



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 332 261**

(51) Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

(12)

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **01274277 .1**

(96) Fecha de presentación : **26.11.2001**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1379273**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

(54) Título: **Adyuvantes de ácidos nucleicos.**

(30) Prioridad: **27.11.2000 US 724315**

(73) Titular/es: **Powderject Vaccines, Inc.  
235 East 42nd Street  
New York, New York 10017-5755, US**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.02.2010**

(72) Inventor/es: **Haynes, Joel, R. y  
Arrington, Joshua, E.**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.02.2010**

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

## DESCRIPCIÓN

Adyuvantes de ácidos nucleicos.

**5 Campo técnico**

La invención se refiere a los campos de la biología molecular y la inmunología, y de forma general se refiere a técnicas de inmunización con ácidos nucleicos. Más específicamente, la invención se refiere a polinucleótidos que codifican un adyuvante, y a estrategias de inmunización que emplean dichos polinucleótidos.

**10 Antecedentes**

Las técnicas para la inyección de ADN y ARNm en el tejido mamífero con fines de inmunización contra un producto de expresión han sido descritas en la técnica. Se ha demostrado que las técnicas, denominadas “inmunización con ácidos nucleicos” en el presente documento, provocan respuestas inmunitarias tanto humorales como mediadas por células. Por ejemplo, se demostró que el suero de los ratones inmunizados con una construcción de ADN que codificaba la glucoproteína de la cubierta, gp160, reaccionaba con gp160 recombinante en inmunoensayos, y se demostró que los linfocitos de los ratones inyectados proliferaban en respuesta a gp120 recombinante. Wang *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4156-4160. De forma similar, los ratones inmunizados con un gen de la hormona del crecimiento humana (hGH) demostraron una respuesta inmunitaria basada en anticuerpos. Tang *et al.* (1992) Nature 356: 152-154. Se ha demostrado que la inyección intramuscular de ADN que codifica una nucleoproteína de influenza dirigida por un promotor mamífero provoca una respuesta de CTL CD8+ que puede proteger a los ratones contra una posterior exposición letal al virus. Ulmer *et al.* (1993) Science 259: 1745-1749. Los estudios inmunohistioquímicos del sitio de inyección revelaron que el ADN era captado por los mieloblastos, y pudo demostrarse la producción citoplasmática de proteína vírica durante al menos 6 meses. El documento US 5.980.898 se refiere a la inmunización transcutánea.

**Sumario de la invención**

**30** Es un objetivo primario de la invención proporcionar una composición adyuvante con polinucleótidos como se define en las reivindicaciones anexas.

La secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos pueden estar presentes en la misma o en diferentes construcciones de ácidos nucleicos. Las regiones que codifican las subunidades truncadas pueden obtenerse o derivarse de la misma exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana y, en ciertas realizaciones preferidas, la exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana es una toxina del cólera (CT) o una enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT). Además, al menos una de las regiones codificantes de las subunidades truncadas puede modificarse genéticamente para eliminar la toxicidad del péptido de la subunidad codificado por ella, por ejemplo en la que la región codificante de la subunidad A truncada ha sido modificada genéticamente para alterar o inactivar la actividad de ADP-ribosil transferasa en el producto de expresión del péptido de la subunidad.

También es un objetivo primario de la invención proporcionar una composición adyuvante con polinucleótidos que contiene unas secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos, en las que la primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad A modificada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana, y la segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad B obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana. La región codificante de la subunidad A modificada y dicha región codificante de la subunidad B codifican cada una un péptido de las subunidades maduras, y la región codificante de la subunidad A modificada ha sido modificada genéticamente para eliminar un motivo KDEL o RDEL del extremo C del péptido de la subunidad codificado por ella.

**50** Como anteriormente, la secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos pueden estar presentes en la misma o en diferentes construcciones de ácidos nucleicos. Las regiones que codifican las subunidades truncadas pueden obtenerse o derivarse de la misma exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana y, en ciertas realizaciones preferidas, la exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana es una toxina del cólera (CT) o una enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT). Además, al menos una de las regiones codificantes de las subunidades truncadas puede estar modificada genéticamente para eliminar la toxicidad del péptido de la subunidad codificada por ella. Por ejemplo en la que la región codificante de la subunidad A truncada ha sido modificada genéticamente para alterar o inactivar la actividad de ADP-ribosil transferasa en el producto de expresión de los péptidos de las subunidades.

**60** En ciertos aspectos de la invención, las composiciones anteriores pueden proporcionarse en forma de partículas, por ejemplo en las que las composiciones son partículas adecuadas para la administración con un dispositivo de administración de partículas. A este respecto, las presentes composiciones pueden recubrirse sobre la misma partícula transportadora nuclear o sobre una diferente y así ser adecuada para la administración usando una técnica de transfección mediada por partículas. Las partículas transportadoras nucleares tendrán un diámetro medio de aproximadamente 0,1 a 10  $\mu\text{m}$ , y pueden comprender un metal como por ejemplo oro. Por consiguiente, todavía otro objetivo más de la invención es proporcionar un dispositivo de administración de partículas cargado (por ejemplo, que contenga) una composición con partículas tal como se define en el presente documento.

## ES 2 332 261 T3

También es un objetivo principal de la invención proporcionar el uso de una composición que contenga una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico, donde cada secuencia incluye una región codificante para una subunidad de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana en la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado contra un antígeno de interés en dicho sujeto. El antígeno de interés y la composición

- 5 se administran al sujeto de tal forma que las subunidades de la toxina codificadas por las secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda se expresen en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria mejorada contra el antígeno. La primera secuencia de ácido nucleico contiene una región codificante de la subunidad A truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana, y la segunda secuencia de ácido nucleico contiene una región codificante de la subunidad B truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de 10 ADP bacteriana, sin embargo con la condición de que cada una de las regiones codificantes de las subunidades truncadas tiene una delección en 5' y codifica un péptido de la subunidad que no tiene un péptido de señalización bacteriana en el extremo amino.

