIEAHREQIGGDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPAS
 PELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQA
 LRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALA
 GGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGRGGSSEPGS
 15 PRSAYSSDDSGCEGALSPAERELLD FSSWLGGY

SEQ ID NO: 46

ADN de LVL112

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtcggactcagaagtcaatcaagaagctaagcc
 20 agagggtcaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatttaaagggtgtccgatggat
 cttcagagatcttctcaagatcaaaaagaccactcctttaagaaggctgatggaagcgtt
 cgctaaaagacagggttaaggaaatggactccttaagattctgtacgacgggtattagaat
 tcaagctgatcaggcccctgaagatttgacatggaggataacgatattattgaggctca
 ccgcgaacagattggagggtgatggtggcaccctgccgcgtagcgctccgccggcaccg
 25 ccggttccggttggttgtgcggcgcgctcgtcgtccggcgagcccgggaactgctgcgttgc

agccgctcgtcgccgctccggccaccgcggaaccggtggtggtgcggcagcgggtgcgc
gtcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgctg
cgtcagcatgtgccgcatggcggtagcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctg
cgtagcgcggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtg
5 cgtaacgcgctggccgggtggtctgcgtccgcaggcgggttcgtccgagcgcaccgcgtgg
tccgccgggtacgacgccggttgacgcgagcccgagccgtgcgagcagctctccgggt
cgtggtggttagcagcgaaccgggttagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcg
gctgcgaagggtgccctgtctccggcggaacgtgaactgctggatttttagcagctggctgg
10 gcggctat

SEQ ID NO: 47

Proteína LVL113

MGHHHHHHGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIF
FKIKKTTPLRRLMEAFKRQ GKEMDSLRF LYDGIRIQADQAPEDL
15 DMEDNDIIEAHREQIGGDPSSHSSNMANTQMKSDKIIIAHRGASG
YLPEHTLESKALAF AQQADYLEQDLAMTKDGRLLVVIHDHFLDGLT
DVAKKFPHRHRKDGRYYVIDFTLKEIQSLEMTENFETAAMDGGT
LPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGA
AAVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVP HGGASKKLSKVETLR
20 SAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTT
PVAASPSRASSSPGRGGSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAE
RELLDFSSWLGGY

SEQ ID NO: 48

25 ADN de LVL113

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtcggactcagaagtcaatcaagaagctaagcc
 agaggtaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatttaaagggtgtccgatggat
 cttcagagatcttcttcaagatcaaaaagaccactcctttaagaaggctgatggaagcgtt
 cgctaaaagacagggtaaggaaatggactccttaagattcttgtacgacgggtattagaat
 5 tcaagctgatcaggccccctgaagatttgacatggaggataacgatattattgaggctca
 ccgcgaacagattggagggtgatccaagcagccattcatcaaatatggcgaatacccaa
 atgaaatcagacaaaatcattattgctcaccgtgggtgctagcgggtatttaccagagcata
 cgtagaatctaaagcacttgcggttgacacacaggctgattatttagagcaagatttagc
 10 aatgactaaggatggctcggttagtggttattcacgatcacttttagatggcttgactgatgtt
 gcgaaaaaattcccacatcgatcatgtaaagatggccgttactatgtcatcgactttacctt
 aaaagaaattcaaagtttagaaatgacagaaaactttgaaaccgcggccgcaatggat
 ggtggcaccctgccgcgtagcgcctccgcggcaccgcgggttccgggttggtgtgcggc
 gcgtcgctcgccggcgagccccggaactgctgcgttgacgcgcgtcgccgctccggcca
 15 ccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcgggtgcgcgtcgtaacgaacgtgaacgtaa
 ccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgcgtcgctcagcatgtgccgatggcgg
 tgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctgcgtagcgcgggtggaatatattcgt
 gcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcgggtgcgtaacgcgcgtggccgggtggtct
 20 gcgtccgcaggcgggttcgtccgagcgcaccgcgtggtccgcgggttacgacgcgggtt
 gcagcgagccccgagccgtgcgagcagctctccgggtcggtggttagcagcgaaccg
 ggtagccccgcgtagcgccctatagcagcgatgatagcggctgcgaagggtgccctgtctcc
 ggcggaacgtgaactgctggatttttagcagctggctgggcggctat

SEQ ID NO: 49

25 Proteína LVL114

MGHHHHHHGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIF
 FKIKKTTPLRRLMEAFKRQKGEMDSLRFlyDGIRIQADQAPEDL
 DMEDNDIIEAHREQIGGDGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPAS
 PELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQA
 5 LRQHVP HGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALA

SEQ ID NO: 50

ADN de LVL114

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtcggactcagaagtcaatcaagaagctaagcc
 10 agaggtcaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatttaaagggtgccgatggat
 cttcagagatcttcttcaagatcaaaaagaccactcctttaagaaggctgatggaagcgtt
 cgctaaaagacagggtaaggaaatggactccttaagattcttctaagcggattagaat
 tcaagctgatcaggccccctgaagatttgacatggaggataacgatattattgaggctca
 ccgcgaacagattggaggtgatggtggcaccctgccgcgtagcgcctccgccggcaccg
 15 ccggttccggttggttgcgccgcgtcgctccggcgagcccggaactgctgcgttgc
 agccgtcgctgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttgcgc
 gtcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggctttcaggcgcgtg
 cgtcagcatgtgcccatggcggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctg
 20 cgtagcgcggtggaatatattcgtgcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtg
 cgtaacgcgctggcc

SEQ ID NO: 51

Proteína LVL115

MGHHHHHHGSDSEVNQEAKPEVKPEVKPETHINLKVSDGSSEIF
 25 FKIKKTTPLRRLMEAFKRQKGEMDSLRFlyDGIRIQADQAPEDL

DMEDNDIIEAHREQIGGDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPAS
PELLRCSRRRRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFQA
LRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIRALQRLLAEHDAVRNALA
GGLRPQAVRPSAPRGGSSSEPGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAER
5 ELLDFSSWLGGY

SEQ ID NO: 52

ADN de LVL115

atgggtcatcaccatcatcatcacgggtcggactcagaagtcaatcaagaagctaagcc
10 agaggtcaagccagaagtcaagcctgagactcacatcaatttaaaggtgtccgatggat
cttcagagatcttcttcaagatcaaaaagaccactcctttaagaaggctgatggaagcgtt
cgctaaaagacagggttaaggaaatggactccttaagattcttgtacgacgggtattagaat
tcaagctgatcaggccccctgaagatttgacatggaggataacgatattattgaggctca
ccgcgaacagattggaggtgatggtggcaccctgccgcgtagcgcaccgccggctccg
15 ccggttccggttggttggtgcggcgcgctcgctccggcgagcccggaactgctgcgttgc
agccgtcgctgccgtccggccaccgcggaaaccggtggtggtgcggcagcggttgcgc
gtcgtaacgaacgtgaacgtaaccgtgtgaaactggtgaacctgggcttccaggcgctg
cgtagcatgtgcccatggcggtgcgagcaaaaaactgagcaaagtggaaaccctg
cgtagcgcggtggaatatattcgtagcgctgcaacgtctgctggccgaacatgatgcggtg
20 cgtaacgcgctggccggtggtctgcgtccgcaggcggttcgtccgagcgcgccgcgtgg
tggtagcagcgaaccgggtagcccgcgtagcgcctatagcagcgatgatagcggctgc
gaaggtgccctgagcccggcggaacgtgaactgctggattttagcagctggctgggcgg
ctat

25 SEQ ID NO: 53

Péptido 1

MDGGTLPRSAPPAPP

SEQ ID NO: 54

Péptido 2

5 TLPRSAPPAPPVPVG

SEQ ID NO: 55

Péptido 3

SAPPAPPVPVGCAAR

10 **SEQ ID NO: 56**

Péptido 4

APPVPVGCAARRRPA

SEQ ID NO: 57

Péptido 5

15 PVGCAARRRPASPEL

SEQ ID NO: 58

Péptido 6

AARRRPASPELLRCS

20 **SEQ ID NO: 59**

Péptido 7

RPASPELLRCSRRRR

SEQ ID NO: 60

Péptido 8

25 PELLRCSRRRRPATA

SEQ ID NO: 61

Péptido 9

RCSRRRRPATAETGG

SEQ ID NO: 62

5

Péptido 10

RRRPATAETGGGAAA

SEQ ID NO: 63

Péptido 11

10

ATAETGGGAAAVARR

SEQ ID NO: 64

Péptido 12

TGGGAAAVARRNERE

SEQ ID NO: 65

15

Péptido 13

AAAVARRNERERNRV

SEQ ID NO: 66

Péptido 14

20

ARRNERERNRVKLVN

SEQ ID NO: 67

Péptido 15

ERERNRVKLVNLGFQ

SEQ ID NO: 68

25

Péptido 16

NRVKLVNLGFQALRQ

SEQ ID NO: 69

Péptido 17

LVNLGFQALRQHVP

5

SEQ ID NO: 70

Péptido 18

GFQALRQHVP

SEQ ID NO: 71

10

Péptido 19

LRQHVP

SEQ ID NO: 72

Péptido 20

VPHGGASKKLSKVET

15

SEQ ID NO: 73

Péptido 21

GASKKLSKVETLRSA

SEQ ID NO: 74

20

Péptido 22

KLSKVETLRSAVEYI

SEQ ID NO: 75

Péptido 23

VETLRSAVEYIRALQ

25

SEQ ID NO: 76

Péptido 24

RSAVEYIRALQRLLA

SEQ ID NO: 77

Péptido 25

5 EYIRALQRLLAEHDA

SEQ ID NO: 78

Péptido 26

ALQRLLAEHDAVRNA

10 **SEQ ID NO: 79**

Péptido 27

LLAEHDAVRNALAGG

SEQ ID NO: 80

Péptido 28

15 HDAVRNALAGGLRPQ

SEQ ID NO: 81

Péptido 29

RNALAGGLRPQAVRP

20 **SEQ ID NO: 82**

Péptido 30

AGGLRPQAVRPSAPR

SEQ ID NO: 83

Péptido 31

25 RPQAVRPSAPRGPPG

SEQ ID NO: 84

Péptido 32

VRPSAPRGPPGTPV

SEQ ID NO: 85

5 Péptido 33

APRGPPGTPVAASP

SEQ ID NO: 86

Péptido 34

10 PPGTTPVAASPSRAS

SEQ ID NO: 87

Péptido 35

TPVAASPSRASSSPG

SEQ ID NO: 88

15 Péptido 36

ASPSRASSSPGRGGS

SEQ ID NO: 89

Péptido 37

20 RASSSPGRGGSSEPG

SEQ ID NO: 90

Péptido 38

SPGRGGSSEPGSPRS

SEQ ID NO: 91

25 Péptido 39

GGSEPGSPRSAYSS

SEQ ID NO: 92

Péptido 40

EPGSPRSAYSSDDSG

5

SEQ ID NO: 93

Péptido 41

PRsayssDDSGCEGA

SEQ ID NO: 94

10

Péptido 42

YSSDDSGCEGALSPA

SEQ ID NO: 95

Péptido 43

DSGCEGALSPAEREL

15

SEQ ID NO: 96

Péptido 44

EGALSPAERELLDfs

SEQ ID NO: 97

20

Péptido 45

SPAERELLDfSSWLG

SEQ ID NO: 98

Péptido 46

AERELLDfSSWLGgY

25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido CASB7439 modificado, el cual comprende cuando menos una modificación de mejoramiento de expresión, en donde la modificación de mejoramiento de expresión comprende cuando menos la supresión de parte o toda la región rica en prolina de la SEQ ID NO: 13.

2. Una construcción de proteína que comprende un polipéptido CASB7439 modificado de la reivindicación 1, y la cual además comprende uno o más polipéptidos heterólogos.

3. La construcción de proteína de la reivindicación 3, en donde la construcción de la proteína comprende una construcción seleccionada a partir de:

- (a) LVL055 (SEQ ID NO: 1);
- (b) LVL111 (SEQ ID NO: 3);
- (c) LVL137 (SEQ ID NO: 5);
- (d) LVL141 (SEQ ID NO: 7);
- (e) LVL144 (SEQ ID NO: 9); y
- (f) LVL168 (SEQ ID NO: 11).

4. Una composición inmunogénica, la cual comprende la construcción de la proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde el vehículo o excipiente

puede comprender opcionalmente un regulador.

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, la cual comprende además un adyuvante.

5 6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en donde el adyuvante provoca cuando menos una respuesta inmunitaria de Th1.

7. La composición inmunogénica de la reivindicación 4, 5, ó 6, en donde el adyuvante comprende cuando menos uno de:
10 un agonista de TLR-4, una fracción de saponina inmunológicamente activa, un agonista de TLR-9.

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en donde el agonista de TLR-4 es 3D-MPL.

9. La composición inmunogénica de la reivindicación 7 u
15 8, en donde el agonista de TLR-9 es un oligonucleótido de CpG.

10. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, 8 ó 9, en donde la fracción de saponina inmunológicamente activa mencionada es QS21.

20 11. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, la cual comprende 3D-MPL.

12. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11, la cual comprende CpG.

25 13. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, la cual comprende QS21.

14. La composición inmunogénica de la reivindicación 13, la cual además comprende colesterol.

15. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica la construcción de proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

16. Un método para inducir una respuesta inmunitaria al CASB7439 en un animal humano o no humano, el cual comprende administrar al animal humano o no humano, una cantidad efectiva de una composición que comprende un adyuvante y una proteína que comprende una secuencia de polipéptido seleccionada a partir del grupo que consiste en:

(a) la secuencia de polipéptido estipulada en la SEQ ID NO: 9; y

(b) la secuencia de polipéptido estipulada en la SEQ ID NO: 11.

17. Un método para el tratamiento de un animal humano o no humano, el cual comprende los pasos de:

(a) seleccionar un animal humano o no humano que tenga células cancerosas que expresen el CASB7439; y

(b) administrar al animal humano o no humano, una cantidad efectiva de una composición que comprenda un adyuvante y una proteína que comprenda un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en:

- (i) la construcción estipulada en la SEQ ID NO: 9; y
- (ii) la construcción estipulada en la SEQ ID NO: 11.

5

18. Una composición inmunogénica como se define en las reivindicaciones 7 a 14, para utilizarse en un método para inducir una respuesta inmunitaria al CASB7439 en un animal humano o no humano, comprendiendo este método administrar una cantidad efectiva de la composición inmunogénica mencionada.

10

19. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 18, la cual comprende una proteína que comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en:

15

- (a) la construcción estipulada en la SEQ ID NO: 9;

y

- (b) la construcción estipulada en la SEQ ID NO: 11.

20

20. El uso de una composición inmunogénica como se define en las reivindicaciones 7 a 14, en la elaboración de un medicamento para utilizarse en un método para inducir una respuesta inmunitaria al CASB7439 en un animal humano o no humano, comprendiendo este método administrar una cantidad efectiva de la composición inmunogénica mencionada.

25

21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la composición inmunogénica mencionada comprende:

una proteína que comprende un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste en:

5

(i) la construcción estipulada en la SEQ ID NO: 9;

y

(ii) la construcción estipulada en la SEQ ID NO: 11.

10

15

20

25

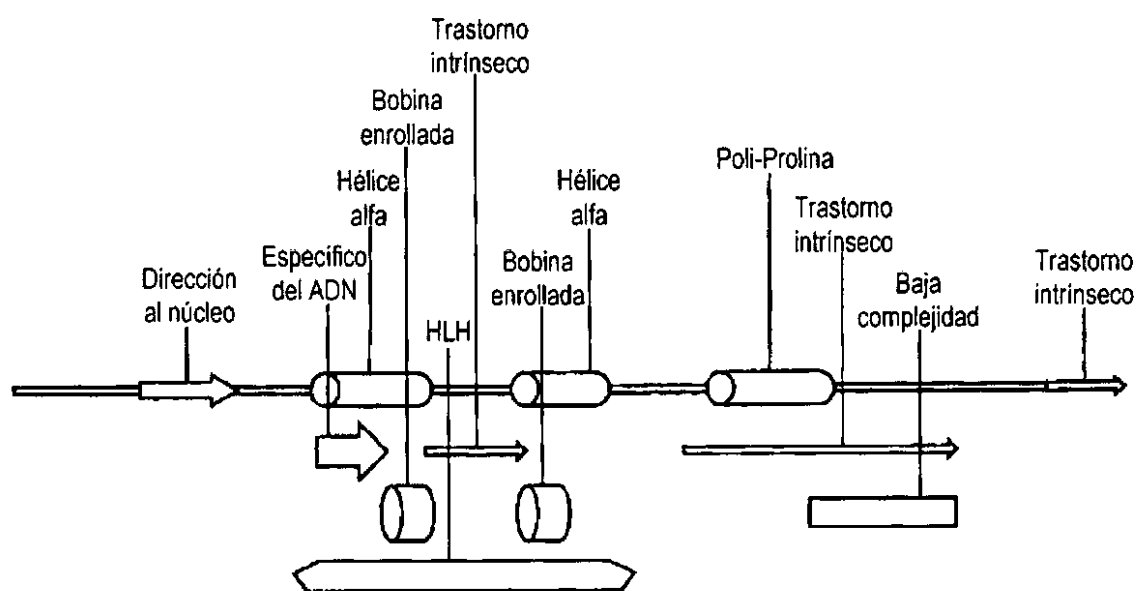


FIG. 1

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

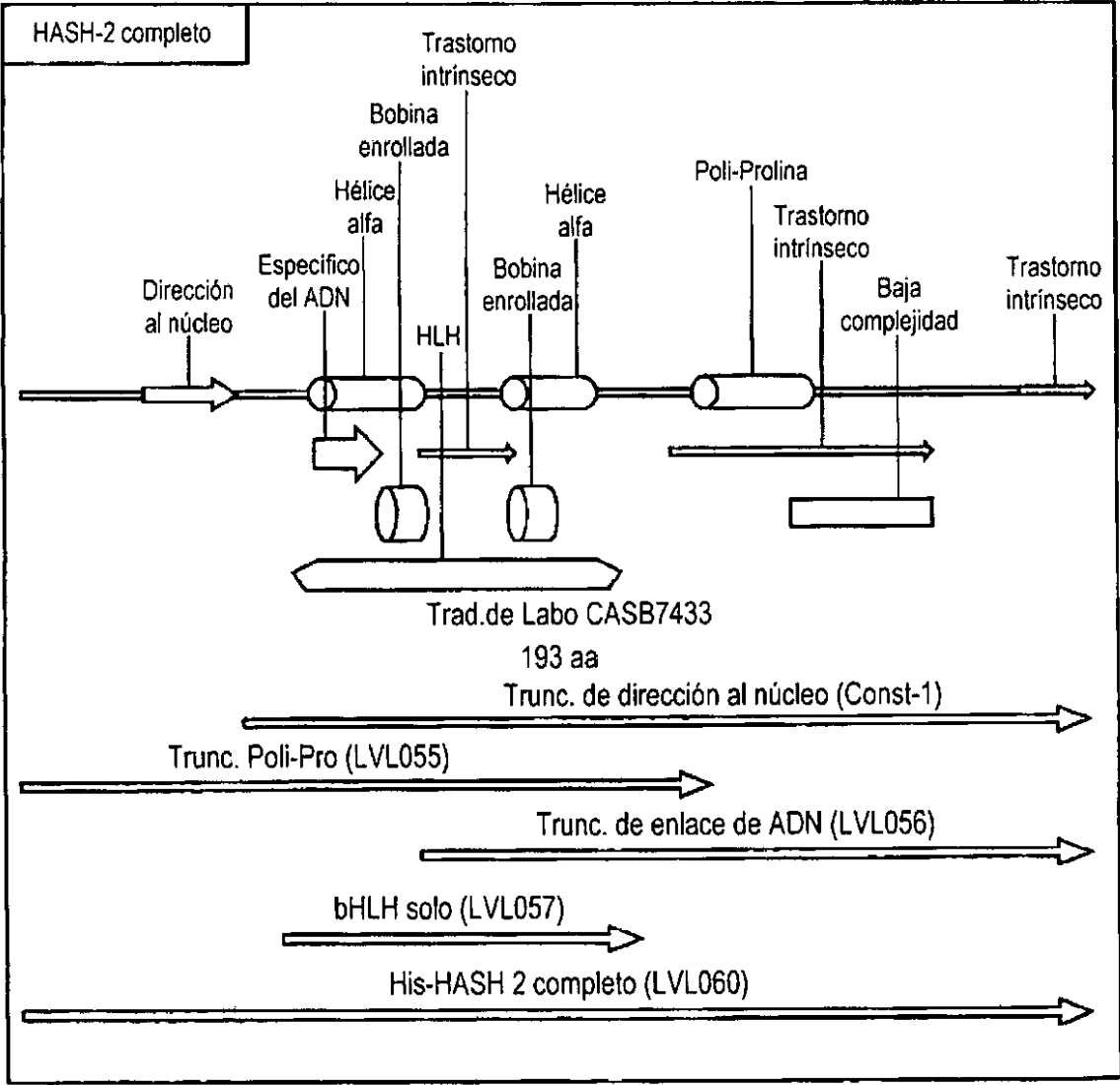


FIG. 2

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

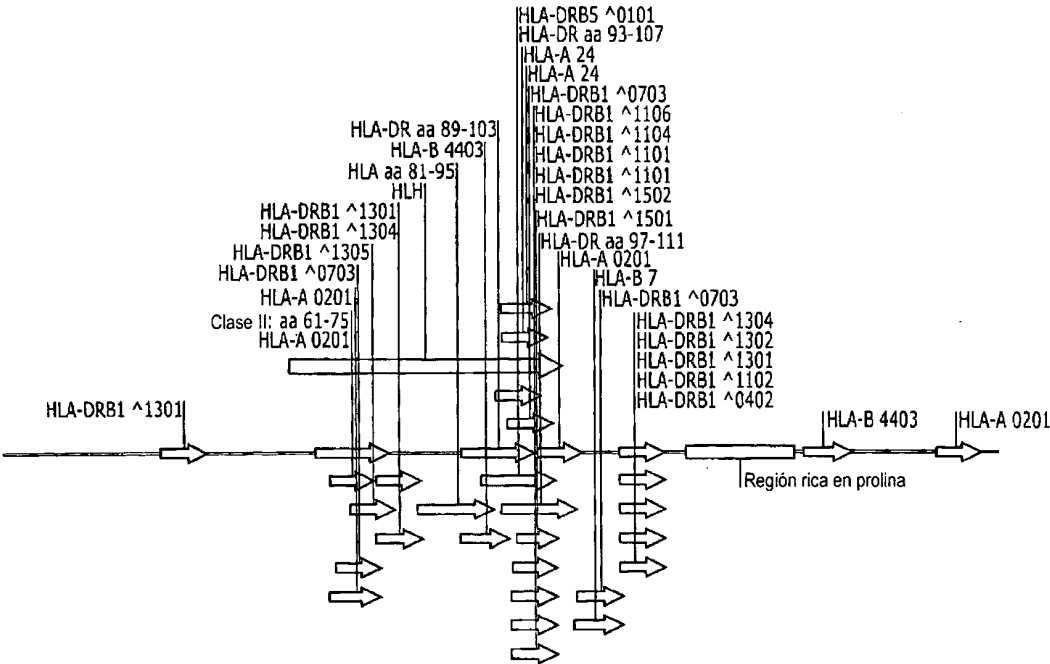


FIG. 3

		1	50
CASB7439 no modificado	(1)	MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAA	
Primera modificación de CASB7439	(1)	MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAA	
Segunda modificación de CASB7439	(1)	MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAA	
Tercera modificación de CASB7439	(1)	MDGGTLPRSAPPAPPVPVGCAARRRPASPELLRCSRRRRPATAETGGGAA	
		51	100
CASB7439 no modificado	(51)	AVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIR	
Primera modificación de CASB7439	(51)	AVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIR	
	(51)	AVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIR	
Tercera modificación de CASB7439	(51)	AVARRNERERNRVKLVNLGFQALRQHVPHGGASKKLSKVETLRSAYEYIR	
		101	150
CASB7439 no modificado	(101)	ALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPPPGTTPVAASPSRASSSP	
Primera modificación de CASB7439	(101)	ALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPPPGTTPVAASPSRASSSP	
Segunda modificación de CASB7439	(101)	ALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPPPGTTPVAASPSRASSSP	
Tercera modificación de CASB7439	(101)	ALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPPPGTTPVAASPSRASSSP	
		151	193
CASB7439 no modificado	(151)	CGGSSSGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGY	
Primera modificación de CASB7439	(133)	CGGSSSGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGY	
Segunda modificación de CASB7439	(131)	CGGSSSGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGY	
Tercera modificación de CASB7439	(131)	CGGSSSGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERELDFSSWLGGY	