Un objetivo primario relacionado de la invención es proporcionar un procedimiento para potenciar una respuesta 15 inmunitaria contra un antígeno de interés en un sujeto. El procedimiento de forma general supone: (a) administrar el antígeno de interés al sujeto; (b) proporcionar una composición adyuvante que comprende secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos, en la que la primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad A truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana, y la segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad B truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación 20 de ADP bacteriana; y (c) administrar la composición adyuvante al sujeto, por lo cual al introducirlas en el sujeto, las secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos son expresadas para proporcionar péptidos de las subunidades en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria mejorada contra el antígeno de interés. Las regiones codificantes de las subunidades están truncadas porque cada región codificante tiene una delección en 5' y codifica un péptido de la subunidad que no tiene un péptido de señalización bacteriana en el extremo amino.

25 Además es otro objetivo principal de la invención proporcionar el uso de una composición que comprenda una primera y una segunda secuencias de ácido nucleico, donde cada secuencia incluye una región codificante para una subunidad de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana en la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado contra un antígeno de interés en dicho sujeto. El antígeno de interés y la composición se administran al sujeto de tal forma que las subunidades de la toxina codificadas por las secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos se expresen en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria mejorada contra el antígeno. La primera secuencia de ácido nucleico contiene una región codificante de la subunidad A modificada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana, y la segunda secuencia de ácido nucleico contiene una región codificante de la subunidad B obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de 30 ADP bacteriana, sin embargo con la condición de que la región codificante de la subunidad A modificada y la región codificante de la subunidad B cada una codifican un péptido de la subunidad maduro, y con la condición además de que la región codificante de la subunidad A modificada ha sido modificada genéticamente de forma que se elimine un motivo KDEL o RDEL del extremo C del péptido de la subunidad codificado por ella.

40 Un objetivo primario relacionado de la invención es proporcionar un procedimiento para mejorar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de interés en un sujeto, en el que el procedimiento supone: (a) administrar el antígeno de interés al sujeto; (b) proporcionar una composición adyuvante que comprende secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos, en la que la primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad A modificada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana, y la segunda secuencia de ácido 45 nucleico es una región codificante de la subunidad B obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana; y (c) administrar la composición adyuvante al sujeto, por lo cual al introducirlas en el sujeto, las secuencias primera y segunda de ácidos nucleicos son expresadas para proporcionar péptidos de las subunidades en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria mejorada contra el antígeno de interés. Las regiones codificantes de las subunidades están modificadas porque cada una codifica un péptido de las subunidades maduras, pero la región codificante de la subunidad A ha sido modificada genéticamente para eliminar un motivo KDEL o RDEL del extremo 50 C del péptido de la subunidad codificado por ella.

En los usos y procedimientos de la invención, administrar las composiciones adyuvantes supone transfectar las 55 células del sujeto con una composición adyuvante con polinucleótidos de acuerdo con la presente invención. Los cassetes y/o vectores de expresión que contienen las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden usarse para transfectar las células, y la transfección se realiza en condiciones que permiten la expresión de los péptidos de las subunidades en el interior del sujeto. El procedimiento además puede suponer una o más etapas de administrar al menos una composición secundaria al sujeto.

60 El procedimiento de transfección que se lleva a cabo durante la inmunización puede realizarse tanto *in vivo*, como *ex vivo* (por ejemplo, para obtener células transfectadas que posteriormente se introducen en el sujeto antes de realizar la etapa de inmunización secundaria). Cuando se emplea la transfección secundaria, las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse al sujeto mediante inyección intramuscular o intradérmica de ADN plasmídico o, preferiblemente, administrarse al sujeto usando una técnica de administración mediada por partículas. Las composiciones de vacunas (que contienen el antígeno de interés) pueden proporcionarse en forma de cualquier composición de vacuna, adecuada por ejemplo, en forma de una composición con subunidades peptídicas, en forma de composición de vacuna con ácidos nucleicos, o en forma de una composición de vacuna de virus influenza completo o fraccionado.

# ES 2 332 261 T3

En ciertos procedimientos, el antígeno de interés y la composición adyuvante se administran en el mismo sitio al sujeto. Por ejemplo, la composición adyuvante y el antígeno de interés pueden administrarse al mismo tiempo (por ejemplo, proporcionarse en una única composición de vacuna). En ciertas realizaciones preferidas, el adyuvante y, opcionalmente el antígeno de interés, se administra en forma de partículas, por ejemplo en las que la composición adyuvante ha sido recubierta sobre una partícula transportadora nuclear y administrada al sujeto usando una técnica de administración mediada por partículas.

En estos procedimientos, la administración de las composiciones adyuvantes con polinucleótidos de la presente invención preferiblemente provoca una mayor respuesta inmunitaria celular contra el antígeno de interés coadministrado. Dicha respuesta inmunitaria mejorada puede caracterizarse generalmente por mayores valoraciones de linfocitos T CD4+ que producen interferón y/o CD8+, mayor actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de antígeno, y una respuesta inmunitaria de tipo linfocito T cooperador 1 (Th1) contra el antígeno de interés (caracterizado por mayores valoraciones de anticuerpos específicos de antígeno de las subclases habitualmente asociadas a la inmunidad celular (por ejemplo, IgG2a), habitualmente con una reducción concomitante en las valoraciones de anticuerpos de las subclases habitualmente asociadas a la inmunidad humoral (por ejemplo, IgG1)) en lugar de una respuesta inmunitaria de tipo linfocito T cooperador 2 (Th2) como por ejemplo la que se produce normalmente cuando se inmuniza a un sujeto usando una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana adyuvante como por ejemplo CT o LT. Las ventajas de la presente invención incluyen, pero sin limitación, la capacidad de las presentes composiciones adyuvantes para proporcionar un significativo efecto adyuvante y así mejorar la capacidad inmunógena de un antígeno coadministrado en un sujeto immunizado, así como la capacidad de favorecer respuestas inmunitarias de tipo Th1 contra el antígeno coadministrado que es beneficioso en un producto de vacuna.

Estos y otros objetivos, aspectos, realizaciones y ventajas de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a las personas de experiencia ordinaria en la técnica a la vista de la descripción del presente documento.

## 25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJ2002 que contiene una secuencia codificante truncada para un péptido de la subunidad A (CTA) de la toxina del cólera (CT), en el que el plásmido además contiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV) y la secuencia del intrón A asociado, y la secuencia codificante para el péptido de señalización de activador de plasminógeno tisular humano que permite la secreción de las células de mamífero del producto de expresión de CTA truncada. La figura además contiene la secuencia de ácido nucleico completa (SEC. ID. N.º: 1) para el plásmido pPJ2002.