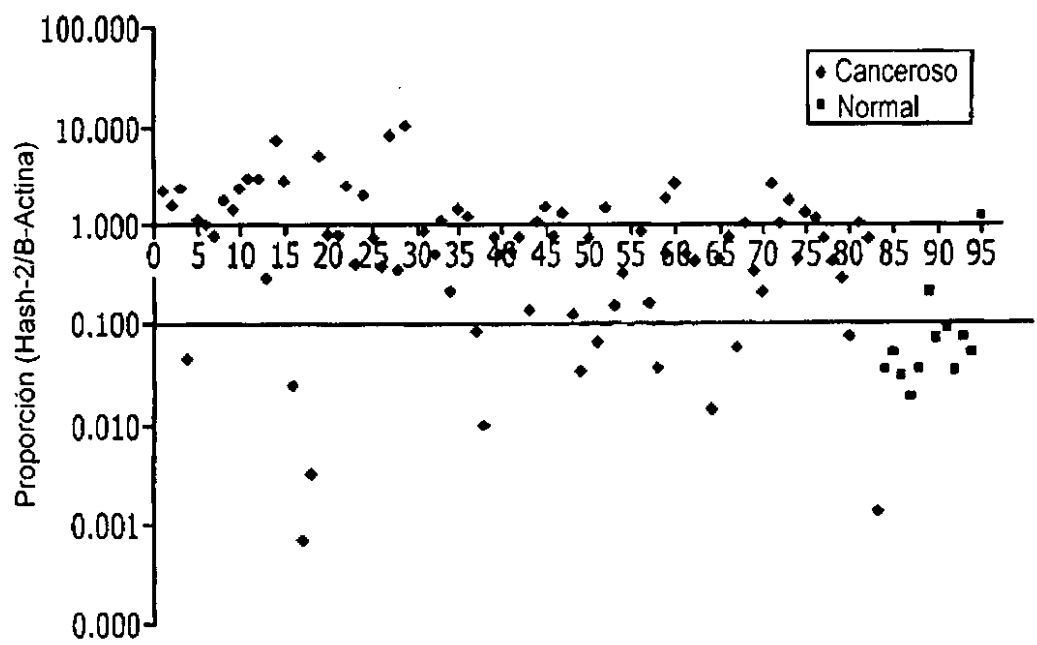
FIG. 4

CASB7439	(1)	-----	DGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRR
LVL088	(1)	-----	DGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRR
LVL111	(1)	MGSSGHIDDDKH	DGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRR
LVL137	(1)	MGSSGHIDDDKH	DGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRR
LVL138	(1)	-----	DGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRR
LVL168	(1)	-----	DGGTLPRSAPPAPPVPGCAARRRPASPELLRCSRR
61			120
CASB7439	(38)	RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFOALRQHVPHGGASKKLSKVETLRS	AVE
LVL088	(38)	RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFOALRQHVPHGGASKKLSKVETLRS	AVE
LVL111	(61)	RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFOALRQHVPHGGASKKLSKVETLRS	AVE
LVL137	(61)	RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFOALRQHVPHGGASKKLSKVETLRS	AVE
LVL138	(44)	RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFOALRQHVPHGGASKKLSKVETLRS	AVE
LVL168	(48)	RRPATAETGGGAAAVARRNERERNRVKLVNLGFOALRQHVPHGGASKKLSKVETLRS	AVE
121			180
CASB7439	(98)	YIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRGPPGTTTPVAASPSRASSSPGR	GSSE
LVL088	(98)	YIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG-----	GSSE
LVL111	(121)	YIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG-----	GSSE
LVL137	(121)	YIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG-----	GSSE
LVL138	(104)	YIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG-----	GSSE
LVL168	(108)	YIRALQRLLAEHDAVRNALAGGLRPQAVRPSAPRG-----	GSSE
181			222
CASB7439	(158)	PGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERE	LDFSSWLGGY-----
LVL088	(137)	PGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERE	LDFSSWLGGYHHHHHH
LVL111	(160)	PGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERE	LDFSSWLGGYHHHHHH
LVL137	(160)	PGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERE	LDFSSWLGGY-----
LVL138	(143)	PGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERE	LDFSSWLGGY-----
LVL168	(147)	PGSPRSAYSSDDSGCEGALSPAERE	LDFSSWLGGY-----

FIG. 5

		1	60
HASH2	(1)	-----	
LVL168	(1)	-----	
PD1/3	(1)	MDPSCHSMMANTQMSDKLTIAHRASGLSEPTLESKAIAAGCAQYLEODLAKTKDC	
LVL144	(1)	MDPSCHSMMANTQMSDKLTIAHRASGLSEPTLESKAIAAGCAQYLEODLAKTKDC	
		61	120
HASH2	(1)	-----	-----MDSCTLPSS
LVL168	(1)	-----	-----MHHHHHHHHHHHGGCTLPSS
PD1/3	(61)	RLVTHOHFLDGLTVAKKCPHHRKDGAVVLDPTLTKGSLMTEPFH	
LVL144	(61)	RLVTHOHFLDGLTVAKKCPHHRKDGAVVLDPTLTKGSLMTEPFH	
		121	180
HASH2	(11)	PAAPVPVCCARREDACTELICSRHNPATAECGCAAYABNNREBNVKLTH	
LVL168	(21)	PAAPVPVCCARREDACTELICSRHNPATAECGCAAYABNNREBNVKLTH	
PD1/3	(112)	-----	
LVL144	(121)	PAAPVPVCCARREDACTELICSRHNPATAECGCAAYABNNREBNVKLTH	
		181	240
HASH2	(71)	QALRQHYPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIALQRLAEHDVBNALAGCLTPQAVRPSA	
LVL168	(81)	QALRQHYPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIALQRLAEHDVBNALAGCLTPQAVRPSA	
PD1/3	(112)	-----	
LVL144	(181)	QALRQHYPHGGASKKLSKVETLRSAVEYIALQRLAEHDVBNALAGCLTPQAVRPSA	
		241	300
HASH2	(131)	PPGTTTPVAASPSRASSSPGRGSSLEPGGPRSAYSDDSCGALSPAPRLDPSNW	
LVL168	(141)	PPGTTTPVAASPSRASSSPGRGSSLEPGGPRSAYSDDSCGALSPAPRLDPSNW	
PD1/3	(112)	-----	
LVL144	(241)	PPGTTTPVAASPSRASSSPGRGSSLEPGGPRSAYSDDSCGALSPAPRLDPSNW	
		301	
HASH2	(191)	HHHHHH	
LVL168	(180)	HHHHHH	
PD1/3	(112)	HHHHHH	
LVL144	(280)	HHHHHH	

FIG. 6



Expresión de HASH2 en muestras de CRC (X veces promedio de expresión de HASH2 en los tejidos normales de colon)	% de muestras	Número de muestras
Más de 5X	76	63/83
Más de 10X	63	52/83
Más de 20X	40	33/83
Más de 40X	17	14/83

FIG. 7

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

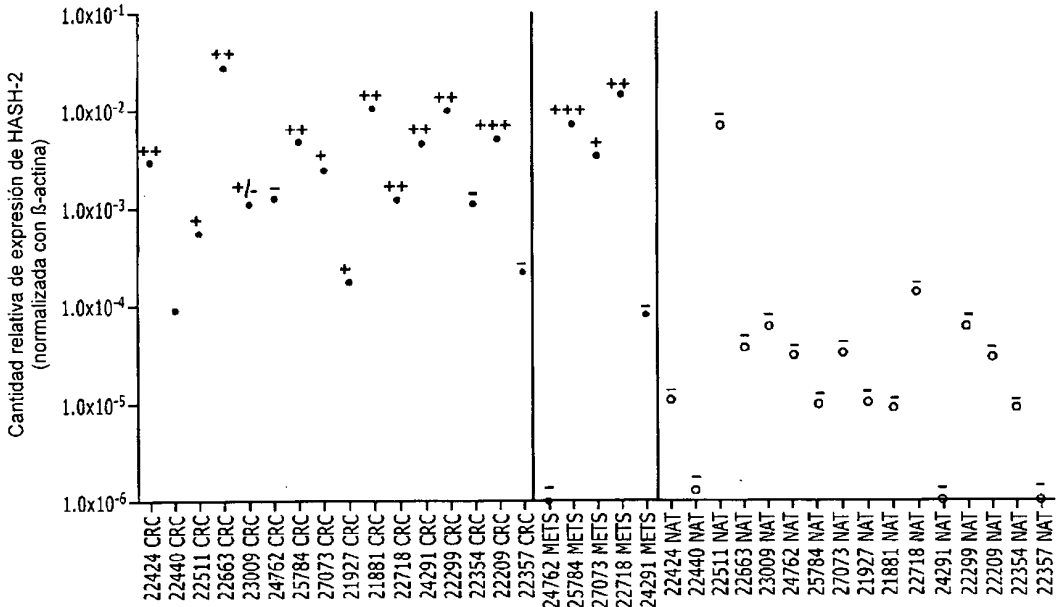


FIG. 8

Péptido 1	H-MDGGTLPRSAPPAPP-OH	Péptido 24	H-RSAVEYIRALQRLLA-OH
Péptido 2	H-TLPRSAPPAPPVPG-OH	Péptido 25	H-EYIRALQRLLAEHDA-OH
Péptido 3	H-SAPPAPPVPGCAAR-OH	Péptido 26	H-ALQRLLAEHDAVRNA-OH
Péptido 4	H-APPVPGCAARRRPA-OH	Péptido 27	H-LLAEHDAVRNALAGG-OH
Péptido 5	H-PVGCAARRRPASPEL-OH	Péptido 28	H-HDAVRNALAGGLRPQ-OH
Péptido 6	H-AARRRPASPELLRCS-OH	Péptido 29	H-RNALAGGLRPQAVRP-OH
Péptido 7	H-RPASPELLRCSRERR-OH	Péptido 30	H-AGGLRPQAVRPSAPR-OH
Péptido 8	H-PELLRCSRERRRPATA-OH	Péptido 31	H-RPQAVRPSAPRGPPG-OH
Péptido 9	H-RCSRERRRPATAETGG-OH	Péptido 32	H-VRPSAPRGPPGTTPV-OH
Péptido 10	H-RRRPATAETGGGAAA-OH	Péptido 33	H-APRGPPGTTPPVAASP-OH
Péptido 11	H-ATAETGGGAAVARR-OH	Péptido 34	H-PPGTTPPVAASPSRAS-OH
Péptido 12	H-TGGGAAVARRNERE-OH	Péptido 35	T-TPVAASPSRASSSPG-OH
Péptido 13	H-AAVARRNERERNRV-OH	Péptido 36	H-ASPSRASSSPGRGGS-OH
Péptido 14	H-ARRNERERNRVKLVN-OH	Péptido 37	H-RASSSPGRGGSSEPG-OH
Péptido 15	H-ERERNRVKLVNLGFQ-OH	Péptido 38	H-SPGRGGSSEPGSPRS-OH
Péptido 16	H-NRVKLVNLGFQALRQ-OH	Péptido 39	H-GGSSEPGSPRSAYSS-OH
Péptido 17	H-LVNLGFQALRQHVPH-OH	Péptido 40	H-EPGSPRSAYSSDDSG-OH
Péptido 18	H-GFQALRQHVPHGGAS-OH	Péptido 41	H-PRsaySSDDSGCEGA-OH
Péptido 19	H-LRQHVPHGGASKKLS-OH	Péptido 42	H-YSSDDSGCEGALSPA-OH
Péptido 20	H-VPHGGASKKLSKVET-OH	Péptido 43	H-DSGCEGALSPAEREL-OH
Péptido 21	H-GASKKLSKVETLRSA-OH	Péptido 44	H-EGALSPAERELDFS-OH
Péptido 22	H-KLSKVETLRSAVEYI-OH	Péptido 45	H-SPAERELDFSSWLGG-OH
Péptido 23	H-VETLRSAVEYIRALQ-OH	Péptido 46	H-AERELDFSSWLGGY-OH

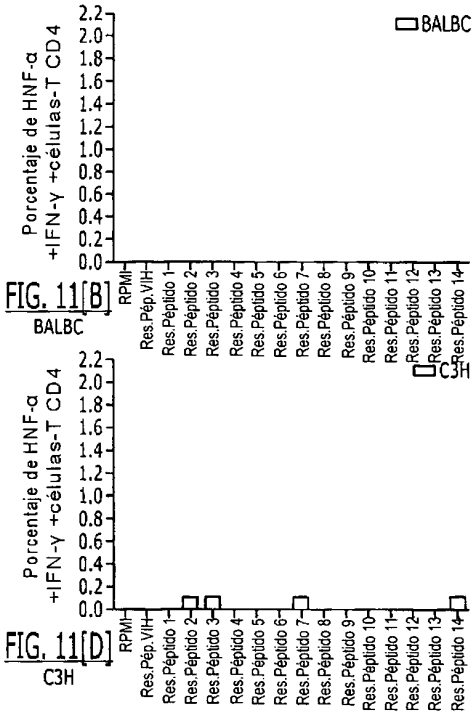
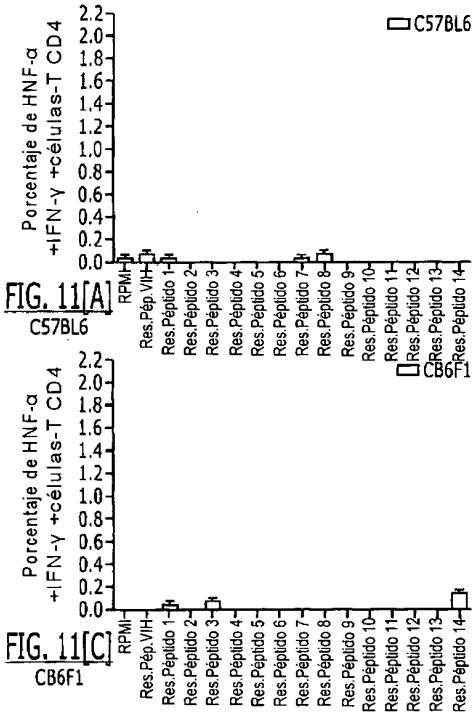
FIG. 9

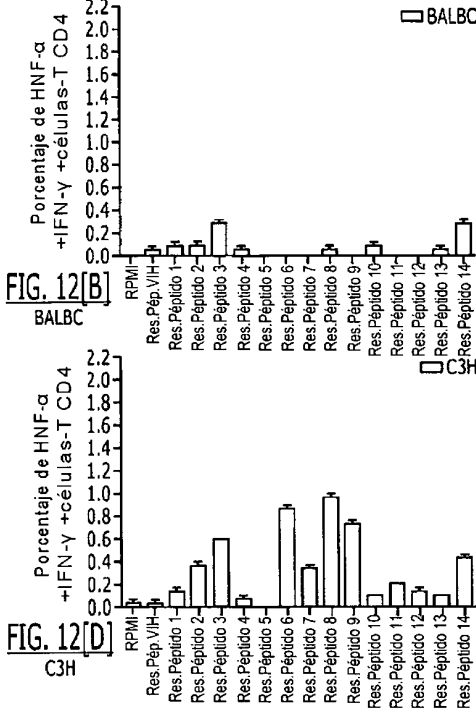
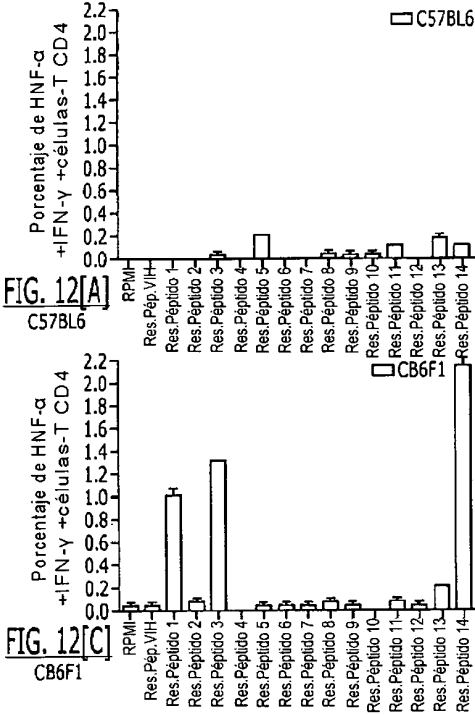
HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

	Reserva 7	Reserva 8	Reserva 9	Reserva 10	Reserva 11	Reserva 12	Reserva 13	Reserva 14
Reserva 1	1	2	3	4	5	6	7	8
Reserva 2	9	10	11	12	13	14	15	16
Reserva 3	17	18	19	20	21	22	23	24
Reserva 4	25	26	27	28	29	30	31	32
Reserva 5	33	34	35	36	37	38	39	40
Reserva 6	41	42	43	44	45	46		

FIG. 10

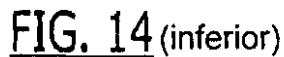
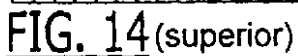
HOJA MODIFICADA (REGLA 26)



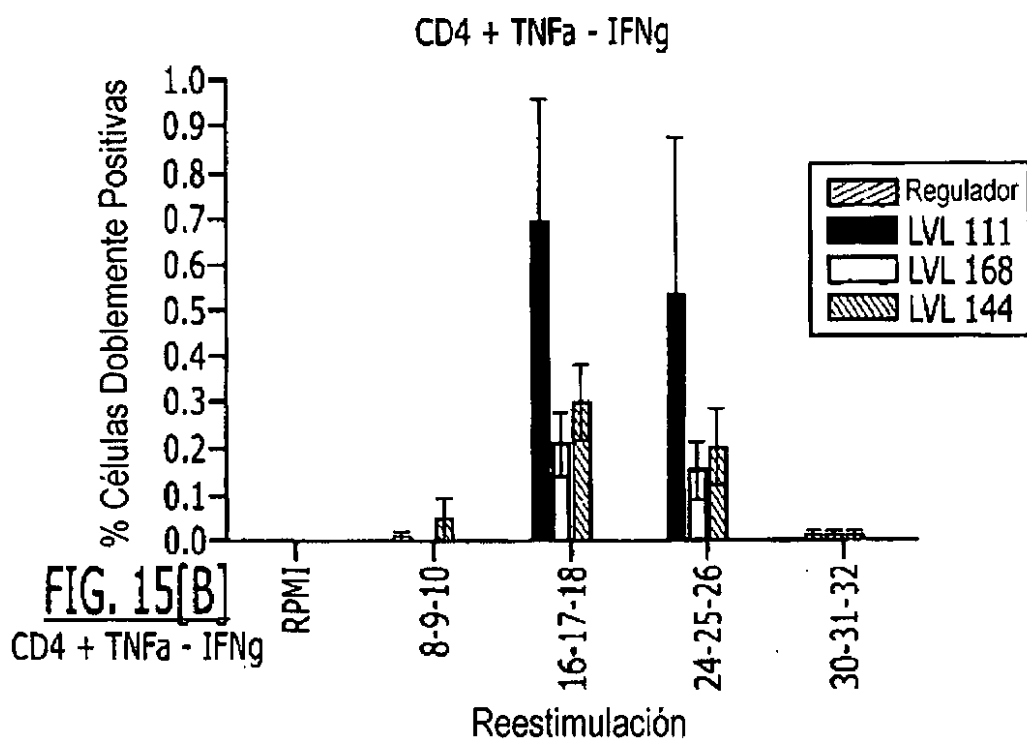
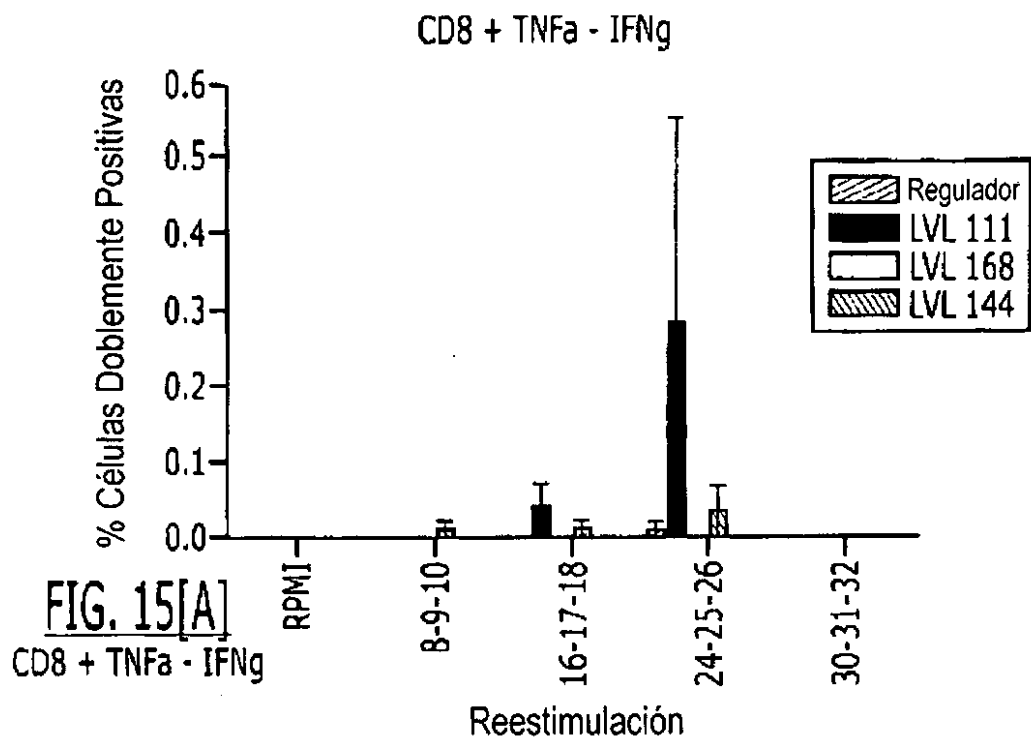


HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

FIG. 13



HOJA MODIFICADA (REGLA 26)



HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

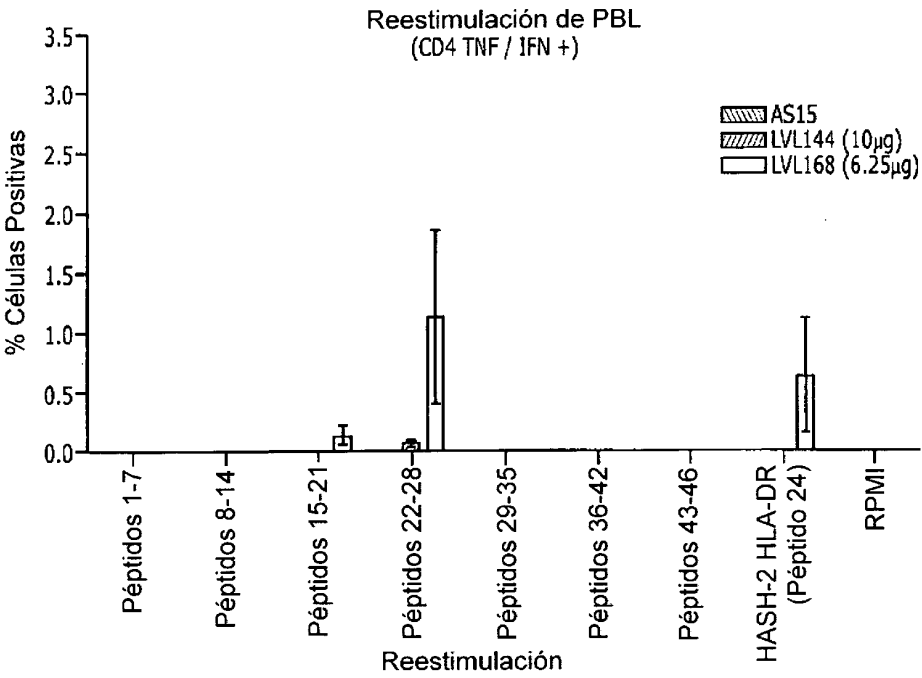
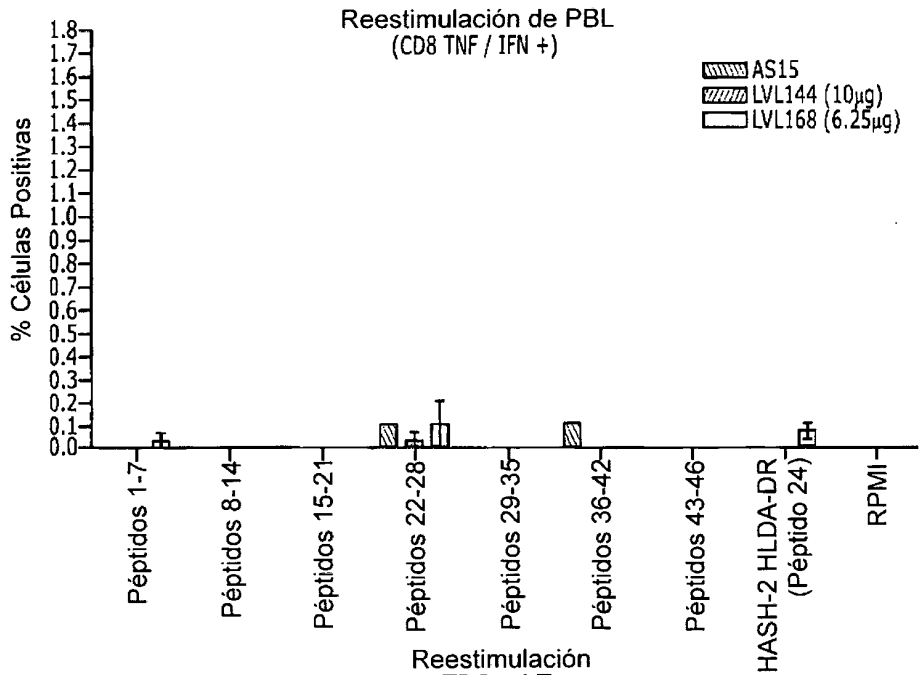
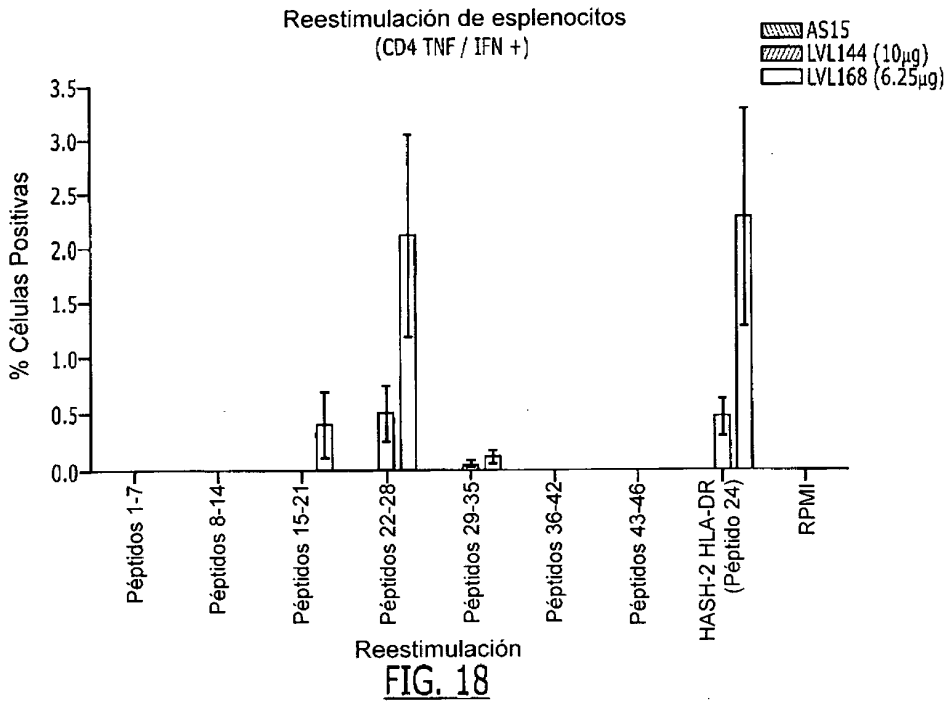


FIG. 16



Reestimulación
FIG. 17



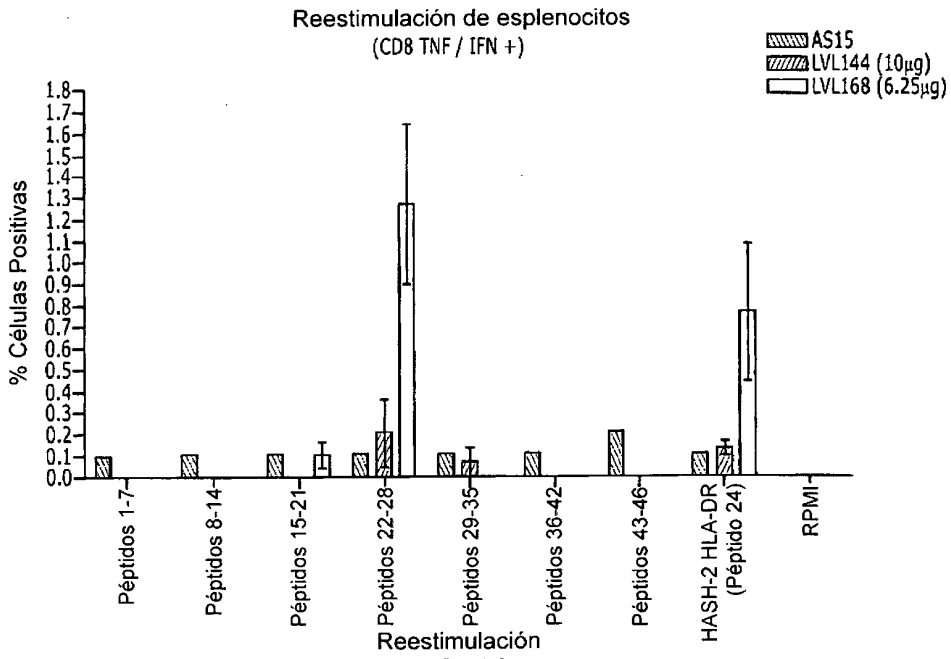
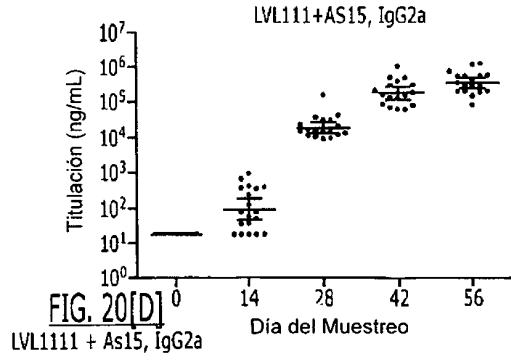
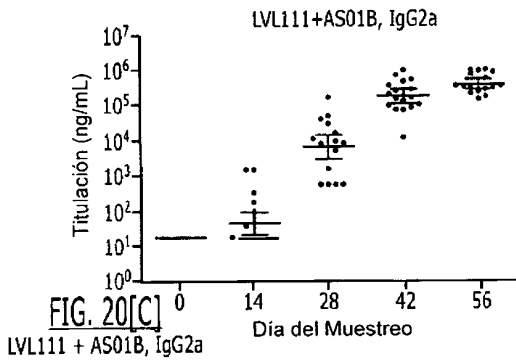
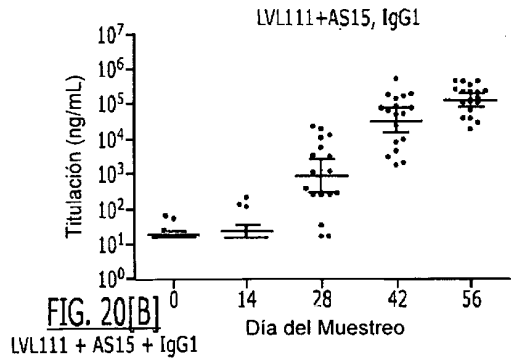
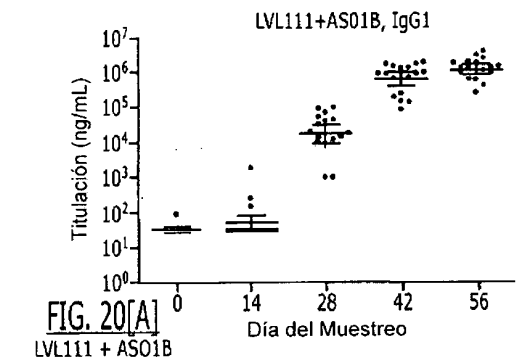


FIG. 19



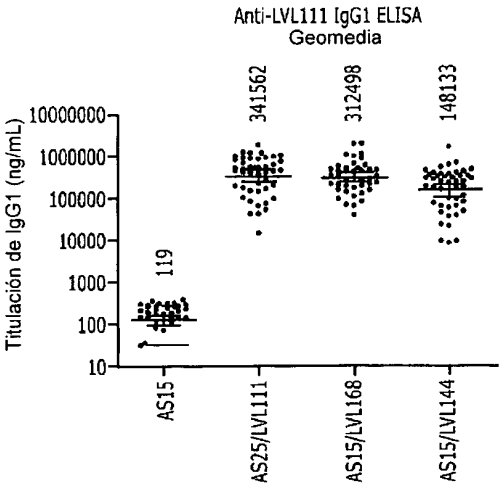


FIG. 21[A]
Anti_LVL111/G1 ELISA

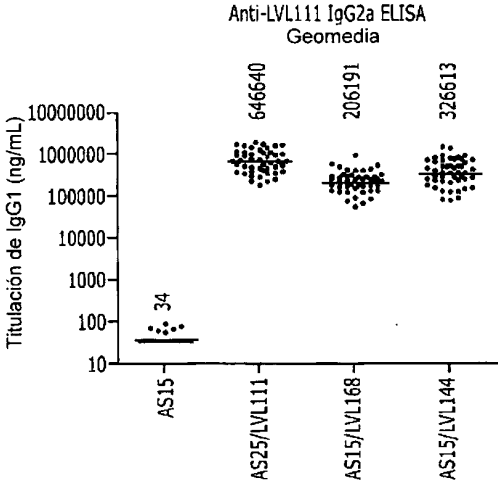


FIG. 21[B]
Anti-LVL111 IgG2a ELISA

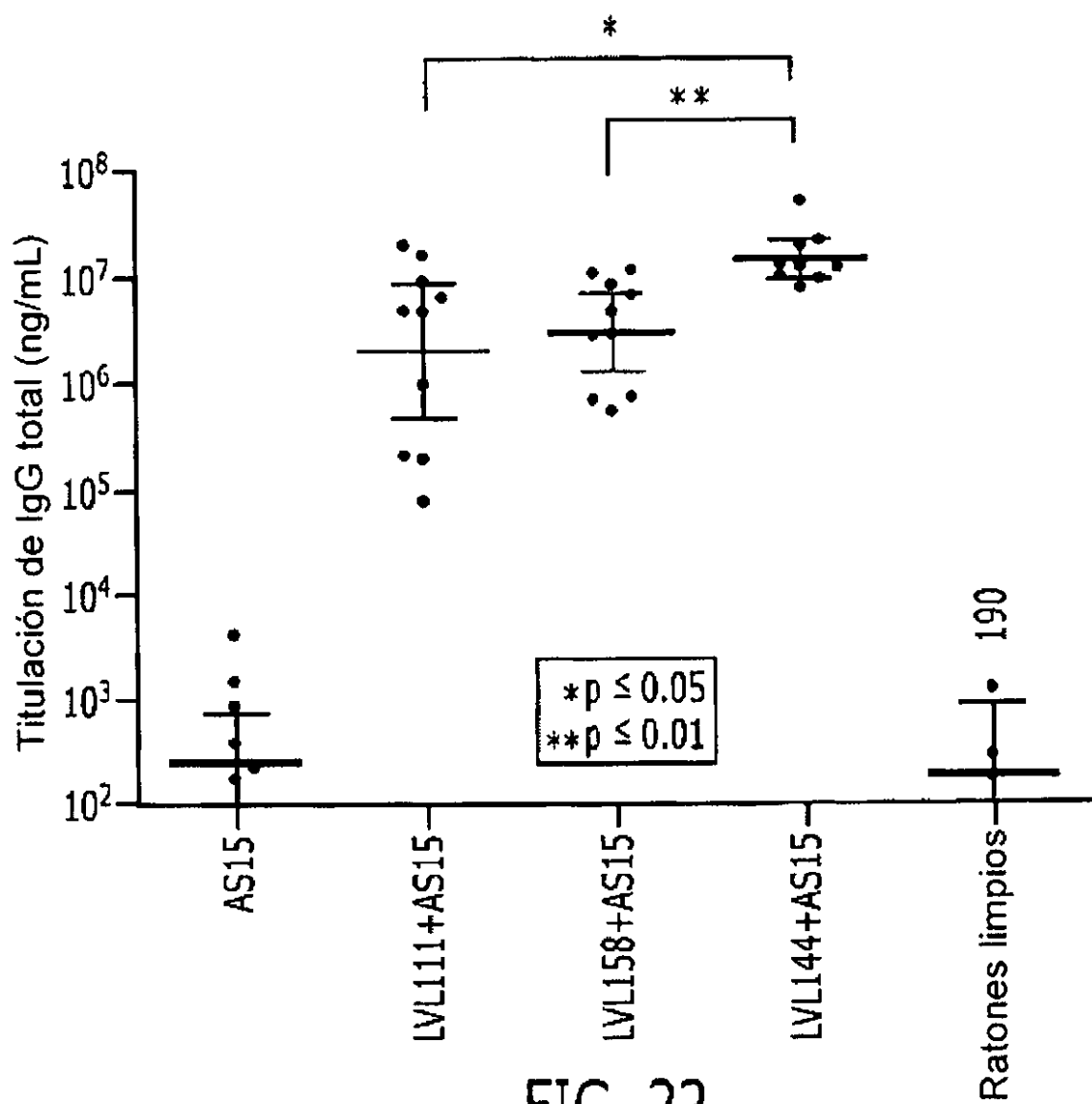


FIG. 22

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)

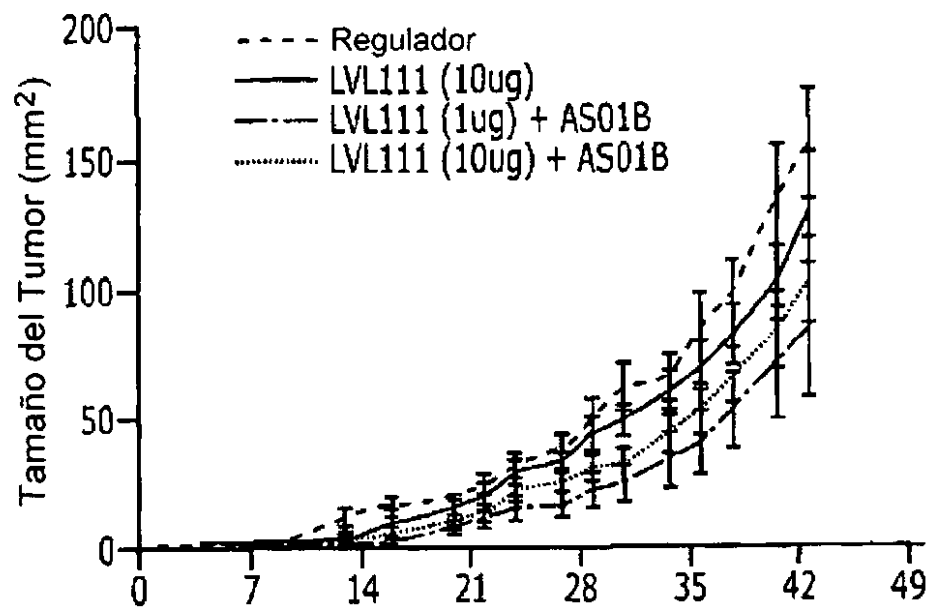


FIG. 23 Tiempo (días después de la inyección)
(superior)