35 La figura 2 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJ2003 que contiene una secuencia codificante truncada para un péptido de la subunidad B (CTB) de la toxina del cólera (CT), en el que el plásmido además contiene el promotor temprano inmediato de hCMV y la secuencia del intrón A asociado, y la secuencia codificante para el péptido de señalización de activador de plasminógeno tisular humano que permite la secreción de las células de mamífero del producto de expresión de CTB truncada. La figura además contiene la secuencia de ácido 40 nucleico completa (SEC. ID. N.º: 2) para el plásmido pPJ2003.

45 La figura 3 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJ2006 que contiene una secuencia codificante truncada para un péptido CTA, en el que la secuencia codificante truncada de CTA ha sido modificada además para eliminar el motivo KDEL del extremo C del péptido de la subunidad codificado por ella. El plásmido contiene además el promotor temprano inmediato de hCMV y la secuencia del intrón A asociada, y la secuencia codificante para el péptido de señalización del activador de plasminógeno tisular humano que permite la secreción de células de mamífero del producto de expresión de la CTA truncada. La figura además contiene la secuencia de ácido 50 nucleico completa (SEC. ID. N.º: 3) para el plásmido pPJ2006.

55 La figura 4 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJ2004 que contiene una secuencia codificante truncada para un péptido de la subunidad A (LTA) de la enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*, en el que el plásmido además contiene el promotor temprano inmediato de hCMV y la secuencia del intrón A asociado, y la secuencia codificante para el péptido de señalización de activador de plasminógeno tisular humano que permite la secreción de las células de mamífero del producto de expresión de LTA truncada. La figura además contiene la secuencia de ácido nucleico completa (SEC. ID. N.º: 4) para el plásmido pPJ2004.

60 La figura 5 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJ2005 que contiene una secuencia codificante truncada para un péptido de la subunidad B de LT (CTB), en el que el plásmido además contiene el promotor temprano inmediato de hCMV y la secuencia del intrón A asociado, y la secuencia codificante para el péptido de señalización de activador de plasminógeno tisular humano que permite la secreción de las células de mamífero del producto de expresión de LTB truncada. La figura además contiene la secuencia de ácido nucleico completa (SEC. ID. N.º: 5) para el plásmido pPJ2005.

65 La figura 6 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJ2007 que contiene una secuencia codificante truncada para un péptido LTA, en el que la secuencia codificante truncada de LTA ha sido modificada además para eliminar el motivo RDEL del extremo C del péptido de la subunidad codificado por ella. El plásmido contiene además el promotor temprano inmediato de hCMV y la secuencia del intrón A asociada, y la secuencia codificante para el péptido de señalización del activador de plasminógeno tisular humano que permite la secreción de

# ES 2 332 261 T3

células de mamífero del producto de expresión de la LTA truncada. La figura además contiene la secuencia de ácido nucleico completa (SEC. ID. N.º: 6) para el plásmido pPJ2007.

La figura 7 representa los resultados del ELISA que se realiza en el Ejemplo 5. El histograma representa la valoración recíproca logarítmica del anticuerpo contra gp120 presente en los animales que recibieron, de izquierda a derecha en la figura, la Formulación n.º 1 que contiene el vector pWRG7054 vacío (“EmpVec”); la Formulación n.º 2 que contiene el EmpVec (pWRG7054) y el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”); la Formulación n.º 3 que contiene el EmpVec (pWRG7054) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/B”); la Formulación n.º 4 que contiene el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/B”); la Formulación n.º 5 que contiene el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2006 y pPJ2003 (“CTA-KDEL/B”); o ninguna vacuna ni composición adyuvante (“sin exposición”).

La figura 8 representa los resultados del ELISA *in situ* realizado en el Ejemplo 5. El histograma representa el nivel relativo de producción de IFN- $\gamma$  específico de gp120 en esplenocitos obtenidos de animales que recibieron, de izquierda a derecha en la figura, la Formulación n.º 1 que contiene el vector pWRG7054 vacío (“EmpVec”); la Formulación n.º 2 que contiene el EmpVec (pWRG7054) y el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”); la Formulación n.º 3 que contiene el EmpVec (pWRG7054) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/B”); la Formulación n.º 4 que contiene el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/S”); o la Formulación n.º 5 que contiene el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2006 y pPJ2003 (“CTA-KDEL/B”).

La figura 9 representa los resultados del ensayo de ELISPOT realizado en el Ejemplo 5. El histograma representa los niveles relativos de esplenocitos que producen IFN- $\gamma$  obtenidos de animales que recibieron, de izquierda a derecha en la figura, la Formulación n.º 1 que contiene el vector pWRG7054 vacío (“EmpVec”); la Formulación n.º 2 que contiene el EmpVec (pWRG7054) y el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”); la Formulación n.º 3 que contiene el EmpVec (pWRG7054) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/B”); la Formulación n.º 4 que contiene el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/S”); o la Formulación n.º 5 que contiene el plásmido pCIA-EnvT (“gp120”) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2006 y pPJ2003 (“CTA-KDEL/B”).

La figura 10 representa los resultados del ELISA realizado en el Ejemplo 6. En esta figura, la media geométrica de los valores de absorbancia representan la valoración de los anticuerpos contra HBcAg presentes en las muestras de suero (a cuatro diluciones diferentes) tomadas con la inmunización de refuerzo (semana 6 del estudio) de los animales que recibieron o bien la Formulación n.º 1 que contiene el plásmido con el vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193); o la Formulación n.º 2 que contiene el plásmido con el vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/B”).

La figura 11 representa los resultados del ELISA realizado en el Ejemplo 6. En esta figura, la media geométrica de los valores de absorbancia representan la valoración de los anticuerpos contra HBcAg presentes en las muestras de suero (a cuatro diluciones diferentes) tomadas 2 semanas después de la inmunización de refuerzo (semana 8 del estudio) de los animales que recibieron o bien la Formulación n.º 1 que contiene el plásmido con el vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193); o la Formulación n.º 2 que contiene el plásmido con el vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193) combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 (“CTA/B”).

La figura 12 representa los resultados del ELISA realizado en el Ejemplo 7. El histograma representa las proporciones entre los logaritmos de IgGI:IgG2a de cada grupo de inmunización que recibieron, de izquierda a derecha en la figura, la Formulación n.º 1 que contiene el plásmido pM2-FL (“M2”) combinado con el plásmido con el vector vacío de control (pWRG7054); la Formulación n.º 2 que contiene el plásmido pM2-FL combinado con los vectores adyuvantes pPJ2002 y pPJ2003 CTA/B (“M2 + CT”); o la Formulación n.º 7 que contiene el plásmido pM2-FL combinado con los vectores adyuvantes pPJ2004 y pPJ2005 LTA/B (“M2 + LT”).

Las figuras 13A-13D representan los resultados de los ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL4 que se usan para evaluar la respuesta inmunitaria contra los antígenos superficial y nuclear del virus de la hepatitis B en el primer estudio del Ejemplo 8. Los histogramas representan el número de puntos por  $1 \times 10^5$  esplenocitos de los diversos grupos experimentales.

La figura 14 representa los resultados de la supervivencia del estudio de exposición al virus HSV-2 realizado en el Ejemplo 9.

## 60 Descripción detallada de la invención

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a las moléculas ni parámetros de procesamiento particulares ejemplificados dado que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología que se usa en la presente memoria descriptiva tiene el fin de describir realizaciones particulares de la invención y no se pretende que sea limitante. Además, la práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique lo contrario, procedimientos convencionales de virología, microbiología, biología molecular, técnicas de recombinación de ADN e inmunología, todas las cuales están dentro del saber ordinario de la técnica. Dichas técnicas se explican más completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.*, Molecular

# ES 2 332 261 T3

Cloning: A Laboratory Manual (2<sup>a</sup> Edición, 1989); ADN Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); A Practical Guide a Molecular Cloning (1984); y el documento PCT/US01/43151 Fundamental Virology, 2<sup>a</sup> Edición, vol. I & II (B.N. Fields y D.M. Knipe, editores.).

- 5 Debe entenderse que tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el”, “la” incluyen referencias al plural a no ser que el contenido claramente indique lo contrario.

## Definiciones

10 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entiende habitualmente una persona de experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse numerosos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica de la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en el presente documento.

15 Para describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica más adelante.

20 El término “adyuvante” se refiere a cualquier material o composición capaz de alterar, mejorar, dirigir, redirigir, potenciar o iniciar de forma específica o no específica una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Así, la coadministración de un adyuvante con un antígeno puede provocar que sean necesarias unas dosis menores de antígeno para lograr una respuesta inmunitaria deseada en el sujeto al que se administra el antígeno, o la coadministración puede provocar una respuesta inmunitaria cualitativa y/o cuantitativamente diferente en el sujeto. La eficacia de un adyuvante 25 puede determinarse administrando el adyuvante con una composición de vacuna en paralelo con una composición de vacuna sola a animales y comparar la inmunidad mediada por anticuerpos y/o células en los dos grupos usando ensayos estándar como por ejemplo radioinmunoensayo, ELISA, ensayos de CTL, y similares, todos ellos notorios en la técnica. Habitualmente, en una composición de vacuna, el adyuvante es un resto separado del antígeno, aunque una única molécula puede tener tanto propiedades adyuvantes como de antígeno.

30 Una “composición adyuvante” se refiere a cualquier composición farmacéutica que contiene un adyuvante. Las composiciones adyuvantes pueden administrarse, en los procedimientos de la invención, en cualquier forma farmacéutica adecuada, por ejemplo, en forma de líquido, polvo, crema, loción, emulsión, gel o similares. Sin embargo, las composiciones adyuvantes preferidas estarán en forma de partículas. Se pretende, aunque no siempre se indica explícitamente, que las moléculas que tengan una actividad biológica similar que los péptidos o adyuvantes químicos naturales o purificados.

40 El término “péptido” se usa en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos, análogos de aminoácidos, u otros peptidomiméticos en subunidades. Las subunidades pueden estar enlazadas por 45 enlaces peptídicos o por otros enlaces, por ejemplo éster, éter, etc. Tal como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, que incluyen glicina y tanto los isómeros ópticos D como L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente “oligopéptido” si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido habitualmente se denomina “polipéptido” o “proteína”.

45 Un “antígeno” se refiere a cualquier agente, generalmente una macromolécula, que puede provocar una respuesta inmunológica en un individuo. El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigenicas. Tal como se usa en el presente documento, “antígeno” se usa generalmente para referirse a una molécula de péptido o carbohidrato que contiene uno o más epítropos. Para 50 los fines de la presente invención, los antígenos pueden obtenerse o derivarse de cualquier fuente apropiada. Además, para los fines de la presente invención, un “antígeno” incluye un péptido que tiene modificaciones, como por ejemplo delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservadora) en la secuencia nativa, en tanto en cuanto el péptido mantenga una capacidad inmunógena suficiente. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, como por ejemplo a través de mutaciones 55 de los huéspedes que producen los antígenos.

Una “respuesta inmunitaria” contra un antígeno de interés es el desarrollo en un individuo de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular a ese antígeno. Para los fines de la presente invención, una “respuesta inmunitaria humoral” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por moléculas de anticuerpo, mientras que una “respuesta inmunitaria celular” es una mediada por linfocitos T y/o otros leucocitos.

60 El término “inmunización con ácidos nucleicos” se usa en el presente documento para referirse a la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos seleccionados en una célula huésped para la expresión *in vivo* del antígeno o antígenos. El término también engloba la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más adyuvantes seleccionados en una célula huésped para la expresión *in vivo* del adyuvante o adyuvantes. La molécula de ácido nucleico puede introducirse directamente en el sujeto receptor, como por ejemplo mediante inyección intramuscular o intradérmica estándar; administración transdérmica de partículas; inhalación; modos de administración por vía tópica, oral, intranasal o mucosa. La molécula de forma alternativa puede introducirse

## ES 2 332 261 T3

*ex vivo* en células que hayan sido extraídas de un sujeto. En este último caso, las células que contienen la molécula de ácido nucleico de interés se vuelven a introducir en el sujeto de forma que pueda montarse una respuesta inmunitaria contra el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico, o tal que el adyuvante codificado por la molécula de ácido nucleico pueda ejercer su efecto adyuvante.