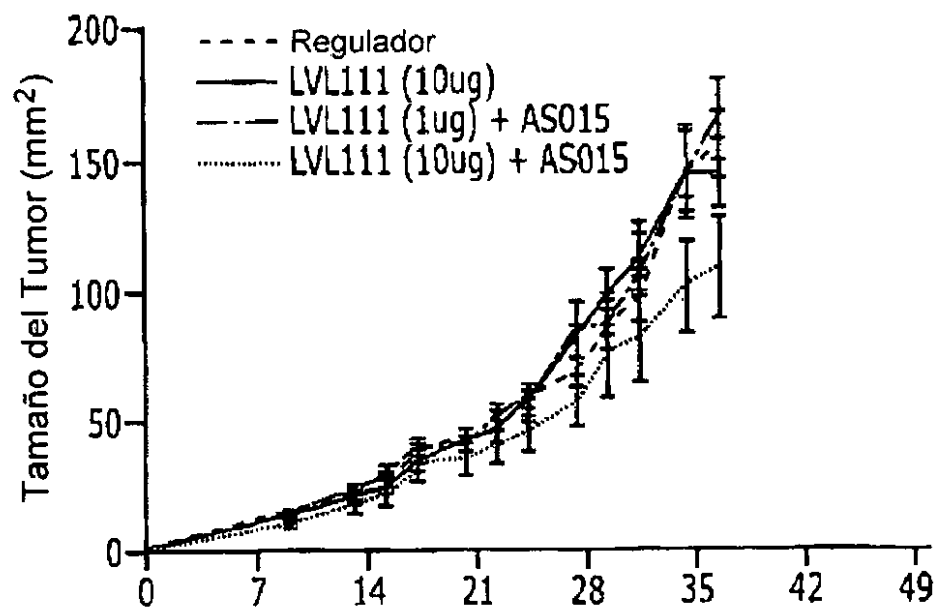
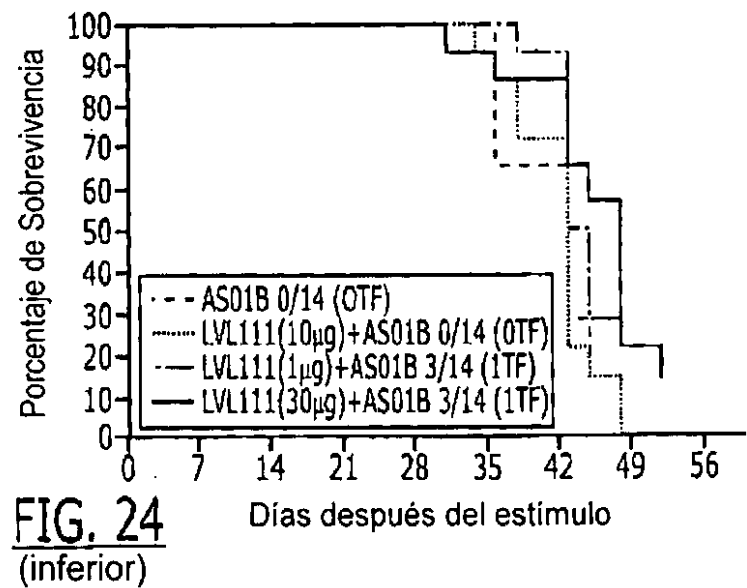
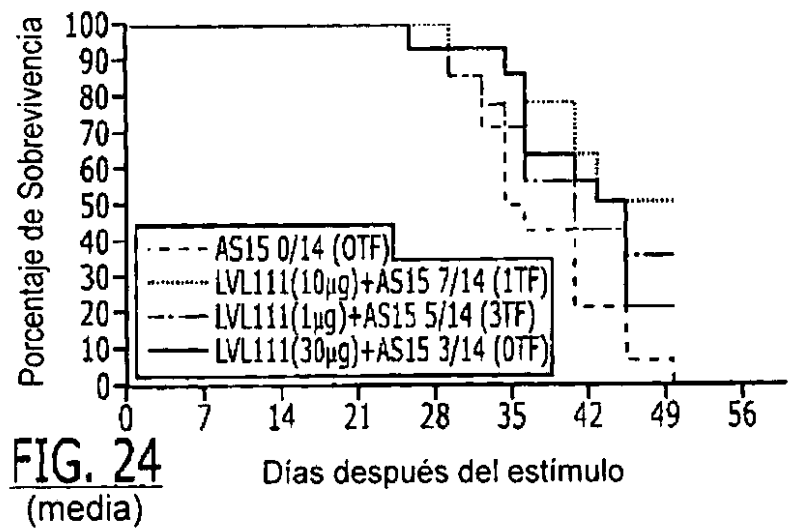
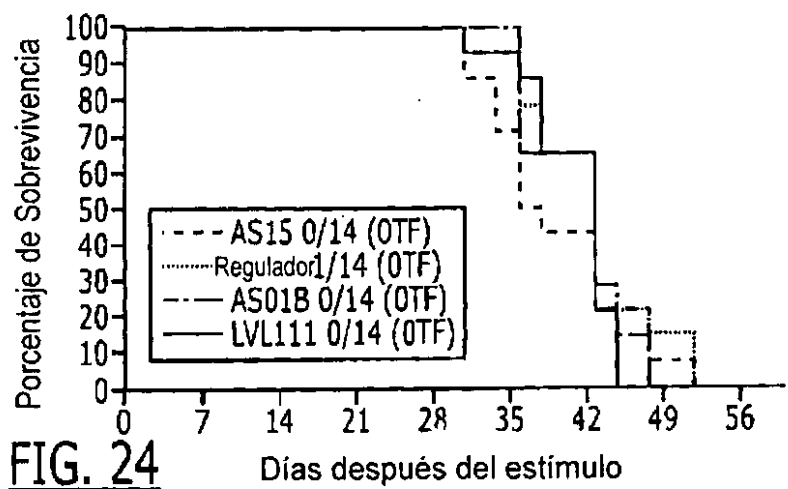


FIG. 23 Tiempo (días después de la inyección)
(inferior)

HOJA MODIFICADA (REGLA 26)



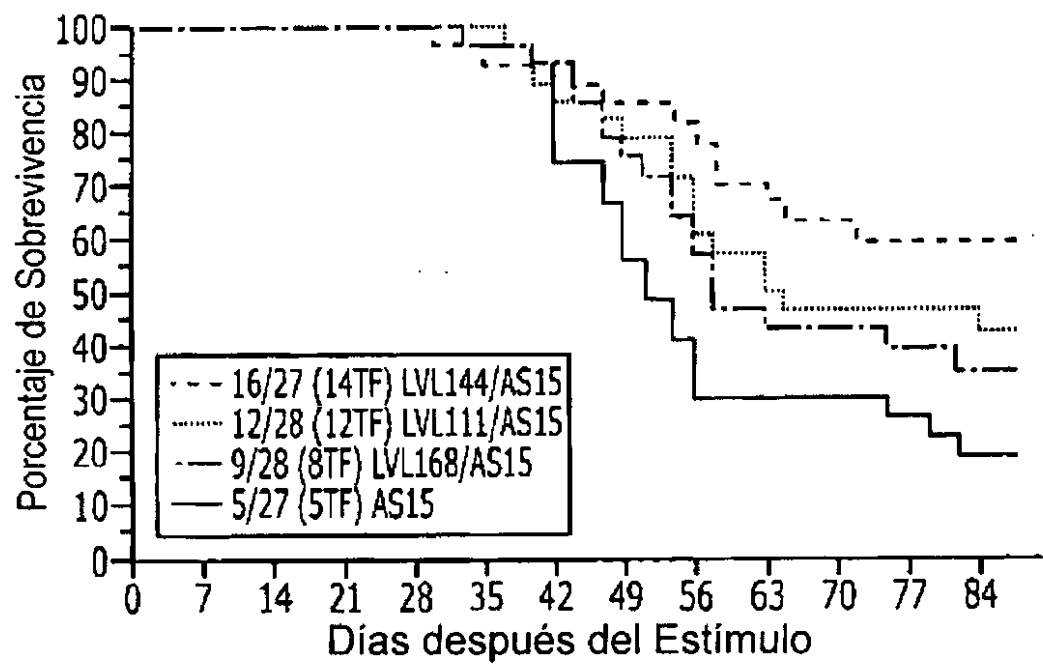


FIG. 25

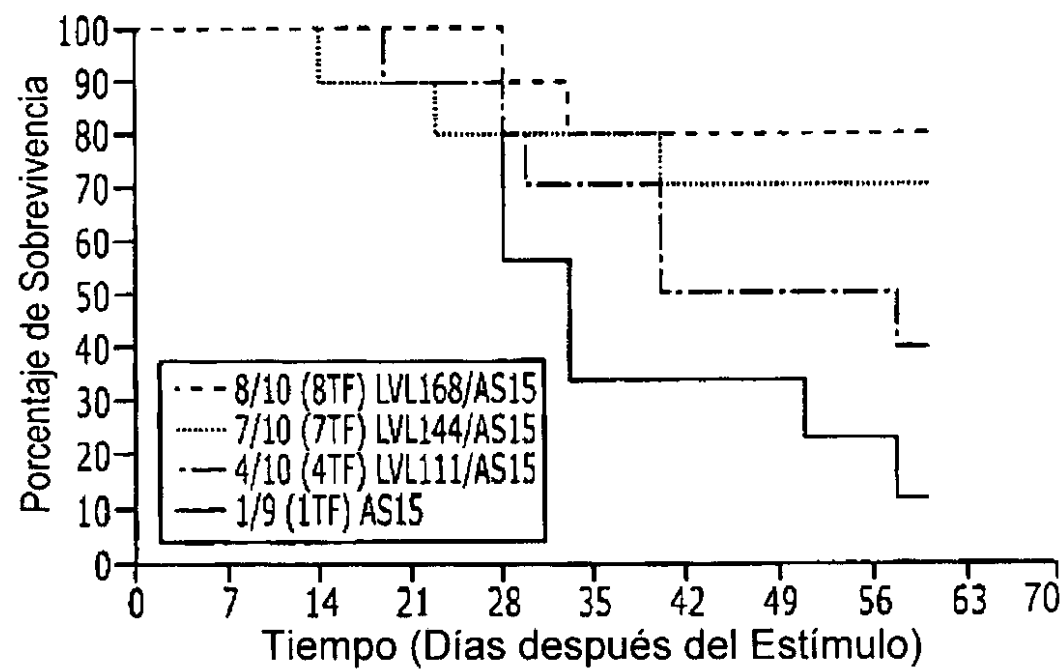


FIG. 25

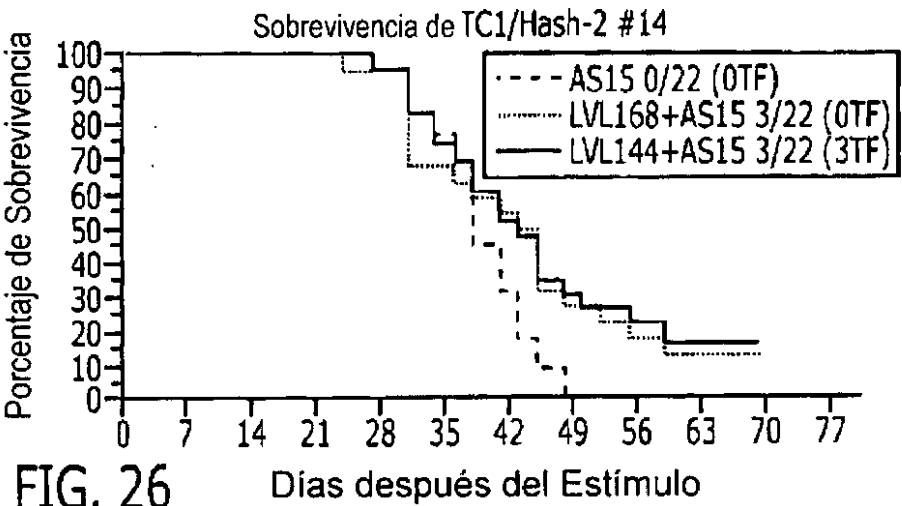


FIG. 26
Superior

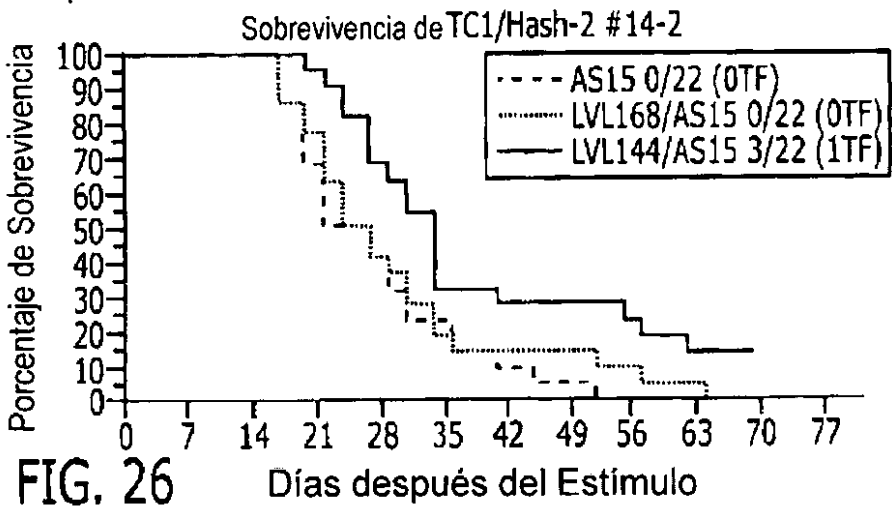


FIG. 26
Media

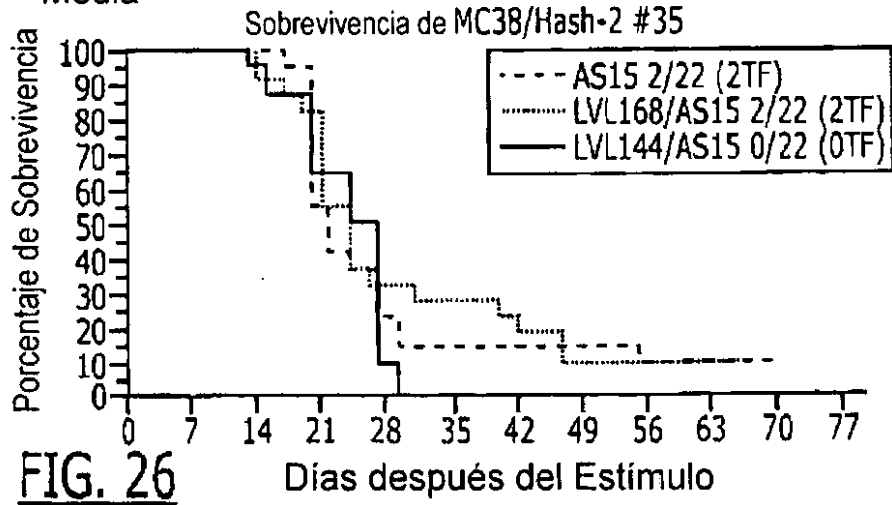
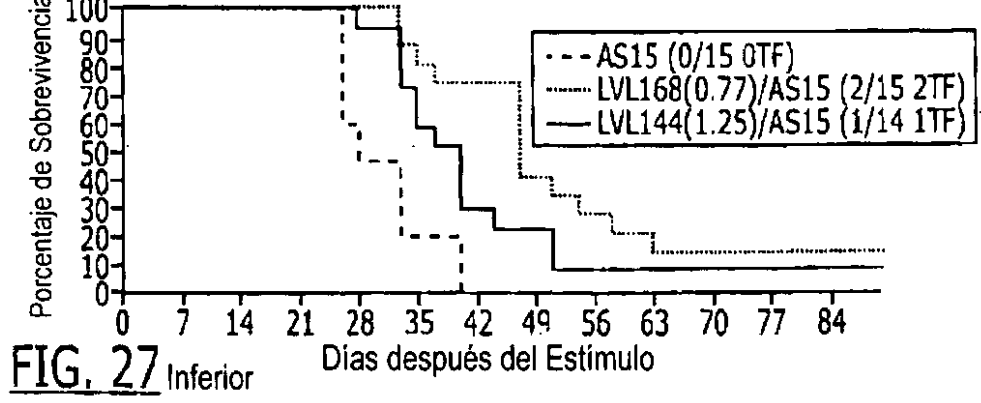
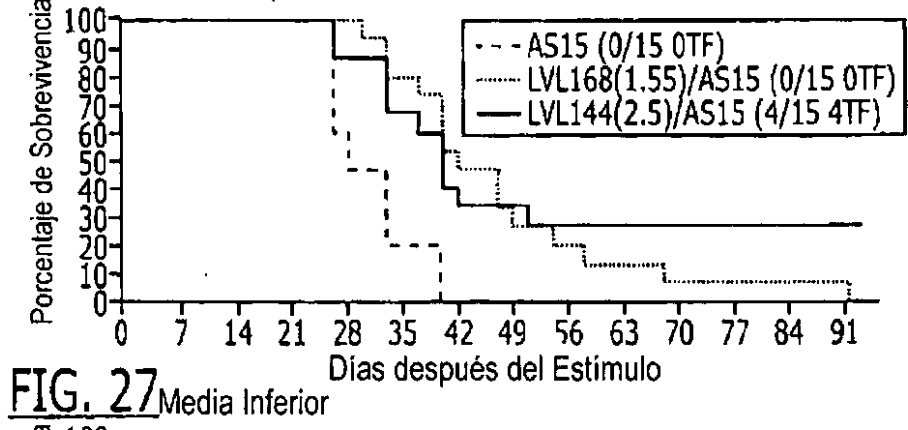
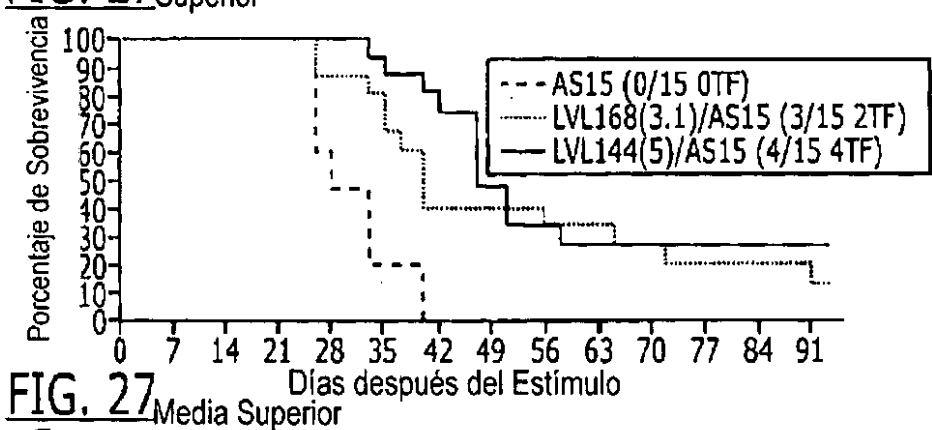
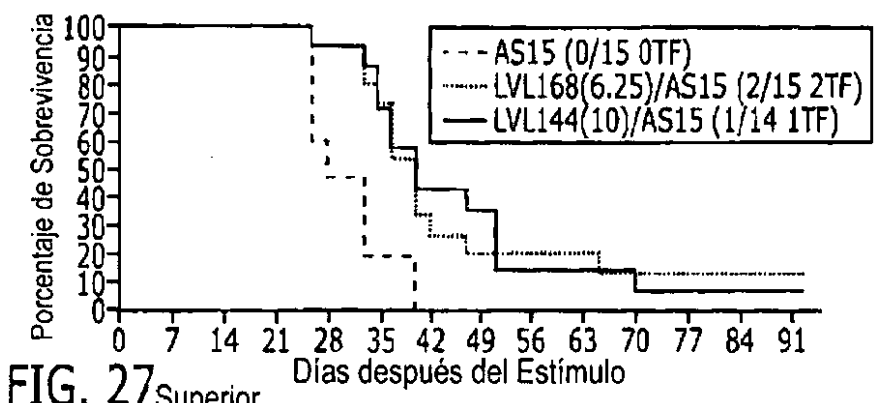


FIG. 26
Inferior



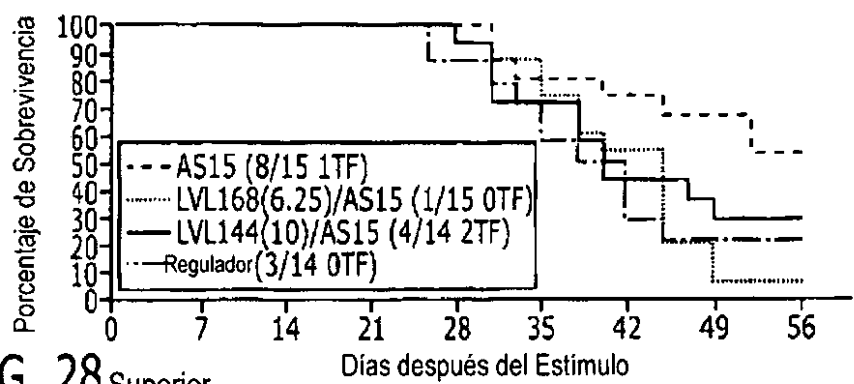


FIG. 28 Superior

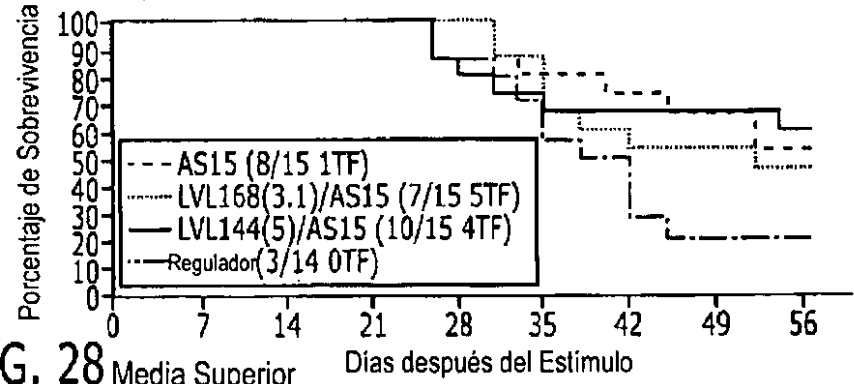


FIG. 28 Media Superior

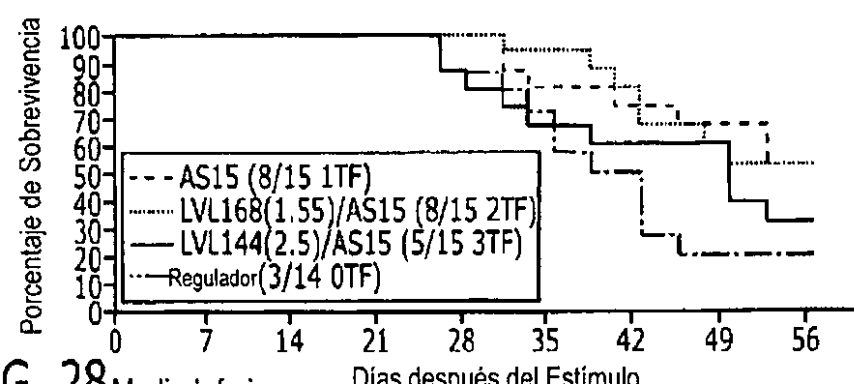


FIG. 28 Media Inferior

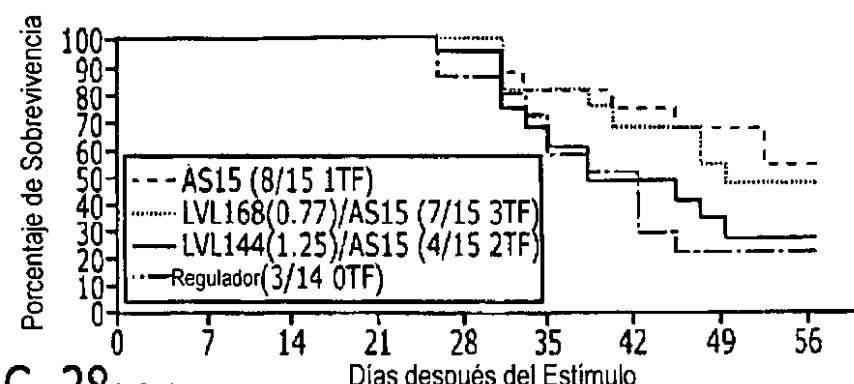


FIG. 28 Inferior

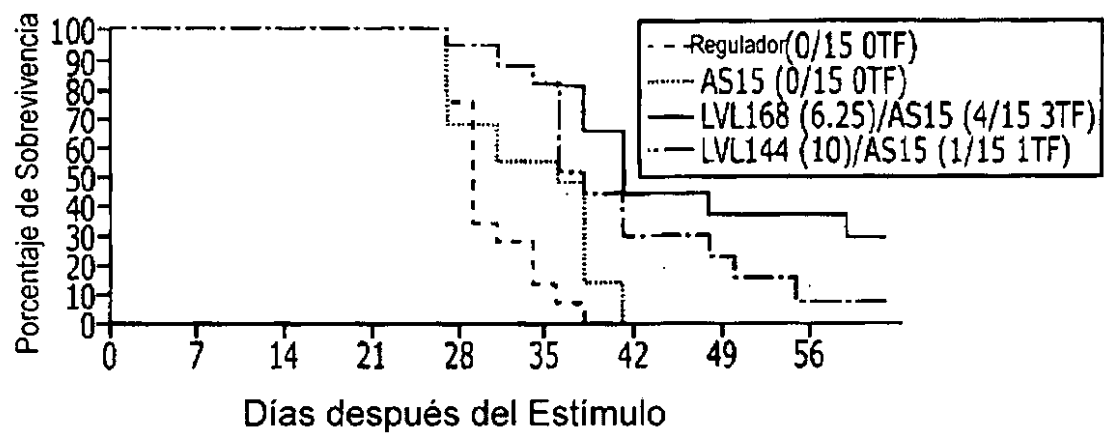


FIG. 29 (Superior)

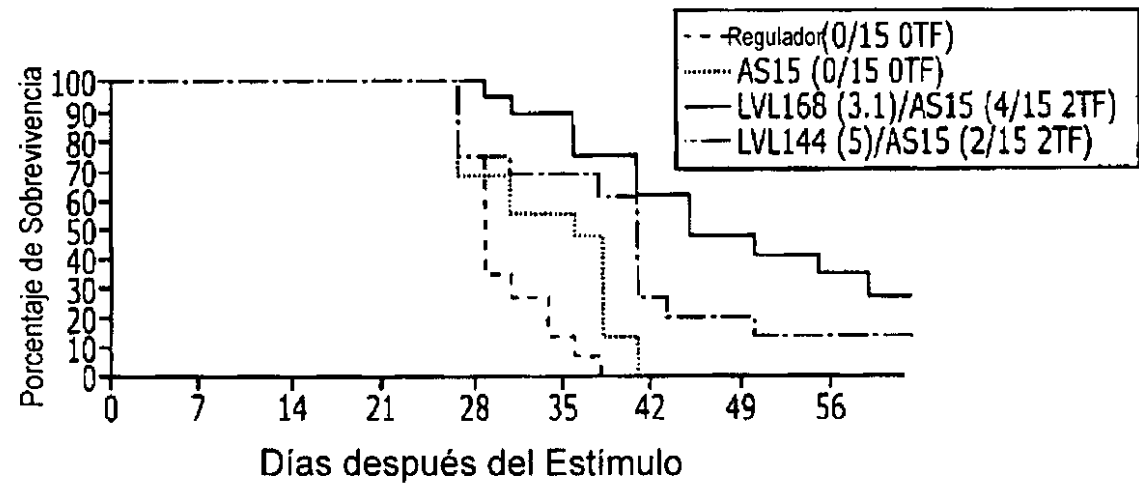


FIG. 29 (Media)

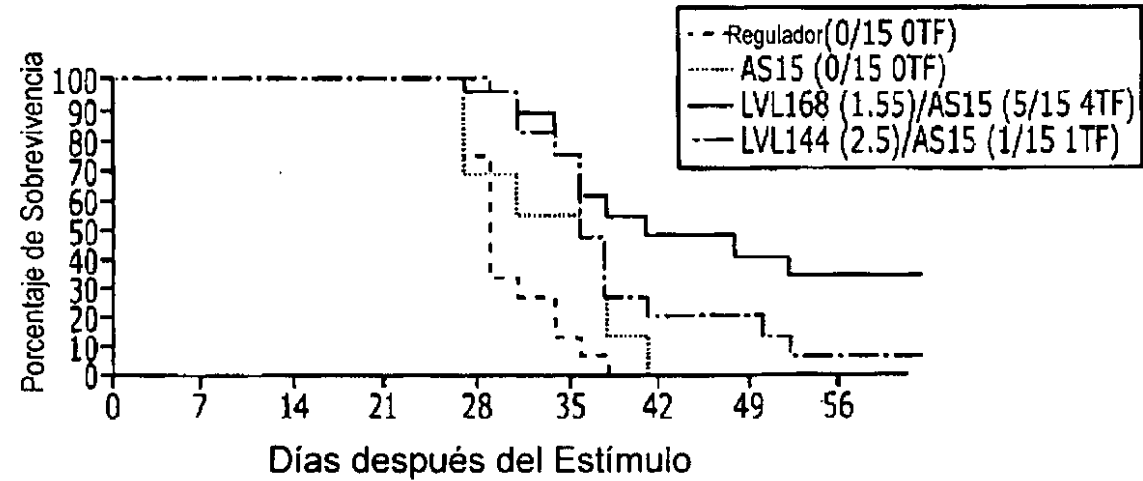
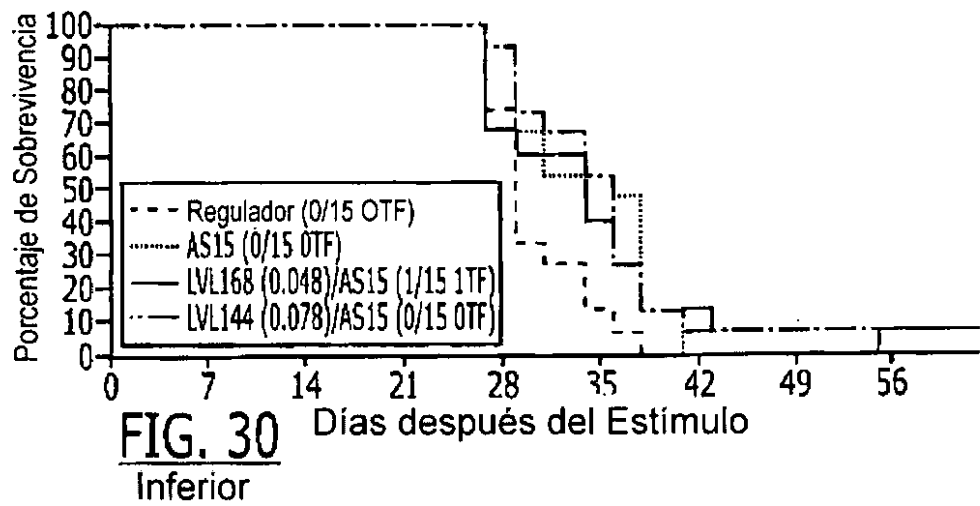
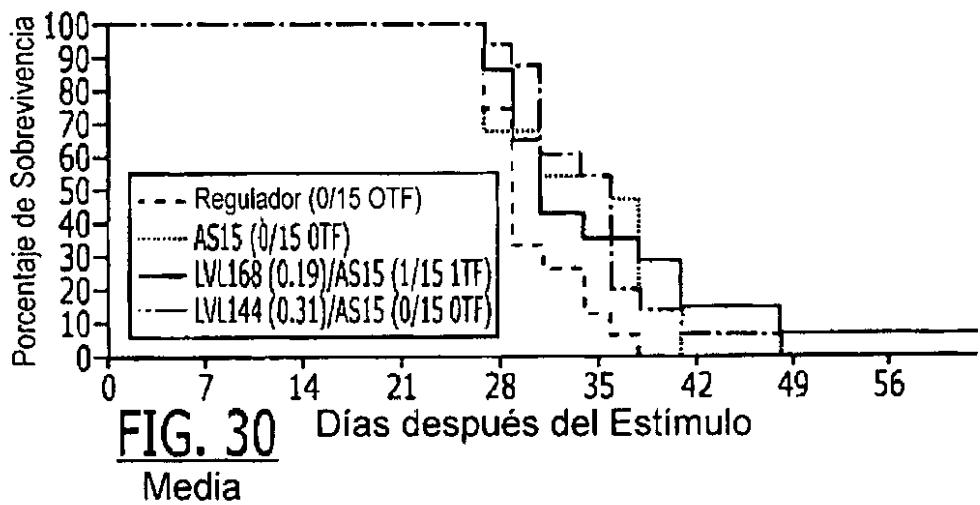
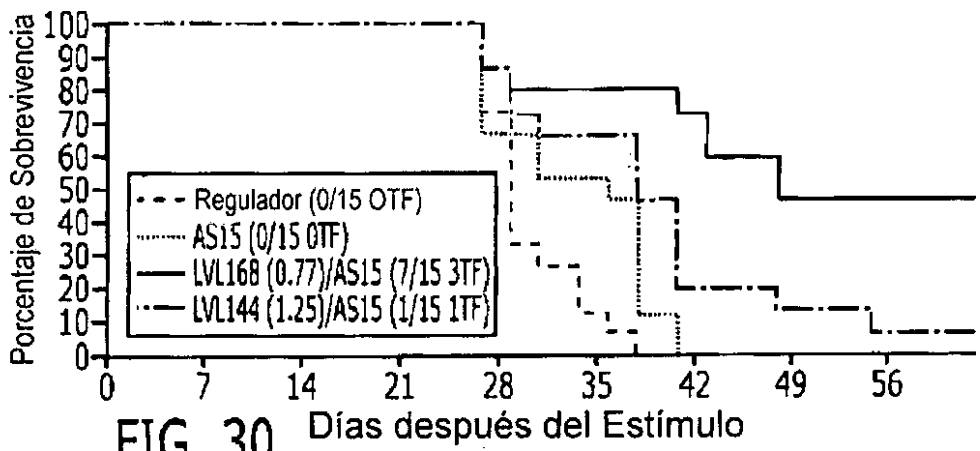


FIG. 29 (Inferior)



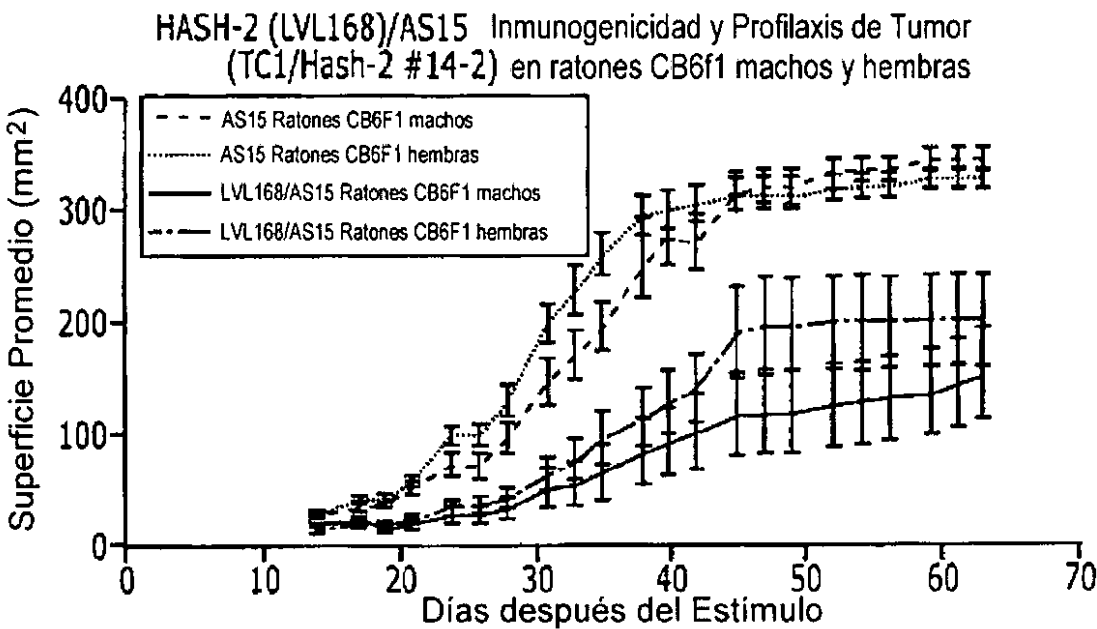


FIG. 31
Superior

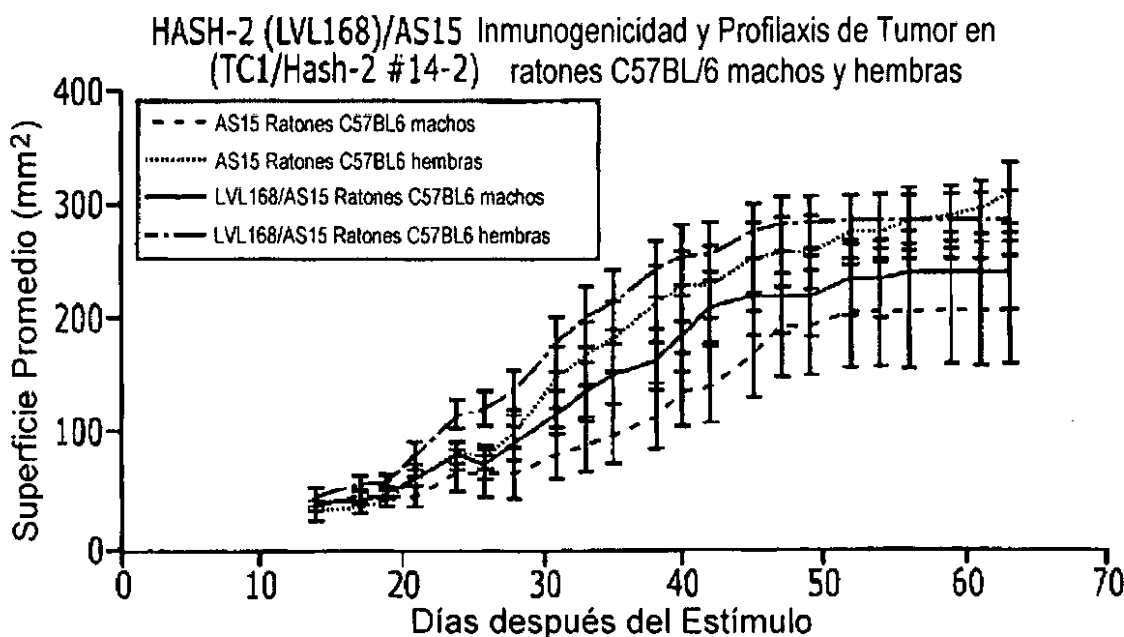


FIG. 31
Inferior

Eficacia anti-tumoral de HASH-2 (LVL168)
y comparación de géneros en ratones CB6F1 y C57BL/6 (120 ratones)

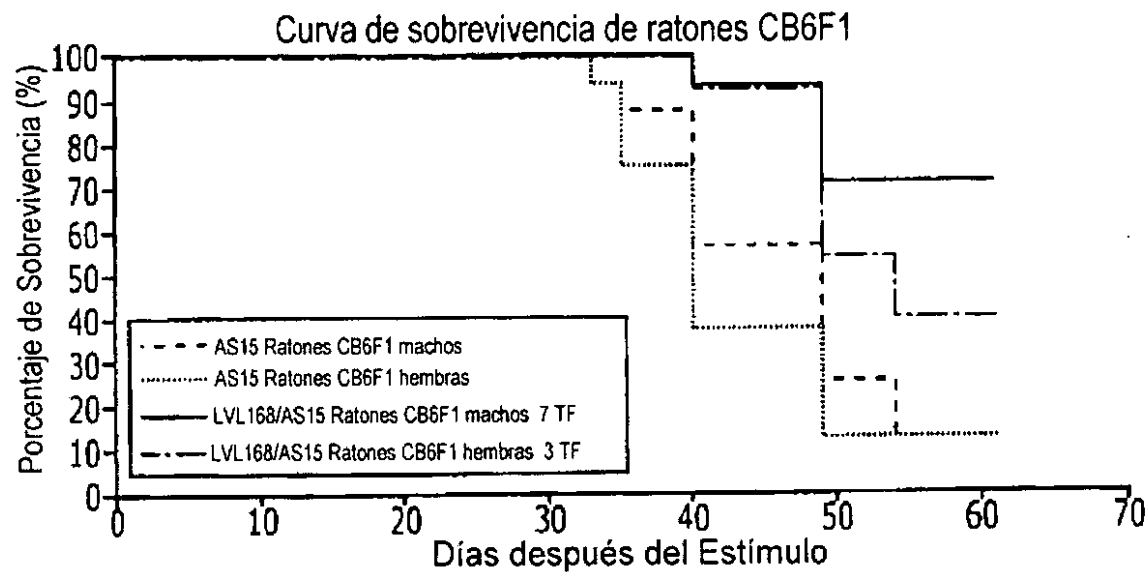


FIG. 32
Superior

Eficacia anti-tumoral de HASH-2 (LVL168) y comparación
de géneros en ratones CB6F1 y C57BL/6 (120 ratones)