- 5 Los términos “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sean desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o sus análogos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores.
- 10 10
- 10 Un polinucleótido habitualmente está compuesto por una secuencia específica de cuatro bases nucleotídicas: adenina (A); citosina (C); guanina (G); y timina (T) (uracilo (U) en lugar de timina (T) cuando el polinucleótido es ARN). Así, el término secuencia de ácido nucleico es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador que tenga una unidad de procesamiento central y que se use para aplicaciones bioinformáticas como por ejemplo genómica funcional y búsqueda de homologías.
- 20 20
- 20 Un “vector” es capaz de transferir secuencias de ácidos nucleicos a células diana (por ejemplo, vectores víricos, vectores no víricos, vehículos con partículas y liposomas). Habitualmente, “construcción de vector”, “vector de expresión”, y “vector de transferencia génica”, quieren decir cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a células diana. Así, el término incluye 25 vehículos de clonación y expresión, así como vectores víricos. Un “plásmido” es un vector en forma de un elemento genético extracromosómico.

- 30 Una secuencia de ácido nucleico que “codifica” un adyuvante y/o antígeno seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando es controlada por las secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados por un codón de inicio en el extremo 5’ (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3’ (carboxi). Para los fines de la invención, dichas secuencias de ácidos nucleicos pueden incluir, pero sin limitación, ADNc de ARNm vírico, procariota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN vírico o procariota e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar localizada en posición relativa 3’ con respecto a la secuencia codificante.

- 35 35
- 35 Un “promotor” es una secuencia de nucleótido que inicia y regula la transcripción de un polinucleótido que codifica un polipéptido. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (en los que la expresión de una secuencia de polinucleótido ligada operablemente al promotor es inducida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (en los que la expresión de una secuencia de polinucleótido ligada operablemente al promotor es reprimida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y promotores constitutivos. Se pretende que el término “promotor” o “elemento de control” incluya regiones promotoras de longitud completa y segmentos funcionales (por ejemplo, que controle la transcripción o traducción) de estas regiones.

- 40 40
- 40 “Ligada operablemente” se refiere a una disposición de los elementos en los que los componentes así descritos se configuran de forma que realicen su función habitual. Así, un promotor dado ligado operablemente a una secuencia de ácido nucleico es capaz de conseguir la expresión de esa secuencia cuando están presentes las enzimas apropiadas. El promotor no tiene que estar contigo a la secuencia, en tanto en cuanto funcione dirigiendo su expresión. Así, por ejemplo, puede haber secuencias intercaladas no traducidas pero que sí se transcriben entre la secuencia del promotor y la secuencia de ácido nucleico y la secuencia del promotor todavía puede considerarse que está “ligada operablemente” a la secuencia codificante.

- 45 45
- 45 “Recombinante” se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) de origen genómico, de ADNc, semisintético, o sintético que, en virtud de su origen o manipulación no está asociado con todo o con una porción del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza y/o está ligado a un polinucleótido distinto de aquel al que está unido en la naturaleza. Dos secuencias de ácidos nucleicos que están contenidas en una única molécula recombinante de ácido nucleico son “heterólogas” la una con respecto a la otra cuando normalmente no están asociadas la una a la otra de forma natural.

- 50 50
- 50 Un “polinucleótido aislado” es una molécula de ácido nucleico separada y distinta del organismo completo con el que la molécula se encuentra en la naturaleza; o una molécula de ácido nucleico desprovista, en todo o en parte, de secuencias con las que normalmente está asociada en la naturaleza; o una secuencia, como existe en la naturaleza, pero que tiene secuencias heterólogas (tal como se define más adelante) asociadas a ella. Una secuencia es “derivada o obtenida de” una molécula si tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de pares de bases que una región de la molécula fuente, su ADNc, sus complementos, o si presenta identidad con la secuencia como se describe más adelante.

## ES 2 332 261 T3

Las técnicas para determinar la “identidad de las secuencias” o la “homología de las secuencias” de ácidos nucleicos y aminoácidos también son conocidas en la técnica. Habitualmente, dichas técnicas incluyen determinar la secuencia de nucleótidos del ARNm para un gen y/o determinar la secuencia de aminoácidos codificada por él, y comparar estas secuencias con una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos. En general, “identidad” se refiere

5 a una correspondencia exacta nucleótido a nucleótido o aminoácido a aminoácido de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Dos o más secuencias (de polinucleótidos o aminoácidos) pueden compararse determinando su “identidad porcentual”. La identidad porcentual de dos secuencias, independientemente de que sean secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, es el número exacto de correspondencias entre dos secuencias aliñeadas dividido entre la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. El algoritmo de homología local  
10 de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981) proporciona una alineación aproximada para las secuencias de ácidos nucleicos. Este algoritmo puede aplicarse a secuencias de aminoácidos usando la matriz de puntuación desarrollada por Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff, 5 supl. 3: 353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, y normalizada por Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6): 6745-6763 (1986). El Genetics Computer Group (Madison, WI) en la aplicación “BestFit” proporciona una  
15 implementación ejemplar de este algoritmo para determinar la identidad porcentual de una secuencia. Los parámetros por defecto para este procedimiento se describen en el Wisconsin Sequence Analysis Package Program Manual, Versión 8 (1995) (disponible de Genetics Computer Group, Madison, WI). Un procedimiento preferido para establecer la identidad porcentual en el contexto de la presente invención es usar el paquete de programas MPSRCH con copyright  
20 de la Universidad de Edimburgo, desarrollado por John F. Collins y Shane S. Sturrok, y distribuido por IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, CA). A partir de este juego de paquetes puede emplearse el algoritmo de Smith-Waterman donde se usan los parámetros por defecto para la tabla de puntuación (por ejemplo, penalización por apertura de gap de 12, penalización por extensión de gap de uno, y un gap de seis). A partir de los datos generados, el valor de “correspondencia” refleja la “identidad de las secuencias.” Generalmente se conocen otros programas adecuados para calcular la identidad o similitud porcentual entre secuencias en la técnica, por ejemplo, otro programa de alineación es BLAST,  
25 que se usa con parámetros por defecto. Por ejemplo, pueden usarse BLASTN y BLASTP usando los siguientes parámetros por defecto: código genético = estándar; filtro = ninguno; hebra = ambas; corte = 60; esperado = 10; Matriz = BLOSUM62; Descripciones = 50 secuencias; clasificar por = PUNTUACIÓN ALTA; Bases de datos = no redundantes, GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + Swiss Protein + Spupdate + PIR. Los detalles de estos programas pueden encontrarse en la siguiente dirección de internet: <http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