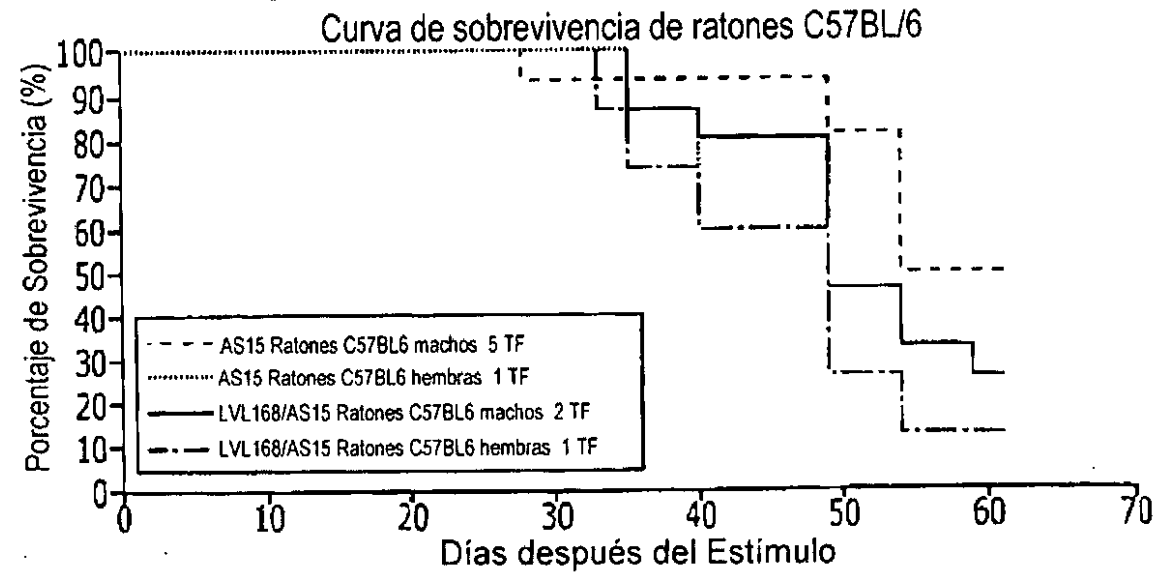


FIG. 32
Inferior

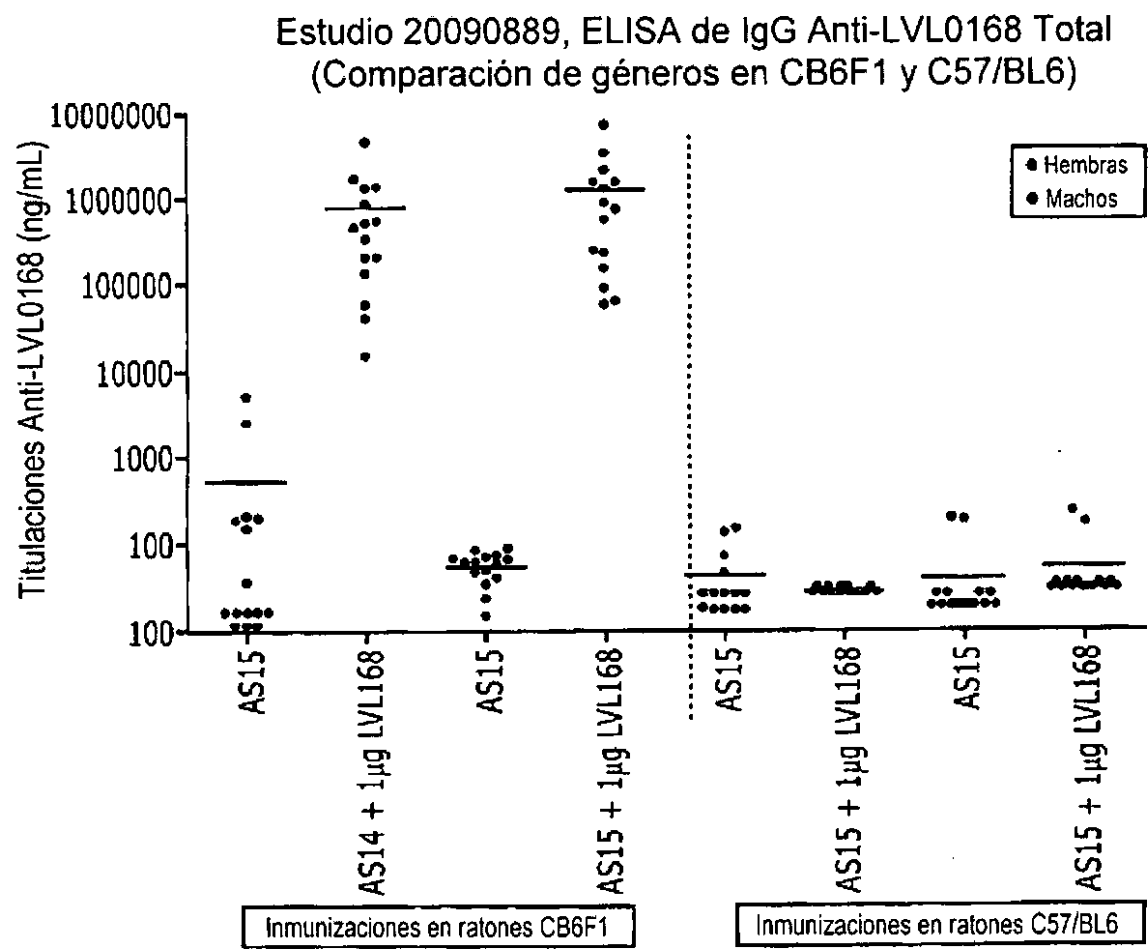


FIG. 33

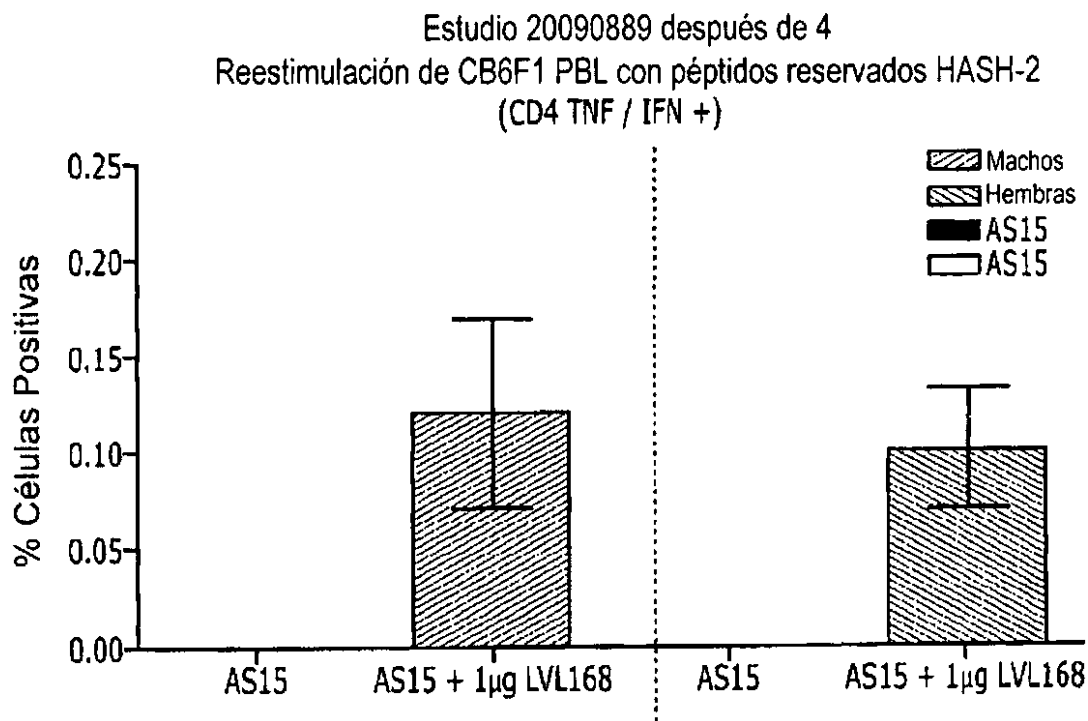


FIG. 34

Superior

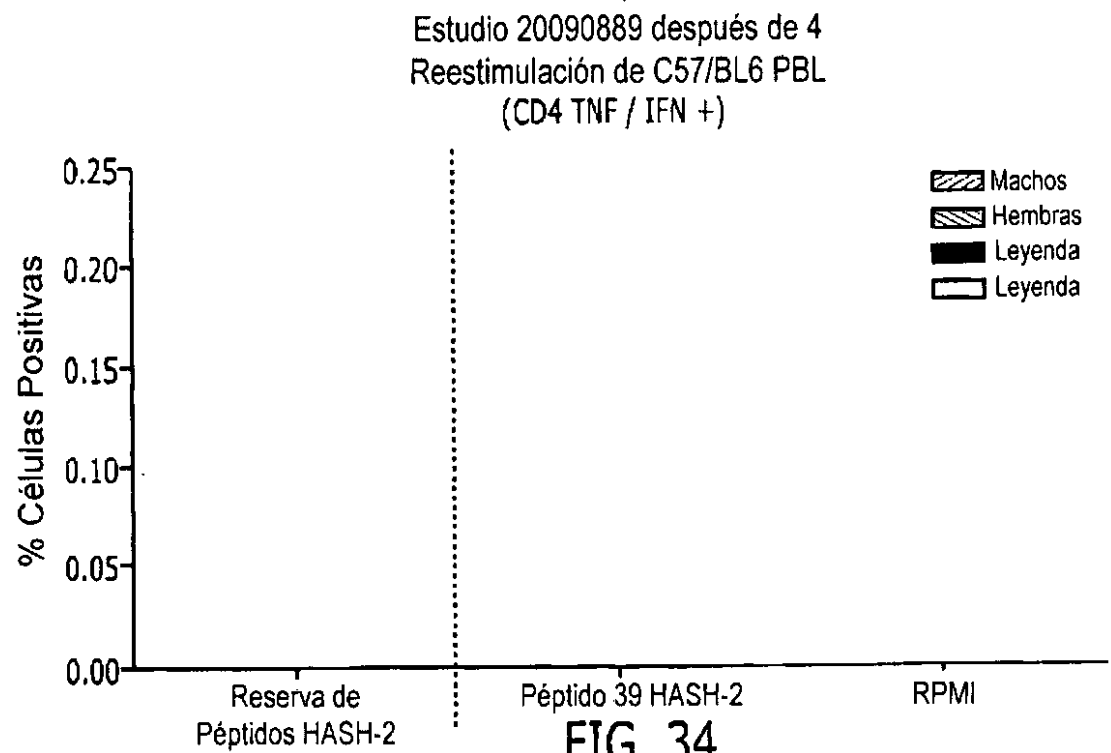


FIG. 34

Inferior

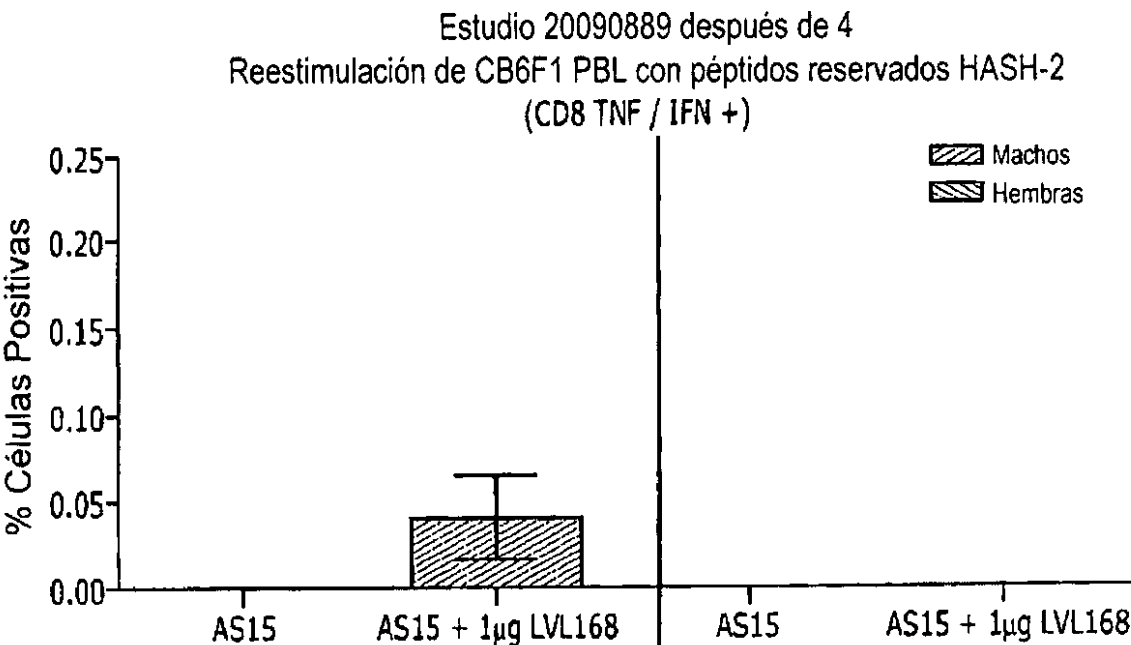


FIG. 35
Superior

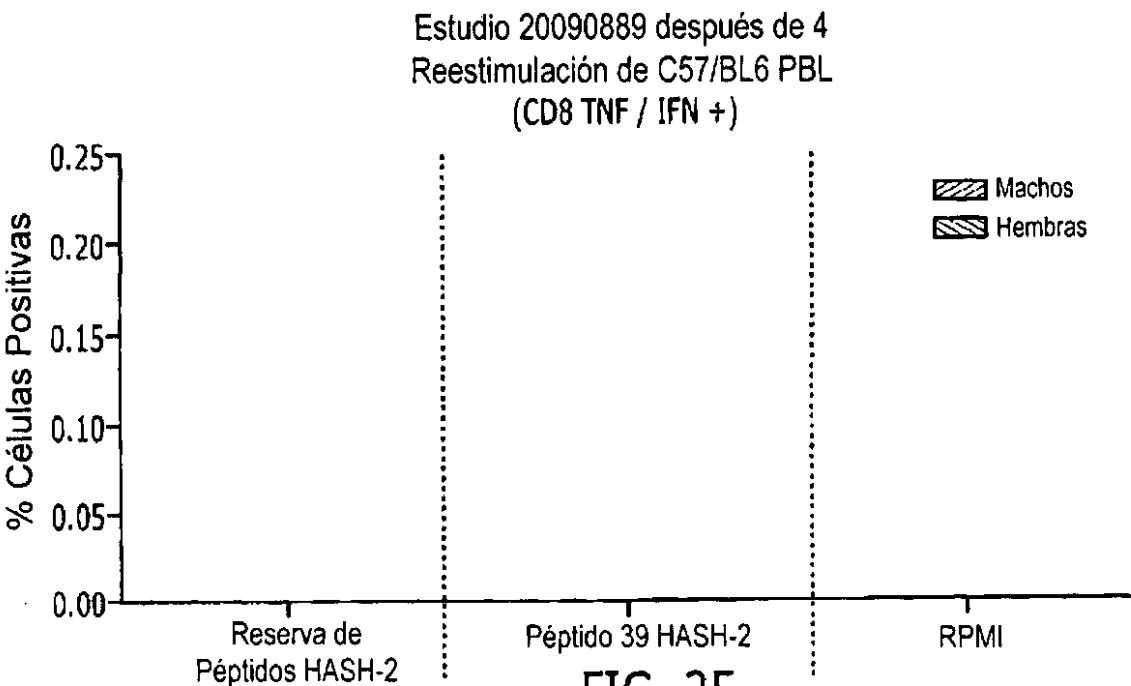


FIG. 35
Inferior

~9224681.txt

LISTADO DE SECPUENCIAS

<110> Blais, Normand
Harvey, Martine
Anthony Pilorget
Clement Rioux

<120> Construcciones de CASB7439

<130> VR63365P1

<140> Por asignarse

<141>

<160> 98

<170> FastSEQ para windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 1

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

<210> 2

<211> 423

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 2

atgggccatc	atcatcatca	tcatcatcat	catcacagca	gcggccatat	cgacgacgac	60
gacaagcata	tggatggtgg	caccctgccg	cgtagcgctc	cgccggcacc	gccggttccg	120
gttggttggtg	cggcgcgtcg	tcgtccggcg	agcccggaac	tgctgcgttg	cagccgtcgt	180
cgccgtccgg	ccaccgcgga	aaccggtggt	ggtgcggcag	cggttgcgcg	tcgtaacgaa	240
cgtgaacgta	accgtgtgaa	actggtgaac	ctgggccttc	aggcgctgcg	tcagcatgtg	300

~9224681.txt
ccgcatggcg gtgcgagcaa aaaactgagc aaagtggaaa ccctgcgtag cgcggtggaa 360
tatattcgtg cgctgcaacg tctgctggcc gaacatgatg cgggtgcgtaa cgcgctggcc 420
taa 423

<210> 3
<211> 201
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 3
Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15
Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser
20 25 30
Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg
35 40 45
Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala
50 55 60
Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu
65 70 75 80
Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu
85 90 95
Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val
100 105 110
Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu
115 120 125
Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg
130 135 140
Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro
145 150 155 160
Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly
165 170 175
Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu
180 185 190
Gly Gly Tyr His His His His His His
195 200

<210> 4
<211> 606
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 4
atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
gacaagcata tggatggtgg caccctgccg cgtagcgcac cgccggctcc gccggttccg 120
gttggttgtg cggcgcgctg tctccggcg agcccggaa tgctgcgttg cagccgtcgt 180
cgccgtccgg ccaccgcgga aaccggtggt ggtgcggcag cggttgcgcg tcgtaacgaa 240
cgtgaacgta accgtgtgaa actggtgaac ctgggctttc aggcgctgctg tcagcatgtg 300
ccgcatggcg gtgcgagcaa aaaactgagc aaagtggaaa ccctgcgtag cgcggtggaa 360
tatattcgtg cgctgcaacg tctgctggcc gaacatgatg cgggtgcgtaa cgcgctggcc 420
ggtggtctgc gtccgcaggc ggttcgtccg agcgcgccgc gtggtggtag cagcgaaccg 480
ggtagcccg ctagcgccta tagcagcgat gatagcggct gcgaagggtgc cctgagcccg 540
gcggaacgtg aactgctgga ttttagcagc tggctgggcg gctatcatca tcatcaccat 600
cattaa 606

<210> 5

~9224681.txt

<211> 195
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 5
Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15
Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser
20 25 30
Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg
35 40 45
Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala
50 55 60
Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu
65 70 75 80
Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu
85 90 95
Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val
100 105 110
Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu
115 120 125
Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg
130 135 140
Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro
145 150 155 160
Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly
165 170 175
Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu
180 185 190
Gly Gly Tyr
195

<210> 6
<211> 588
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 6
atggggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
gacaagcata tggatggtgg caccctgccg cgtagcgcac cgccggctcc gccggttccg 120
gttggttggt cggcgcgtcg tcgtccggcg agcccggaaac tgctgcgttg cagccgtcgt 180
cgccgtccgg ccaccgcgga aaccggtggt ggtgcggcag cggttgccgc tcgtaacgaa 240
cgtgaacgta accgtgtgaa actggtgaac ctgggctttc aggcgctgcg tcagcatgtg 300
ccgcatggcg gtgcgagcaa aaaactgagc aaagtggaaa ccctgcgtag cgcggtggaa 360
tatattcgtg cgctgcaacg tctgctggcc gaacatgatg cggtgcgtaa cgcgctggcc 420
ggtggtctgc gtccgcaggc ggttcgtccg agcgcgccgc gtggtggtag cagcgaaccg 480
ggtagcccg gtagcgcta tagcagcgat gatagcggct gcgaagggtg cctgagcccc 540
gcggaacgtg aactgctgga ttttagcagc tggctgggcg gctattaa 588

<210> 7
<211> 293
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

~9224681.txt

<400> 7

Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
1 5 10 15
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
20 25 30
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Ala Asp
35 40 45
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
50 55 60
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
65 70 75 80
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Ala
100 105 110
Ala Ala His Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala
115 120 125
Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro
130 135 140
Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr
145 150 155 160
Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn
165 170 175
Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val
180 185 190
Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg
195 200 205
Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His
210 215 220
Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val
225 230 235 240
Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg
245 250 255
Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro
260 265 270
Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr His
275 280 285
His His His His His
290

<210> 8

<211> 882

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 8

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgtaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaatc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accgcggccg cacatatgga tgggtggcacc 360
ctgccgcgta gcgcaccgcc ggctccgccg gttccggttg gttgtgcggc gcgtcgtcgt 420
ccggcgagcc cggaaactgct gcgttgacgc cgtcgtcgcc gtccggccac cgcggaaacc 480
ggtggtggtg cggcagcggg tgcgcgtcgt aacgaacgtg aacgtaaccg tgtgaaactg 540
gtgaacctgg gctttcaggc gctgcgtcag catgtgccgc atggcgggtg gagcaaaaaa 600
ctgagcaaag tggaaaccct gcgtagcgcg gtggaatata ttcgtgcgct gcaacgtctg 660
ctggccgaac atgatgcggg gcgtaacgcg ctggccgggt gtctgcgtcc gcaggcgggt 720

Página 4

~9224681.txt

```

cgtccgagcg cgccgcgtgg tggtagcagc gaaccgggta gcccgcgtag cgcctatagc 780
agcgatgata gcggctgcga aggtgccctg agcccggcgg aacgtgaact gctggatttt 840
agcagctggc tgggcggcta tcatcatcat caccatcatt aa 882

```

<210> 9
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 9

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5				10					15		
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
		20						25				30			
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
		35					40					45			
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
	50				55					60					
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
65				70				75							80
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr
			85					90					95		
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Asp
			100					105					110		
Gly	Gly	Thr	Leu	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Pro	Val
		115					120					125			
Gly	Cys	Ala	Ala	Arg	Arg	Arg	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Arg	Cys
	130					135					140				
Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Ala	Thr	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala
145					150				155						160
Ala	Val	Ala	Arg	Arg	Asn	Glu	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Val	Lys	Leu	Val
			165					170						175	
Asn	Leu	Gly	Phe	Gln	Ala	Leu	Arg	Gln	His	Val	Pro	His	Gly	Gly	Ala
		180						185					190		
Ser	Lys	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Glu	Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Val	Glu	Tyr
		195					200					205			
Ile	Arg	Ala	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	His	Asp	Ala	Val	Arg	Asn
	210					215					220				
Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	Leu	Arg	Pro	Gln	Ala	Val	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro
225					230				235						240
Arg	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser
			245					250					255		
Asp	Asp	Ser	Gly	Cys	Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu	Arg	Glu	Leu
		260						265				270			
Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Trp	Leu	Gly	Gly	Tyr	His	His	His	His	His	His
		275					280					285			

<210> 10
 <211> 867
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 10

```

atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180

```

~9224681.txt
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accgatgggtg gcaccctgcc gcgtagcgca 360
ccgccggctc cgccggttcc gggttggtgt gcggcgcgtc gtcgtccggc gagcccgga 420
ctgctgcgtt gcagccgtcg tcgccgtccg gccaccgcgg aaaccggtgg tggtagcgca 480
gcggttgctc gtcgtaacga acgtgaacgt aaccgtgtga aactggtgaa cctgggcttt 540
caggcgctgc gtcagcatgt gccgcatggc ggtgcgagca aaaaactgag caaagtggaa 600
accctgcgta gcgcggtgga atatatctgt gcgctgcaac gtctgctggc cgaacatgat 660
gcggtgcgta acgcgctggc cggtggtctg cgtccgcagg cggttcgtcc gagcgcgccg 720
cgtggtggta gcagcgaacc gggtagcccc cgtagcgcct atagcagcga tgatagcgcc 780
tgcgaagggtg ccctgagccc ggcggaacgt gaactgctgg attttagcag ctggctgggc 840
ggctatcatc atcatcacca tcattaa 867

<210> 11
<211> 182
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 11
Met His His His His His His His His His His Asp Gly Gly Thr Leu
1 5 10 15
Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala
20 25 30
Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg
35 40 45
Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg
50 55 60
Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe
65 70 75 80
Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu
85 90 95
Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu
100 105 110
Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly
115 120 125
Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Gly Ser
130 135 140
Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly
145 150 155 160
Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser
165 170 175
Ser Trp Leu Gly Gly Tyr
180

<210> 12
<211> 549
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 12
atgcatcatc atcatcatca tcatcatcat catgacgggtg gcaccctgcc gcgtagcgca 60
ccgccggctc cgccggttcc gggttggtgt gcggcgcgtc gtcgtccggc gagcccgga 120
ctgctgcgtt gcagccgtcg tcgccgtccg gccaccgcgg aaaccggtgg tggtagcgca 180
gcggttgctc gtcgtaacga acgtgaacgt aaccgtgtga aactggtgaa cctgggcttt 240
caggcgctgc gtcagcatgt gccgcatggc ggtgcgagca aaaaactgag caaagtggaa 300
accctgcgta gcgcggtgga atatatctgt gcgctgcaac gtctgctggc cgaacatgat 360

~9224681.txt

```

gcggtgcgta acgcgctggc cggtggtctg cgccgcagg cggttcgtcc gagcgcgccg 420
cgtggtggta gcagcgaacc gggtagcccg cgtagcgctt atagcagcga tgatagcggc 480
tgcgaagggtg ccctgagccc ggcggaacgt gaactgctgg attttagcag ctggctgggc 540
ggctattaa

```

<210> 13
 <211> 193
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 13

```

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

```

<210> 14
 <211> 582
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 14

```

atggacggcg gcacactgcc caggtccgcg cccctgctgc ccccggtccc tgtcggctgc 60
gctgcccggc ggagacccgc gtccccggaa ctgttgctgc gcagccggcg gcggcgaccg 120
gccaccgcag agaccggagg cggcgagcgc gccgtagcgc ggcgcaatga gcgcgagcgc 180
aaccgcgtga agctggtgaa cttgggcttc caggcgctgc ggcagcacgt gccgcacggc 240
ggcgccagca agaagctgag caaggtggag acgctgcgct cagccgtgga gtacatccgc 300
gcgctgcagc gcctgctggc cgagcacgac gccgtgcgca acgcgctggc gggagggctg 360
aggccgcagg ccgtgcggcc gtctgcgccc cgcgggccgc cagggaccac cccggctgcc 420
gcctcgccct cccgcgcttc ttcgtccccg ggccgcgggg gcagctcgga gcccggctcc 480
ccgcgttccg cctactcgtc ggacgacagc ggctgcgaag gcgcgctgag tcctgcggag 540
cgcgagctac tcgacttctc cagctgggta gggggctact ga 582

```

<210> 15

~9224681.txt

<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 15
Met Gly His His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1 5 10 15
Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser
20 25 30
Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Leu Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg
35 40 45
Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala
50 55 60
Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu
65 70 75 80
Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu
85 90 95
Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val
100 105 110
Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu
115 120 125
Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg
130 135 140
Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr
145 150 155 160
Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly
165 170 175
Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp
180 185 190
Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp
195 200 205
Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr
210 215

<210> 16
<211> 651
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 16
atggggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
gacaagcata tggacggcgg cacactgccc aggtccgcgc cccctgcgcc ccccgtcctt 120
gtcggctgcg ctgcccggcg gagaccgcg tccccggaac tgttgcgctg cagccggcgg 180
cggcgaccgg ccaccgcaga gaccggaggc ggcgacgcg ccgtagcgcg gcgcaatgag 240
cgcgagcgca accgcgtgaa gctggtgaac ttgggcttcc aggcgctgcg gcagcacgtg 300
ccgcacggcg gcgccagcaa gaagctgagc aaggtggaga cgctgcgctc agccgtggag 360
tacatccgcg cgctgcagcg cctgctggcc gagcacgacg ccgtgcgcaa cgcgctggcg 420
ggagggctga ggccgcaggc cgtgcggccg tctgcgccc gcgggccgcc agggaccacc 480
ccggtcgccg cctcgccctc ccgcgcttct tctgccccgg gccgcggggg cagctcggag 540
cccggctccc cgcgttcgc ctactcgtcg gacgacagcg gctgcgaagg cgcgctgagt 600
cctgcggagc gcgagctact cgacttctcc agctggtag ggggctactg a 651

<210> 17
<211> 216
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 17

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

<210> 18

<211> 651

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 18

atgggcatc	atcatcatca	tcatcatcat	catcacagca	gcggccatat	cgacgacgac	60
gacaagcata	tggacggcgg	cacactgccc	aggtccgcgc	cccctgcgcc	ccccgtccct	120
gtcggctgcg	ctgcccggcg	gagaccgcgc	tccccggaac	tggtgcgctg	cagccggcgg	180
cggcgaccgg	ccaccgcaga	gaccggaggc	ggcgagcgcg	ccgtagcgcg	gcgcaatgag	240
cgcgagcgca	accgcgtgaa	gctggtgaac	ttgggcttcc	aggcgctgcg	gcagcacgtg	300
ccgcacggcg	gcgccagcaa	gaagctgagc	aaggtggaga	cgctgcgctc	agccgtggag	360
tacatccgcg	cgctgcagcg	cctgctggcc	gagcacgacg	ccgtgcgcaa	cgcgctggcg	420
ggagggctga	ggccgcaggc	cgtgcggccg	tctgcgcccc	gcgggcccgc	agggaccacc	480
ccggtcgcgc	cctcgccctc	ccgcgcttct	tcgtccccgc	gccgcggggg	cagctcggag	540
cccggctccc	cgcgttccgc	ctactcgtcg	gacgacagcg	gctgcgaagg	cgcgctgagt	600
cctgcgggagc	gcgagctact	cgacttctcc	agctgggttag	ggggctactg	a	651

<210> 19

<211> 216

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

~9224681.txt

<400> 19

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

<210> 20

<211> 651

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 20

```
atggggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
gacaagcata tggatggtgg caccctgccg cgtacgctc cgccggcacc gccggttccg 120
gttggttggtg cggcgctcg tcgtccggcg agcccgggaa tgctgcgttg cagccgtcgt 180
cgccgtccgg ccaccgcgga aaccggtggt ggtgcggcag cggttgcgcg tcgtaacgaa 240
cgtgaacgta accgtgtgaa actggtgaac ctgggctttc aggcgctgcg tcagcatgtg 300
ccgcatggcg gtgcgagcaa aaaactgagc aaagtggaaa ccctgcgtag cgcggtggaa 360
tatattcgtg cgctgcaacg tctgctggcc gaacatgatg cggcgctgta cgcgctggcc 420
ggtggtctgc gtccgcaggc ggttcgtccg agcgaccgc gtggtccgcc ggttacgacg 480
ccggttcgag cgagcccag cgtgcgagc agctctccgg gtcgtggtgg tagcagcgaa 540
ccgggtagcc cgcgtagcgc ctatagcagc gatgatagcg gctgcgaagg tgccctgtct 600
ccggcggaac gtgaactgct ggattttagc agctggctgg gcggctatta a 651
```

<210> 21

<211> 199

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 21

```
Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
```

~9224681.txt

```

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

<210> 22
<211> 600
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

```

<400> 22
atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
gacaagcata tggccaccgc ggaaaccggt ggtggtgcgg cagcggttgc gcgtcgtaac 120
gaacgtgaac gtaaccgtgt gaaactggtg aacctgggct ttcaggcgct gcgtcagcat 180
gtgccgcatg gcggtgcgag caaaaaactg agcaaagtgg aaaccctgcg tagcgcggtg 240
gaatatattc gtgcgctgca acgtctgctg gccgaacatg atgcggtgcg taacgcgctg 300
gccggtggtc tgcgtccgca ggcggttcgt ccgagcgcac cgcgtggtcc gccgggtacg 360
acgccggtg cagcgagccc gagccgtgcg agcagctctc cgggtcgtgg tggtagcagc 420
gaaccgggta gcccgctag cgcctatagc agcgatgata gcggctgcga aggtgccctg 480
tctccggcgg aacgtgaact gctggatttt agcagctggc tgggcggcta tctcgaggat 540
ccggtcgcta acaaagcccg aaaggaagct gaggttggctg ctgccaccgc tgagcaataa 600
```

<210> 23
<211> 157
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

```

<400> 23
Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
1      5      10      15
Ile Asp Asp Asp Lys His Met Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu
20      25      30
Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys
35      40      45
```

~9224681.txt

Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Glu	Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Val	Glu	Tyr	Ile	Arg
50						55				60					
Ala	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	His	Asp	Ala	Val	Arg	Asn	Ala	Leu
65					70					75					80
Ala	Gly	Gly	Leu	Arg	Pro	Gln	Ala	Val	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro	Arg	Gly
			85						90					95	
Pro	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Val	Ala	Ala	Ser	Pro	Ser	Arg	Ala	Ser	Ser
			100					105					110		
Ser	Pro	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala
		115				120						125			
Tyr	Ser	Ser	Asp	Asp	Ser	Gly	Cys	Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu
	130					135					140				
Arg	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Trp	Leu	Gly	Gly	Tyr			
145					150					155					

<210> 24
 <211> 474
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 24
 atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
 gacaagcata tgaaccgtgt gaaactgggt aacctgggct ttcaggcgct gcgtcagcat 120
 gtgccgcatg gcggtgctgag caaaaaactg agcaaagtgg aaaccctgcg tagcgcggtg 180
 gaatatattc gtgcgctgca acgtctgctg gccgaacatg atgcggtgcg taacgcgctg 240
 gccgggtggc tgcgtccgca ggcggttcgt ccgagcgcac cgcgtggtcc gccgggtacg 300
 acgcccgttg cagcagagccc gagccgtgcg agcagctctc cgggtcgtgg tggtagcagc 360
 gaaccgggta gcccgcgtag cgcctatagc agcgatgata gcggctgcga aggtgccctg 420
 tctccggcgg aacgtgaact gctggatttt agcagctggc tgggcggcta ttaa 474

<210> 25
 <211> 93
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 25
 Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
 1 5 10 15
 Ile Asp Asp Asp Asp Lys His Met Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn
 20 25 30
 Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala
 35 40 45
 Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys
 50 55 60
 Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg
 65 70 75 80
 Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala
 85 90

<210> 26
 <211> 282
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 26

```
atgggccatc atcatcatca tcatcatcat catcacagca gcggccatat cgacgacgac 60
gacaagcata tggcggcagc ggttgccgct cgtaacgaac gtgaacgtaa ccgtgtgaaa 120
ctggtgaacc tgggctttca ggcgctgctg cagcatgtgc cgcattggcg tgcgagcaaa 180
aaactgagca aagtggaaac cctgcgtagc gcggtggaat atattcgtgc gctgcaacgt 240
ctgctggccg aacatgatgc ggtgcgtaac gcgctggcct aa 282
```

<210> 27

<211> 178

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 27

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

<210> 28

<211> 537

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 28

```
atggatgggtg gcaccctgcc gcgtagcgca ccgccggctc gcgccggttc gggttggttgt 60
gcggcgcgctc gtcgtccggc gagcccggaa ctgctgcgtt gcagccgtcg tcgccgtccg 120
gccaccgcgg aaaccgggtg tggtagcgca gcggttgctg gtcgtaacga acgtgaacgt 180
aaccgtgtga aactgggtgaa cctgggcttt caggcgctgc gtcagcatgt gccgcatggc 240
ggtgcgagca aaaaactgag caaagtggaa accctgcgta gcgcggtgga atatattcgt 300
gcgctgcaac gtctgctggc cgaacatgat gcggtgcgta acgcgctggc cggtaggtctg 360
cgtccgcagg cggttcgtcc gagcgcgccg cgtggtggta gcagcgaacc gggtagcccc 420
cgtagcgctt atagcagcga tgatagcggc tgcgaagggt ccctgagccc ggcggaacgt 480
gaactgctgg attttagcag ctggctgggc ggctatcatc atcatcacca tcattaa 537
```

~9224681.txt

```
cgttttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accgcggccg caatggatgg tggcaccctg 360
ccgcgtagcg ctccgccggc accgccggtt ccggttggtt gtgcggcgcg tcgtcgtccg 420
gcgagccccg aactgctgcg ttgcagccgt cgtcgccgct cggccaccgc ggaaaccggt 480
ggtggtgctg cagcggttgc gcgtcgtaac gaacgtgaac gtaaccgtgt gaaactggtg 540
aacctgggct ttcaggcgct gcgtcagcat gtgccgcatg gcggtgagag caaaaaactg 600
agcaaagtgg aaaccctgcg tagcgcggtg gaatatattc gtgcgctgca acgtctgctg 660
gccgaacatg atgcggtgcg taacgcgctg gccggtggtc tgcgtccgca ggcggttcgt 720
ccgagcgcac cgcgtggtcc gccgggtacg acgcccgttg cagcagagccc gagccgtgctg 780
agcagctctc cgggtcgtgg tggtagcagc gaaccgggta gcccgcgtag cgcctatagc 840
agcgatgata gcggtgctga aggtgccctg tctccggcgg aacgtgaact gctggatttt 900
agcagctggc tgggcggcta tctcagcagc caccaccacc accactga 948
```

<210> 31
<211> 201
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 31
Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15
Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu
20 25 30
Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly
35 40 45
Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys
50 55 60
Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly
65 70 75 80
Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val
85 90 95
Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val
100 105 110
Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser
115 120 125
Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser
130 135 140
Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Glu Pro Gly Ser
145 150 155 160
Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu
165 170 175
Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly
180 185 190
Tyr Leu Glu His His His His His His
195 200

<210> 32
<211> 606
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 32
atggatgggtg gcaccctgcc gcgtagcgct ccgccggcac cgccggttcc gggttggttgt 60
gcggcgcgct gtcgtccggc gagcccgga ctgctgcgtt gcagccgctg tcgccgtccg 120
gccaccgcgg aaaccgggtg tggtagcgga gcggttgctg gtcgtaacga acgtgaacgt 180

Página 15

~9224681.txt

```
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagttag aaatgacaga aaactttgaa accgcggccg caatggatgg tggcaccctg 360
ccgcgtagcg ctccgccggc accgccggtt ccggttggtt gtgcggcgcg tcgtcgtccg 420
gcgagccccg aactgctgcg ttgcagccgt cgtcgccgtc cggccaccgc ggaaaccggt 480
ggtggtgctg cagcggttgc gcgtcgtaac gaacgtgaac gtaaccgtgt gaaactggtg 540
aacctgggct ttcaggcgt gcgtcagcat gtgccgcatg gcggtgagag caaaaaactg 600
agcaaagtgg aaaccctgcg tagcgcggtg gaatatattc gtgcgctgca acgtctgctg 660
gccgaacatg atgcggtgcg taacgcgctg gccggtggtc tgcgtccgca ggcggttcgt 720
ccgagcgcac cgcgtggtcc gccgggtacg acgcccgttg cagcgagccc gagccgtgctg 780
agcagctctc cgggtcgtgg tggtagcagc gaaccgggta gcccgctag cgcctatagc 840
agcgatgata gcggtgagca aggtgccctg tctccggcgg aacgtgaact gctggatttt 900
agcagctggc tgggcggcta tctcagcac caccaccacc accactga 948
```

<210> 31
<211> 201
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 31
Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val
1 5 10 15
Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu
20 25 30
Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly
35 40 45
Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys
50 55 60
Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly
65 70 75 80
Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val
85 90 95
Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val
100 105 110
Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser
115 120 125
Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser
130 135 140
Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser
145 150 155 160
Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu
165 170 175
Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly
180 185 190
Tyr Leu Glu His His His His His His
195 200

<210> 32
<211> 606
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 32
atggatggtg gcaccctgcc gcgtagcgct ccgccggcac cgccggttcc gggttggttgt 60
gcggcgctgc gtcgtccggc gagcccgaa ctgctgcgtt gcagccgtcg tcgccgtccg 120
gccaccgcgg aaaccggtgg tggtagcgca gcggttgcgc gtcgtaacga acgtgaacgt 180

Página 15

~9224681.txt

<210> 29
<211> 315
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 29
Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
1 5 10 15
Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
20 25 30
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
35 40 45
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
50 55 60
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
65 70 75
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Ala
100 105 110
Ala Ala Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro
115 120 125
Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu
130 135 140
Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly
145 150 155 160
Gly Gly Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg
165 170 175
Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro
180 185 190
His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser
195 200 205
Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp
210 215 220
Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg
225 230 235 240
Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser
245 250 255
Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro
260 265 270
Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly
275 280 285
Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu
290 295 300
Gly Gly Tyr Leu Glu His His His His His
305 310 315

<210> 30
<211> 948
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 30
atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgtaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180

Página 14

~9224681.txt

```

aaccgtgtga aactggtgaa cctgggcttt caggcgctgc gtcagcatgt gccgcatggc 240
ggtgctgagca aaaaactgag caaagtggaa accctgcgta gcgcggtgga atatattcgt 300
gcgctgcaac gtctgctggc cgaacatgat gcggtgctga acgcgctggc cgggtggtctg 360
cgtccgcagg cgggtcgtcc gagcgcaccg cgtggtccgc cgggtacgac gccggttgca 420
gcgagccccga gccgtgctgag cagctctccg ggtcgtggtg gtagcagcga accgggtagc 480
ccgcgtagcg cctatagcag cgatgatagc ggctgcgaag gtgccctgtc tccggcggaa 540
cgtgaactgc tggattttag cagctggctg ggcggtatc tcgagcacca ccaccaccac 600
cactga 606

```

<210> 33
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 33
 Met His His His His His Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala
 1 5 10 15
 Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro
 20 25 30
 Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr
 35 40 45
 Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg
 50 55 60
 Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg
 65 70 75 80
 Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu
 85 90 95
 Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu
 100 105 110
 Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro
 115 120 125
 Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly
 130 135 140
 Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala
 145 150 155 160
 Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly
 165 170 175
 Gly Tyr

<210> 34
 <211> 537
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 34
 atgcaccatc accatcacca tgatggtggc accctgccgc gtagcgcacc gccggctccg 60
 ccggttccgg ttggttgtgc ggcgcgtcgt cgtccggcga gcccggaaact gctgcgttgc 120
 agccgtcgtc gccgtccggc caccgcggaa accggtggtg gtgcggcagc ggttgcgcgt 180
 cgtaacgaac gtgaacgtaa ccgtgtgaaa ctggtgaacc tgggctttca ggcgctgcgt 240
 cagcatgtgc cgcattggcg tgagagcaaa aaactgagca aagtggaaac cctgcgtagc 300
 gcggtggaat atattcgtgc gctgcaacgt ctgctggccg aacatgatgc ggtgcgtaac 360
 gcgctggccg gtggtctgctg tccgcaggcg gttcgtccga gcgcgccgcg tgggtgtagc 420
 agcgaaccgg gtagcccgcg tagcgcctat agcagcgatg atagcggctg cgaagggtgcc 480
 ctgagcccgg cggaacgtga actgctggat ttagcagct ggctgggcgg ctattaa 537

~9224681.txt

<210> 35
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador de plásmido de E. coli

<400> 35
atgcatcatc atcatcatca tgac

24

<210> 36
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Enlazador de plásmido de E. coli

<400> 36
atgcaccatc accatcacca tgat

24

<210> 37
<211> 178
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 37
Met His His His His His Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala
1 5 10 15
Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro
20 25 30
Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr
35 40 45
Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg
50 55 60
Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg
65 70 75 80
Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu
85 90 95
Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu
100 105 110
Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro
115 120 125
Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly
130 135 140
Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala
145 150 155 160
Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly
165 170 175
Gly Tyr

<210> 38
<211> 537
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 38
atgcatcatc atcatcatca tgacggtggc accctgccgc gtagcgcacc gccggctccg 60
ccggttccgg ttggttgtgc ggcgcgtcgt cgtccggcga gcccggaaact gctgcgttgc 120
agccgtcgtc gccgtccggc caccgcggaa accggtggtg gtgcggcagc ggttgcgcgt 180
cgtaacgaac gtgaacgtaa ccgtgtgaaa ctggtgaacc tgggctttca ggcgctgcgt 240
cagcatgtgc cgcattggcg tgcgagcaaa aaactgagca aagtggaaac cctgcgtagc 300
gcggtggaat atattcgtgc gctgcaacgt ctgctggccg aacatgatgc ggtgcgtaac 360
gcgctggccg gtggtctgcg tccgcaggcg gttcgtccga gcgcgccgcg tggtagtagc 420
agcgaaccgg gtagcccgcg tagcgcctat agcagcgatg atagcggctg cgaagggtgcc 480
ctgagcccg cggaacgtga actgctggat tttagcagct ggctgggcg ctattaa 537

<210> 39

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> H. Influenzae

<400> 39
Met Asp Pro Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys
1 5 10 15
Ser Asp Lys Ile Ile Ala His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro
20 25 30
Glu His Thr Leu Glu Ser Lys Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp
35 40 45
Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val
50 55 60
Ile His Asp His Phe Leu Asp Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe
65 70 75 80
Pro His Arg His Arg Lys Asp Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr
85 90 95
Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr
100 105 110

<210> 40

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 40
atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga atctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggt 180
cgttagtggt ttattcacga tcaactttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
ccacatcgtc atcgtaaaga tggccgttac tatgtcatcg acittacatt aaaagaaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa acc 333

<210> 41

<211> 364

<212> PRT

<213> Proteína D de H. Influenza

<400> 41
Met Lys Leu Lys Thr Leu Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Gly Val Leu
1 5 10 15
Ala Gly Cys Ser Ser His Ser Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys

19224001.txt																
			20						25				30			
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro	
		35					40					45				
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp	
	50					55					60					
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val	
65					70					75					80	
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe	
				85										95		
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr	
			100					105					110			
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Lys	
		115					120					125				
Asp	Gly	Lys	Gln	Ala	Gln	Val	Tyr	Pro	Asn	Arg	Phe	Pro	Leu	Trp	Lys	
	130					135					140					
Ser	His	Phe	Arg	Ile	His	Thr	Phe	Glu	Asp	Glu	Ile	Glu	Phe	Ile	Gln	
145					150					155					160	
Gly	Leu	Glu	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys	Lys	Val	Gly	Ile	Tyr	Pro	Glu	Ile	
				165					170					175		
Lys	Ala	Pro	Trp	Phe	His	His	Gln	Asn	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Glu	
			180					185					190			
Thr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Lys	Lys	Thr	Asp	Met	
		195					200					205				
Val	Tyr	Leu	Gln	Thr	Phe	Asp	Phe	Asn	Glu	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Thr	
	210					215					220					
Glu	Leu	Leu	Pro	Gln	Met	Gly	Met	Asp	Leu	Lys	Leu	Val	Gln	Leu	Ile	
225					230					235					240	
Ala	Tyr	Thr	Asp	Trp	Lys	Glu	Thr	Gln	Glu	Lys	Asp	Pro	Lys	Gly	Tyr	
				245										255		
Trp	Val	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Trp	Met	Phe	Lys	Pro	Gly	Ala	Met	Ala	
			260					265					270			
Glu	Val	Val	Lys	Tyr	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Trp	Tyr	Met	Leu	
		275					280					285				
Val	Asn	Lys	Glu	Glu	Ser	Lys	Pro	Asp	Asn	Ile	Val	Tyr	Thr	Pro	Leu	
	290					295					300					
Val	Lys	Glu	Leu	Ala	Gln	T										

```
<210> 42
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
```

<220>
<223> Marca de poli-histidina del vector de E. coli