30 De forma alternativa, la homología puede determinarse mediante hibridación de los polinucleótidos en condiciones que formen moléculas bicatenarias estables entre regiones homólogas, seguido de digestión con nucleasa(s) específicas monocatenarias, y determinación del tamaño de los fragmentos digeridos. Dos secuencias de ADN, o dos polipéptidos son “sustancialmente homólogas” entre sí cuando las secuencias muestran al menos aproximadamente 80%-85%,  
35 preferiblemente al menos aproximadamente 90%, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 95%-98% de identidad entre las secuencias en una longitud definida de las moléculas, según se determina usando los procedimientos anteriores. Tal como se usa en el presente documento, sustancialmente homólogas también se refiere a secuencias que muestran una identidad completa con la secuencia de ADN o polipéptido especificada. Las secuencias de ADN que son sustancialmente homólogas pueden identificarse en un experimento de hibridación Southern, por ejemplo, en condiciones estrictas, tal como se definen para el sistema particular. Por ejemplo, las condiciones de hibridación estrictas pueden incluir 50% de formamida, 5 x Solución de Denhardt, 5 x SSC, 0,1% de SDS y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y las condiciones de lavado pueden incluir 2 x SSC, 0,1% de SDS a 37°C seguido de 1 x SSC, 0,1% de SDS a 68°C. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, referencia anterior; *DNA Cloning* referencia anterior;  
40 *Nucleic Acid Hybridization* referencia anterior.

45 El término administración “transdérmica” se refiere a la administración intradérmica (por ejemplo, al interior de la dermis o epidermis), transdérmica (por ejemplo, “percutánea”) y transmucosa, es decir, administración por el paso de un agente al interior o a través de tejido cutáneo o mucoso. Véase, por ejemplo, *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft y Guy (editores), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson y Lee (editores), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus y Berner (editores), CRC Press, (1987). Así, el término engloba la administración de un agente usando un dispositivo de administración de partículas (por ejemplo, una jeringuilla sin agujas) como por ejemplo las que se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.630.796, así como administración usando dispositivos de administración mediada por partículas como por ejemplo los que se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.865.796.

50 Por “vehículo nuclear” se quiere decir un vehículo sobre el que se recubre un ácido nucleico huésped (por ejemplo, ADN, ARN) para conferir un tamaño de partícula definido, así como una densidad lo suficientemente elevada para lograr el momento necesario para atravesar la membrana celular, de tal forma que la molécula huésped pueda administrarse usando técnicas mediadas por partículas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.100.792). Los vehículos nucleares habitualmente incluyen materiales como por ejemplo tungsteno, oro, platino, ferrita, poliestireno y látex. Véase por ejemplo, *Particle Bombardment Technology for gen Transfer*, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, Nueva York, NY páginas 10-11.

55 Por “dispositivo de administración de partículas” se quiere decir un instrumento que administra una composición con partículas por vía transdérmica sin ayuda de una aguja convencional para atravesar la piel. Los dispositivos de administración de partículas para usar con la presente invención se describen en todo este documento.

# ES 2 332 261 T3

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratamiento” incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de la infección o reinfección; la reducción o eliminación de síntomas; y la reducción o eliminación completa de un patógeno. El tratamiento puede realizarse de forma profiláctica (antes de la infección) o terapéutica (tras la infección).

- 5 Los términos “individuo” y “sujeto” se usan de forma intercambiable en el presente documento para referirse a cualquier miembro del subfilo de los cordados, que incluye, sin limitación, seres humanos y otros primates, que incluyen primates no humanos como por ejemplo chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja como por ejemplo ganado vacuno, ovino, porcino, caprino y caballar; mamíferos domésticos como por ejemplo perros y gatos; animales de laboratorio que incluyen roedores como por ejemplo ratones, ratas y cobayas; pájaros, que incluyen pájaros domésticos, salvajes y de caza como por ejemplo pollos, pavos y otras gallináceas, patos, gansos y similares. Los términos no denotan ninguna edad particular. Así, se pretende incluir tanto individuos adultos como recién nacidos. Los procedimientos que se describen en el presente documento se pretenden usar en cualquiera de las especies de vertebrados anteriores, dado que los sistemas inmunitarios de todos estos vertebrados funcionan de forma similar.
- 10
- 15

## Revisión general

20 Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a las formulaciones ni parámetros de procesamiento particulares ejemplificados dado que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología que se usa en la presente memoria descriptiva tiene el fin de describir realizaciones particulares de la invención y no se pretende que sea limitante.

25 La presente invención proporciona composiciones novedosas que contienen secuencias de ácidos nucleicos, en las que una primera secuencia de la composición es una secuencia codificante para una subunidad A obtenida o derivada de una toxina bacteriana que ribosila ADP, y una segunda secuencia de la composición es una secuencia codificante para una subunidad B obtenida o derivada de una toxina bacteriana que ribosila ADP. La secuencias primera y segunda son útiles en procedimientos de inmunización en los que se administran a un sujeto para proporcionar un efecto adyuvante (contra un antígeno de interés coadministrado) en el sujeto inmunizado. Las toxinas bacterianas que ribosilan ADP son 30 una familia de exotoxinas bacterianas relacionadas e incluyen toxina de la difteria (DT), toxina de la tos ferina (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas termolábiles de *E. coli* (LT1 y LT2), endotoxina A de *Pseudomonas*, exotoxina S de *Pseudomonas*, exoenzima de *B. cereus*, toxina de *B. sphaericus*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum*, así como las toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriforma* y *C. difficile*, EDIN de *Staphylococcus aureus*, y 35 mutantes de toxina bacteriana que ribosilan ADP como por ejemplo GRM197, un mutante no tóxico de la toxina de la difteria (véase, por ejemplo, Bixler *et al.* (1989) Adv. Exp. Biol. 251: 175; y Constantino *et al.* (1992) Vaccine). La mayoría de las toxinas bacterianas que ribosilan ADP están organizadas en forma de un multímero A:B, en el que la subunidad A contiene la actividad de ADP-ribosiltransferasa, y la subunidad B actúa como resto de unión. Las toxinas bacterianas que ribosilan ADP preferidas para usar en las composiciones de la presente invención incluyen toxina del cólera y las toxinas termolábiles de *E. coli*.

40

40 La toxina del cólera (CT) y las enterotoxinas termolábiles de *E. coli* (LT) relacionadas son productos de secreción de sus cepas bacterianas enterotóxicas respectivas que son inmunógenos potentes y muestran una fuerte toxicidad cuando se administran por vía sistémica, oral o mucosa. Tanto CT como LT son conocidas por proporcionar efectos adyuvantes para los antígenos cuando se administran por vía intramuscular u oral. Estos efectos adyuvantes se han observado a dosis inferiores a las necesarias para la toxicidad. Las dos toxinas son moléculas extremadamente similares, y son al menos aproximadamente 70-80% homólogas a nivel de aminoácidos.

45 Las toxinas CT y LT son hexámeros, compuestos por una única molécula de una subunidad A rodeada de un anillo con forma de donut compuesto por 5 moléculas de la subunidad B. La subunidad A posee una actividad de ADP-ribosilasa que produce modificaciones en la proteína G que provocan regulación por aumento de AMPc y de proteína cinasa A tras la internalización de la subunidad A en una célula de mamífero. La subunidad A puede ser cortada por proteasas exógenas dando los fragmentos A1 y A2 ligados mediante un único puente disulfuro. La subunidad A de CT contiene un motivo peptídico KDEL en el extremo C (RDEL para la subunidad A de L1) que está asociado al paso de las proteínas de la red Golgi trans al RE. Esto probablemente es importante para la administración de un fragmento A al compartimiento celular correcto para la toxicidad tras la internalización, y retención de la toxina en ese compartimiento celular. La subunidad A1 penetra en el citoplasma celular y desencadena la salida de Cl al catalizar la ADP-ribosilación de una proteína G, que activa la adenilato ciclase produciendo niveles elevados de AMPc. Un nivel elevado de AMPc provoca la fosforilación de proteína cinasa A y abre el canal de cloruro regulador de la conductancia transmembranosa en la fibrosis quística.

55

60

55 El papel principal de los fragmentos de A2 es interactuar con la subunidad B. La internalización de la toxina está mediada por las cinco copias de la subunidad B que poseen actividad de unión por el GM1 gangliósido, un glucoesfingolípido que se encuentra por todas partes en la superficie de las células de mamífero.

65 La importancia relativa de las subunidades A y B para la capacidad como adyuvante es controvertida. Existe especulación en el campo de que la actividad tóxica de la subunidad A puede modular los efectos adyuvantes asociados a la subunidad B. Algunos estudios demuestran que las mutaciones en la subunidad A anulan la actividad adyuvante mientras que otros demuestran que las mutaciones en la subunidad A que bloquean la actividad ADP-ribosilasa no

# ES 2 332 261 T3

tienen efecto sobre la capacidad adyuvante. Otros informes muestran niveles variables de efectos adyuvantes para las subunidades B o para las preparaciones de subunidades B recombinantes. Es probable que las subunidades A y B tengan funciones distintas que contribuyan independientemente a la capacidad adyuvante. Estas funciones son actividad como ADP-ribosilasa y actividad de activación de receptores, respectivamente. Con respecto a la subunidad

- 5 B de LT en particular, la unión al receptor GM1 de los linfocitos B provoca una activación policlonal, se produce en ausencia de proliferación significativa, y supone la regulación por aumento de un número de moléculas importantes como por ejemplo MHC de clase II, B7, CD40, ICAM-1 e IL2-R<sup>a</sup>. Para los linfocitos T, la adición de holotoxinas CT o LT o de subunidades B recombinantes a los linfocitos T estimulados con concanavalina A provoca una reducción en la incorporación de timidina. No se han reseñado efectos de estas moléculas sobre los macrófagos y las células 10 dendríticas. En los cultivos de PBMC, Etx8 estimula un nivel alto de TNF- $\alpha$  y de producción de IL-10 pero no de IL-12. Esto es consistente con las observaciones de respuestas predominantemente de tipo Th2 asociadas al uso de formas de CT y LT como adyuvantes.

Por lo tanto es una característica sorprendente de la presente invención que la administración de las presentes 15 composiciones adyuvantes con polinucleótidos produzca preferentemente una mayor respuesta inmunitaria de tipo Th1 contra el antígeno de interés coadministrado, en lugar de la respuesta de tipo Th2 que sería de esperar por el uso de una composición adyuvante con exotoxina de ribosilación de ADP.

## Secuencias codificantes para las subunidades de exotoxina de ribosilación de ADP

20 En una realización, se proporciona una composición que incluye una o más moléculas de ácido nucleico recombinantes, conteniendo dichas una o más moléculas las secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda en las que (a) la primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante para un péptido de la subunidad A truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP, y (b) la segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante para un péptido de la subunidad B truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP. 25 Las regiones codificantes proporcionan péptidos de las subunidades "truncadas" en los que cada una de dicha región codificante de la subunidad ha sido alterada genéticamente de forma que cree una delección en 5', por lo cual el péptido de la subunidad codificado no tiene un péptido de señalización bacteriana en el extremo amino.

30 En otra realización, se proporciona una composición que incluye una o más moléculas de ácido nucleico recombinantes, conteniendo dichas una o más moléculas las secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda en las que (a) la primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante para un péptido de la subunidad A modificada, madura, obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP, y (b) la segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante para un péptido de la subunidad B madura, obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación 35 de ADP. La primera secuencia de ácido nucleico contiene una región codificante que proporciona un péptido de la subunidad A "modificado" en el que dicha región codificante ha sido alterada genéticamente para eliminar un resto de cuatro aminoácidos del extremo C del motivo KDEL o RDEL que normalmente se encuentra en el péptido de la subunidad codificado.

40 Todavía en una realización adicional, se proporciona una composición que incluye una o más moléculas de ácido nucleico recombinantes, conteniendo dichas una o más moléculas las secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda en las que (a) la primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante para un péptido de la subunidad A truncada y modificada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP, y (b) la segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante para un péptido de la subunidad B truncada obtenida o derivada de una 45 exotoxina de ribosilación de ADP.

En realizaciones particularmente preferidas, las secuencias que codifican las subunidades del péptido de la exotoxina de ribosilación de la ADP se obtienen o se derivan de una toxina del cólera (CT). En otras realizaciones particularmente preferidas, las secuencias que codifican las subunidades del péptido de la exotoxina de ribosilación de la ADP se obtienen o se derivan de una enterotoxina termolábil de *E. coli* (LT), por ejemplo LT1 o LT2.