```
<400> 42
Met Gly His His His His His His His His His Ser Ser Gly His
 1          5          10          15
Ile Asp Asp Asp Lys His
      20
```

<210>	43
<211>	552
<212>	PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 43

Met	Asp	Pro	Ser	Ser	His	Ser	Ser	Asn	Met	Ala	Asn	Thr	Gln	Met	Lys
1				5					10					15	
Ser	Asp	Lys	Ile	Ile	Ile	Ala	His	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Leu	Pro
		20						25					30		
Glu	His	Thr	Leu	Glu	Ser	Lys	Ala	Leu	Ala	Phe	Ala	Gln	Gln	Ala	Asp
		35					40					45			
Tyr	Leu	Glu	Gln	Asp	Leu	Ala	Met	Thr	Lys	Asp	Gly	Arg	Leu	Val	Val
	50					55					60				
Ile	His	Asp	His	Phe	Leu	Asp	Gly	Leu	Thr	Asp	Val	Ala	Lys	Lys	Phe
65					70					75					80
Pro	His	Arg	His	Arg	Lys	Asp	Gly	Arg	Tyr	Tyr	Val	Ile	Asp	Phe	Thr
			85					90						95	
Leu	Lys	Glu	Ile	Gln	Ser	Leu	Glu	Met	Thr	Glu	Asn	Phe	Glu	Thr	Lys
			100					105					110		
Asp	Gly	Lys	Gln	Ala	Gln	Val	Tyr	Pro	Asn	Arg	Phe	Pro	Leu	Trp	Lys
		115					120					125			
Ser	His	Phe	Arg	Ile	His	Thr	Phe	Glu	Asp	Glu	Ile	Glu	Phe	Ile	Gln
	130					135					140				
Gly	Leu	Glu	Lys	Ser	Thr	Gly	Lys	Lys	Val	Gly	Ile	Tyr	Pro	Glu	Ile
145					150					155					160
Lys	Ala	Pro	Trp	Phe	His	His	Gln	Asn	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Ala	Glu
				165					170					175	
Thr	Leu	Lys	Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Gly	Tyr	Asp	Lys	Lys	Thr	Asp	Met
			180					185					190		
Val	Tyr	Leu	Gln	Thr	Phe	Asp	Phe	Asn	Glu	Leu	Lys	Arg	Ile	Lys	Thr
		195					200					205			
Glu	Leu	Leu	Pro	Gln	Met	Gly	Met	Asp	Leu	Lys	Leu	Val	Gln	Leu	Ile
	210					215					220				
Ala	Tyr	Thr	Asp	Trp	Lys	Glu	Thr	Gln	Glu	Lys	Asp	Pro	Lys	Gly	Tyr
225					230					235					240
Trp	Val	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Asp	Trp	Met	Phe	Lys	Pro	Gly	Ala	Met	Ala
				245					250					255	
Glu	Val	Val	Lys	Tyr	Ala	Asp	Gly	Val	Gly	Pro	Gly	Trp	Tyr	Met	Leu
			260					265					270		
Val	Asn	Lys	Glu	Glu	Ser	Lys	Pro	Asp	Asn	Ile	Val	Tyr	Thr	Pro	Leu
		275					280					285			
Val	Lys	Glu	Leu	Ala	Gln	Tyr	Asn	Val	Glu	Val	His	Pro	Tyr	Thr	Val
	290					295					300				
Arg	Lys	Asp	Ala	Leu	Pro	Ala	Phe	Phe	Thr	Asp	Val	Asn	Gln	Met	Tyr
305					310					315					320
Asp	Val	Leu	Leu	Asn	Lys	Ser	Gly	Ala	Thr	Gly	Val	Phe	Thr	Asp	Phe
				325					330					335	
Pro	Asp	Thr	Gly	Val	Glu	Phe	Leu	Lys	Gly	Ile	Lys	Ala	Ala	Ala	Met
			340					345					350		
Asp	Gly	Gly	Thr	Leu	Pro	Arg	Ser	Ala	Pro	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Pro
		355					360					365			
Val	Gly	Cys	Ala	Ala	Arg	Arg	Arg	Pro	Ala	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Arg
	370					375					380				
Cys	Ser	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Ala	Thr	Ala	Glu	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala
385					390					395					400
Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Arg	Asn	Glu	Arg	Glu	Arg	Asn	Arg	Val	Lys	Leu
				405					410					415	
Val	Asn	Leu	Gly	Phe	Gln	Ala	Leu	Arg	Gln	His	Val	Pro	His	Gly	Gly
			420					425					430		
Ala	Ser	Lys	Lys	Leu	Ser	Lys	Val	Glu	Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Val	Glu
		435					440					445			
Tyr	Ile	Arg	Ala	Leu	Gln	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	His	Asp	Ala	Val	Arg

~9224681.txt

450 455 460
Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala
465 470 475 480
Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg
485 490 495
Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro
500 505 510
Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser
515 520 525
Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr
530 535 540
Leu Glu His His His His His His
545 550

<210> 44
<211> 1656
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 44
atggatccaa gcagccattc atcaaatatg gcgaataccc aaatgaaatc agacaaaatc 60
attattgctc accgtggtgc tagcggttat ttaccagagc atacgttaga gtctaaagca 120
cttgcgtttg cacaacaggc tgattattta gagcaagatt tagcaatgac taaggatggg 180
cgtttagtgg ttattcacga tcacttttta gatggcttga ctgatgttgc gaaaaaattc 240
ccacatcgtc accgtaaaga tggtcggttac tatgtcatcg actttacctt aaaagaaatt 300
caaagtttag aaatgacaga aaactttgaa accaaagatg gcaaacaagc gcaagtttat 360
cctaactcgt tcccactttg gaaatcacat tttagaattc ataccttga agatgaaatt 420
gaatttatcc aaggcttaga aaaatccact ggcaaaaaag tagggattta tccagaaatc 480
aaagcacctt gggtccacca tcaaatgggt aaagatatg ctgctgaaac gctcaaagt 540
ttaaaaaaat atggctatga taagaaaacc gatatgggtt acttacaaac tttcgatttt 600
aatgaattaa aacgtatcaa aacggaatta ctccacaaa tgggaatgga tttgaaatta 660
gttcaattaa ttgcttatac agattggaaa gaaacacaag aaaaagacc aaagggttat 720
tgggtaaact ataattacga ttggatgttt aaacctgggt caatggcaga agtgggttaa 780
tatgccgatg gtgttggtcc aggttggtat atgttagtta ataaagaaga atccaaacct 840
gataaatatt tgtacactcc gttggtaaaa gaacttgac aatataatgt ggaagtgc 900
ccttacaccg tgcgtaaaga tgcactacc gcgtttttca cagacgtaaa tcaaatgtat 960
gatgtcttat tgaataaatc aggggcaaca ggtgtattta ctgatttccc agatactggc 1020
gtggaattct taaaaggaat aaaagcggcc gcaatggatg gtggcaccct gccgcgtagc 1080
gtccgcggc gaccgctgt tccggttgggt tgtgcggcgc gtcgtcgtcc ggcgagcccg 1140
gaactgtcgc gttgcagcgc tcgtcgccgt ccggccaccg cggaaaccgg tgggtggcgc 1200
gcagcggttg cgcgtcgtaa cgaacgtgaa cgtaaccgtg tgaactgggt gaacctgggc 1260
tttcaggcgc tgcgtcagca tgtgccgcgt ggcggtgcga gcaaaaaact gagcaaagt 1320
gaaacctgc gtagcgcggt ggaatatatt cgtgcgtgc aacgtctgct ggccgaacat 1380
gatgcggtgc gtaacgcgct ggccggtgggt ctgcgtccgc aggcggttcg tccgagcgca 1440
ccgcgtggc cgccgggtac gacgccggt gcagcgagcc cgagccgtgc gagcagctct 1500
ccgggtcgtg gtggtagcag cgaaccgggt agcccgcgt ggcctatag cagcgatgat 1560
agcggctgcg aagggtgccct gtctccggcg gaacgtgaac tgctggattt tagcagctgg 1620
ctggcggtc atctcgagca ccaccaccac caccac 1656

<210> 45
<211> 298
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 45
Met Gly His His His His His His Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln
Página 21

~9224681.txt

```

1      5      10      15
Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile
20      25      30
Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys
35      40      45
Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln
50      55      60
Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile
65      70      75      80
Gln Ala Asp Gln Ala Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile
85      90      95
Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Asp Gly Gly Thr Leu Pro
100     105     110
Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg
115     120     125
Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg
130     135     140
Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg
145     150     155     160
Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln
165     170     175
Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser
180     185     190
Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln
195     200     205
Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly
210     215     220
Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly
225     230     235     240
Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly
245     250     255
Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser
260     265     270
Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu
275     280     285
Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr
290     295
```

<210> 46
<211> 894
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

```

<400> 46
atgggtcatc accatcatca tcacgggtcg gactcagaag tcaatcaaga agctaagcca 60
gaggtcaagc cagaagtcaa gcctgagact cacatcaatt taaagggtgtc cgatggatct 120
tcagagatct tcttcaagat caaaaagacc actcctttaa gaaggctgat ggaagcggtc 180
gctaaaagac agggtaagga aatggactcc ttaagattct tgtacgacgg tattagaatt 240
caagctgatc agggccctga agatttggac atggaggata acgatattat tgaggctcac 300
cgcaacaga ttggagggtga tgggtggcacc ctgccgcgta gcgctccgcc ggcaccgccg 360
gttcgggttg gttgtgcggc gcgtcgtcgt ccggcgagcc cggaactgct gcgttgagc 420
cgtcgtcgcc gtccggccac cgcgaaacc ggtggtggtg cggcagcggg tgcgcgtcgt 480
aacgaacgtg aacgtaaccg tgtgaaactg gtgaacctgg gctttcaggc gctgcgtcag 540
catgtgccgc atggcggtgc gagcaaaaaa ctgagcaaag tggaaaccct gcgtagcgcg 600
gtggaatata ttcgtgcgct gcaacgtctg ctggccgaac atgatgcggg gcgtaacgcg 660
ctggccggtg gtctgcgtcc gcaggcggtt cgtccgagcg caccgcgtgg tccgccgggt 720
acgacgccgg ttgcagcgag cccgagccgt gcgagcagct ctccgggtcg tgggtggtagc 780
agcgaaccgg gtagcccgcg tagcgcctat agcagcgatg atagcggctg cgaagggtgcc 840
ctgtctccgg cggaaacgtga actgctggat ttagcagct ggctgggcgg ctat 894
```

Página 22

~9224681.txt

<210> 47
<211> 412
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 47
Met Gly His His His His His His Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln
1 5 10 15
Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile
20 25 30
Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys
35 40 45
Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln
50 55 60
Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile
65 70 75 80
Gln Ala Asp Gln Ala Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile
85 90 95
Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Asp Pro Ser Ser His Ser
100 105 110
Ser Asn Met Ala Asn Thr Gln Met Lys Ser Asp Lys Ile Ile Ile Ala
115 120 125
His Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Leu Pro Glu His Thr Leu Glu Ser Lys
130 135 140
Ala Leu Ala Phe Ala Gln Gln Ala Asp Tyr Leu Glu Gln Asp Leu Ala
145 150 155 160
Met Thr Lys Asp Gly Arg Leu Val Val Ile His Asp His Phe Leu Asp
165 170 175
Gly Leu Thr Asp Val Ala Lys Lys Phe Pro His Arg His Arg Lys Asp
180 185 190
Gly Arg Tyr Tyr Val Ile Asp Phe Thr Leu Lys Glu Ile Gln Ser Leu
195 200 205
Glu Met Thr Glu Asn Phe Glu Thr Ala Ala Ala Met Asp Gly Gly Thr
210 215 220
Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala
225 230 235 240
Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg
245 250 255
Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala
260 265 270
Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly
275 280 285
Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys
290 295 300
Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala
305 310 315 320
Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala
325 330 335
Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro
340 345 350
Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser
355 360 365
Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr
370 375 380
Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg
385 390 395 400
Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly Gly Tyr
405 410

Página 23

~9224681.txt

<210> 48
<211> 1236
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 48
atgggtcatc accatcatca tcacgggtcg gactcagaag tcaatcaaga agctaagcca 60
gagggtcaagc cagaagtcaa gcctgagact cacatcaatt taaagggtgc cgatggatct 120
tcagagatct tcttcaagat caaaaagacc actcctttaa gaaggctgat ggaagcggtc 180
gctaaaagac agggtaagga aatggactcc ttaagattct tgtacgacgg tattagaatt 240
caagctgacg agggccctga agatttggac atggaggata acgatattat tgaggctcac 300
cgcgaaacaga ttggagggtga tccaagcagc cattcatcaa atatggcgaa taccctaaatg 360
aaatcagaca aaatcattat tgctcaccgt ggtgctagcg gttatttacc agagcatacg 420
ttagaattcta aagcacttgc gtttgcacaa caggctgatt atttagagca agatttagca 480
atgactaagg atgggtcggtt agtgggttatt cagatcact ttttagatgg cttgactgat 540
gttgcgaaaa aattcccaca tcgtcatcgt aaagatggcc gttactatgt catcgacttt 600
accttaaaag aaattcaaag tttagaaatg acagaaaact ttgaaaccgc ggccgcaatg 660
gatgggtggca ccctgccgcg tagcgtcccg ccggcaccgc cggttccggt tgggtgtgcg 720
gcgcgctcgtc gtccggcgag cccggaactg ctgctgttga gccgtcgtcg ccgtccggcc 780
accgcggaaa ccggtgggtg tgccggcagcg gttgcgcgtc gtaacgaacg tgaacgtaac 840
cgtgtgaaac tgggtgaacct gggctttcag gcgctgcgtc agcatgtgcc gcatggcggt 900
gcgagcaaaa aactgagcaa agtggaaacc ctgctgtagcg cgggtggaata tattcgtgcg 960
ctgcaacgtc tgctggccga acatgatgagc gtgcgtaacg cgctggccgg tggctgctg 1020
ccgcaggcgg ttcgtccgag cgcaccgcgt ggtccgcccg gtacgacgcc ggttgacgag 1080
agcccagagc gtgcgagcag ctctccgggt cgtggtggtg gcagcgaacc gggtagcccc 1140
cgtagcgctt atagcagcga tgatagcggc tgcaagggtg ccctgtctcc ggcggaacgt 1200
gaactgctgg attttagcag ctggctgggc ggctat 1236

<210> 49
<211> 222
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 49
Met Gly His His His His His Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln
1 5 10 15
Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile
20 25 30
Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys
35 40 45
Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln
50 55 60
Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile
65 70 75 80
Gln Ala Asp Gln Ala Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile
85 90 95
Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Asp Gly Gly Thr Leu Pro
100 105 110
Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg
115 120 125
Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg
130 135 140
Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg
145 150 155 160
Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln
165 170 175

~9224681.txt

Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser
180 185 190
Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln
195 200 205
Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala
210 215 220

<210> 50
<211> 666
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 50
atgggtcatc accatcatca tcacgggtcg gactcagaag tcaatcaaga agctaagcca 60
gagggtcaagc cagaagtcaa gcctgagact cacatcaatt taaaggtgtc cgatggatct 120
tcagagatct tcttcaagat caaaaagacc actcctttaa gaaggctgat ggaagcggtc 180
gctaaaagac agggtaagga aatggactcc ttaagattct tgtacgacgg tattagaatt 240
caagctgata agggccctga agatttgac atggaggata acgatattat tgaggctcac 300
cgcgaaacaga ttggaggtga tgggtggcacc ctgccgcgta gcgctccgcc ggcaccgccg 360
gttccggttg gttgtgctgc gcgtcgtcgt ccggcgagcc cggaactgct gcgttgacgc 420
cgctgcgcgc gtccggccac cgcggaacc ggtggtggtg cggcagcggg tgcgcgtcgt 480
aacgaacgtg aacgtaaccg tgtgaaactg gtgaacctgg gctttcaggc gctgcgtcag 540
catgtgccgc atggcggtgc gagcaaaaaa ctgagcaaaag tggaaaccct gcgtagcgcg 600
gtggaatata ttcgtgcgct gcaacgtctg ctggccgaac atgatgcggt gcgtaacgcg 660
ctggcc 666

<210> 51
<211> 277
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 51
Met Gly His His His His His Gly Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln
1 5 10 15
Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr His Ile
20 25 30
Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys
35 40 45
Lys Thr Thr Pro Leu Arg Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln
50 55 60
Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile Arg Ile
65 70 75 80
Gln Ala Asp Gln Ala Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile
85 90 95
Ile Glu Ala His Arg Glu Gln Ile Gly Gly Asp Gly Gly Thr Leu Pro
100 105 110
Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg
115 120 125
Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg
130 135 140
Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg
145 150 155 160
Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln
165 170 175
Ala Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser
180 185 190

~9224681.txt

Lys	Val	Glu	Thr	Leu	Arg	Ser	Ala	Val	Glu	Tyr	Ile	Arg	Ala	Leu	Gln
	195						200					205			
Arg	Leu	Ala	Glu	His	Asp	Ala	Val	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Gly	Gly	
	210				215				220						
Leu	Arg	Pro	Gln	Ala	Val	Arg	Pro	Ser	Ala	Pro	Arg	Gly	Gly	Ser	Ser
	225				230				235					240	
Glu	Pro	Gly	Ser	Pro	Arg	Ser	Ala	Tyr	Ser	Ser	Asp	Asp	Ser	Gly	Cys
			245					250						255	
Glu	Gly	Ala	Leu	Ser	Pro	Ala	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser
			260				265						270		
Trp	Leu	Gly	Gly	Tyr											
		275													

<210> 52
 <211> 831
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 52
 atgggtcatc accatcatca tcacgggtcg gactcagaag tcaatcaaga agctaagcca 60
 gaggtcaagc cagaagtcaa gcctgagact cacatcaatt taaaggtgtc cgatggatct 120
 tcagagatct tcttcaagat caaaaagacc actcctttaa gaaggctgat ggaagcggtc 180
 gctaaaagac agggtaagga aatggactcc ttaagattct tgtacgacgg tattagaatt 240
 caagctgata agggccctga agatttggac atggaggata acgatattat tgaggctcac 300
 cgcgaacaga ttggaggtga tgggtggcacc ctgccgcgta gcgcaccgcc ggctccgccg 360
 gtcccggttg gttgtgcggc gcgtcgtcgt ccggcgagcc cggaaactgct gcgttgacgc 420
 cgctcgtccc gtccggccac cgcggaaacc ggtggtggtg cggcagcggg tgcgcgtcgt 480
 aacgaacgtg aacgtaaccg tgtgaaactg gtgaacctgg gctttcaggc gctgcgtcag 540
 catgtgccgc atggcggtgc gagcaaaaaa ctgagcaaag tggaaaccct gcgtagcgcg 600
 gtggaatata ttcgtgcgct gcaacgtctg ctggccgaac atgatgcggt gcgtaacgcg 660
 ctggccggtg gtcgtgcgtc gcaggcggtt cgtccgagcg cggcgcggtg tggtagcagc 720
 gaaccgggta gcccgcgtag cgcctatagc agcgatgata gcggctgcga aggtgccctg 780
 agcccggcgg aacgtgaact gctggatttt agcagctggc tgggcggcta t 831

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> HoSecuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 53
 Met Asp Gly Gly Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro
 1 5 10 15

<210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Homo Sapien

<400> 54
 Thr Leu Pro Arg Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly
 1 5 10 15

~9224681.txt

<210> 55
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 55
Ser Ala Pro Pro Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg
1 5 10 15

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 56
Ala Pro Pro Val Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala
1 5 10 15

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 57
Pro Val Gly Cys Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu
1 5 10 15

<210> 58
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 58
Ala Ala Arg Arg Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser
1 5 10 15

<210> 59
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 59
Arg Pro Ala Ser Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg
Página 27

1	5	~9224681.txt 10	15
---	---	--------------------	----

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 60

Pro Glu Leu Leu Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala

1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 61

Arg Cys Ser Arg Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly

1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 62

Arg Arg Arg Pro Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala

1 5 10 15

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 63

Ala Thr Ala Glu Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg

1 5 10 15

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

~9224681.txt

<400> 64
Thr Gly Gly Gly Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu
1 5 10 15

<210> 65
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 65
Ala Ala Ala Val Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val
1 5 10 15

<210> 66
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 66
Ala Arg Arg Asn Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn
1 5 10 15

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 67
Glu Arg Glu Arg Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln
1 5 10 15

<210> 68
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 68
Asn Arg Val Lys Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln
1 5 10 15

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

~9224681.txt

<223> Homo Sapien

<400> 69

Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His
1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 70

Leu Val Asn Leu Gly Phe Gln Ala Leu Arg Gln His Val Pro His
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 71

Leu Arg Gln His Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser
1 5 10 15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 72

Val Pro His Gly Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr
1 5 10 15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 73

Gly Ala Ser Lys Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

~9224681.txt

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 74

Lys Leu Ser Lys Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile
1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 75

Val Glu Thr Leu Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln
1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 76

Arg Ser Ala Val Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala
1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 77

Glu Tyr Ile Arg Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Homo Sapien

<400> 78

Ala Leu Gln Arg Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala
1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

~9224681.txt

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 79
Leu Leu Ala Glu His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly
1 5 10 15

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 80
His Asp Ala Val Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln
1 5 10 15

<210> 81
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 81
Arg Asn Ala Leu Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro
1 5 10 15

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 82
Ala Gly Gly Leu Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg
1 5 10 15

<210> 83
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 83
Arg Pro Gln Ala Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly
1 5 10 15

~9224681.txt

<210> 84
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 84
Val Arg Pro Ser Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val
1 5 10 15

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 85
Ala Pro Arg Gly Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro
1 5 10 15

<210> 86
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 86
Pro Pro Gly Thr Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser
1 5 10 15

<210> 87
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 87
Thr Pro Val Ala Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly
1 5 10 15

<210> 88
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 88
Ala Ser Pro Ser Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser
1 5 10 15

Página 33

~9224681.txt

<210> 89
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 89
Arg Ala Ser Ser Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly
1 5 10 15

<210> 90
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 90
Ser Pro Gly Arg Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser
1 5 10 15

<210> 91
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 91
Gly Gly Ser Ser Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser
1 5 10 15

<210> 92
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 92
Glu Pro Gly Ser Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly
1 5 10 15

<210> 93
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 93

~9224681.txt

Pro Arg Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala
1 5 10 15

<210> 94
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 94
Tyr Ser Ser Asp Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala
1 5 10 15

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 95
Asp Ser Gly Cys Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu
1 5 10 15

<210> 96
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 96
Glu Gly Ala Leu Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser
1 5 10 15

<210> 97
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

<400> 97
Ser Pro Ala Glu Arg Glu Leu Leu Asp Phe Ser Ser Trp Leu Gly
1 5 10 15

<210> 98
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Homo Sapien

~9224681.txt

<400> 98

Ala	Glu	Arg	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Ser	Ser	Trp	Leu	Gly	Gly	Tyr
1				5					10					15

PATENTE DE INVENCION ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

☐ Indicación que solicita una patente

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Descripción de la invención

☐ Dibujos de ser estos pertinentes

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser caso formato de descuento)

Completa

☐

Incompleta

☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art .33 Decisión 486/00, Circular Única**

1

☒

 Indicación que se solicita una PCT

28

☒

 Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capitulo descriptivo, reivindicatorio, resume)

181

☒

 Dibujos de ser estos pertinentes.

2

☒

 Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa

☒

Incompleta

☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

☐ Indicación que se solicita Diseño Industrial

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que Incorpora el diseño

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐

ESQUEMA TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐ Representación grafica de un esquema de trazado

☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa

☐

Incompleta

☐