50 Las porciones de los genomas de diversas especies bacterianas enterotóxicas, particularmente las porciones que contienen las secuencias codificantes para las exotoxinas que ribosilan ADP, generalmente son conocidas y las secuencias para ellas están disponibles públicamente, por ejemplo en la World Wide Web, y/o están depositadas en bancos como por ejemplo la base de datos GenBank. Por ejemplo, una entrada de GenBank para las secuencias completas de los genes de la subunidad A y B de CT pueden encontrarse en el Locus VIBCTX-ABB (N.<sup>o</sup> de acceso D30053), mientras que una entrada de GenBank para las secuencias completas de los genes de la subunidad A y B de LT pueden encontrarse en el Locus AB0116677 (N.<sup>o</sup> de acceso AB011677). También pueden usarse variantes o fragmentos activos de estas secuencias de toxinas en las composiciones y procedimientos de la presente invención. Para una descripción general de las exotoxinas de ribosilación de ADP, véase por ejemplo, Krueger *et al.* (1995) Clin. Microbiol. Rev. 8: 34-47. Además, en ciertos aspectos de la invención, una o ambos de las regiones codificantes de las subunidades del péptido de la toxina pueden estar además modificadas genéticamente para eliminar la toxicidad del/de los péptido(s) de la(s) subunidad(es) codificado(s) por ellas. Por ejemplo, en la técnica se conocen mutantes de toxinas alteradas genéticamente que tienen una actividad de ribosilación de ADP alterada, mutaciones en sitios de escisión por tripsina, o una actividad de unión alterada. Véase, por ejemplo, Burnette *et al.* (1994) "Recombinant microbial ADP-ribosylating toxins of *Bordetella pertussis*, *Vibrio cholerae*, and enterotoxigenic *Escherichia coli*: structure, function and toxoid vaccine development", en Bioprocess Technology, Burnette *et al.* editores, páginas 185-203; Rappuoli *et al.* (1995) Int. Archiv. Allergy Immunol. 108: 327-333; y Rappuoli *et al.* (1996) Ad. Exp. Med. Biol. 397: 55-60.

## ES 2 332 261 T3

Las secuencias que codifican las subunidades de las toxinas seleccionadas habitualmente están insertadas en un vector apropiado (por ejemplo, un esqueleto de plásmido) usando técnicas conocidas y como se ha descrito más adelante en los Ejemplos.

5 La secuencia o secuencias que codifican los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés pueden obtenerse y/o prepararse usando procedimientos conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse preparaciones sustancialmente puras usando herramientas estándar de biología molecular. Es decir, pueden obtenerse secuencias de polinucleótidos que codifican las subunidades de toxinas que se describen anteriormente usando procedimientos recombinantes, como por ejemplo cribando adenotecas de ADNc para encontrar células que expresen las subunidades 10 de las toxinas, o derivando la secuencia codificante para las subunidades de la toxina de un vector que se sabe que la incluye. Las secuencias que codifican las subunidades de las toxinas de diversas cepas bacterianas están depositadas en la American Type Culture Collection ATCC, y además hay otras disponibles en organizaciones para la salud nacionales e internacionales como por ejemplo los Centers of Disease Control (Atlanta, GA). Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, referencia anterior, para una descripción de las técnicas que se usan para obtener y aislar moléculas de ácido 15 nucleico. Las secuencias de polinucleótidos también pueden producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

Todavía otro procedimiento conveniente para aislar las moléculas específicas de ácido nucleico es mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Mullis *et al.* (1987) Methods Enzymol. 155: 335-350. Esta técnica usa 20 ADN polimerasa, habitualmente una ADN polimerasa termoestable, para replicar una región de ADN deseada. La región de ADN a replicar se identifica mediante los oligonucleótidos de la secuencia especificada complementaria a los extremos opuestos y hebras opuestas del ADN deseado para cebar la reacción de replicación. El producto de la primera tanda de replicación es en sí mismo una plantilla para la posterior replicación, así los sucesivos ciclos de replicación repetidos producen una amplificación geométrica del fragmento de ADN delimitado por el par de cebadores usado.

25 Una vez se han obtenido las secuencias relevantes para las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés, pueden enlazarse para proporcionar una o más moléculas de ácido nucleico contiguas usando técnicas estándar de clonación o biología molecular. Más particularmente, después de haber obtenido la información de las secuencias para la combinación de subunidades de la toxina seleccionadas, las secuencias codificantes pueden combinarse entre 30 sí o con otras secuencias para formar una secuencia híbrida, o manejarse por separado. En las secuencias híbridas, las secuencias codificantes de los péptidos de las subunidades pueden posicionarse de cualquier forma las unas con respecto a las otras, e incluirse en una única molécula en cualquier número de formas, por ejemplo, en forma de una copia única, repetidas aleatoriamente en la molécula en forma de copias múltiples, o incluirse en la molécula en forma de repeticiones múltiples en tandem u otros motivos repetidos ordenados de otros modos.

35 40 Aunque puede usarse cualquier número de técnicas rutinarias de biología molecular para la construcción de dichas moléculas de ácido nucleico recombinantes, un procedimiento conveniente supone usar uno o más sitios de restricción únicos en un vector lanzadera o de clonación (o insertar uno o más sitios de restricción únicos en una secuencia adecuada de un vector) y técnicas de clonación estándar para dirigir la secuencia o secuencias codificantes de los péptidos de las subunidades a localizaciones diana particulares dentro de un vector.

45 De forma alternativa, pueden producirse moléculas híbridas sintéticamente en lugar de clonarlas. La secuencia de nucleótidos puede diseñarse con los codones apropiados para la secuencia de aminoácidos particular que se desee. En general, se seleccionarán los codones preferidos para el huésped en el que se pretenda expresar la secuencia. Después puede ensamblarse la secuencia completa a partir de oligonucleótidos superpuestos preparados mediante procedimientos estándar y ensamblarse formando una secuencia codificante completa. Véase, por ejemplo, Edge (1981) Nature 292: 756; Nambair *et al.* (1984) Science (1984) 223: 1299; Jay *et al.* (1984) J. Biol. Chem. 259: 6311.

50 Una vez se han obtenido o se han construido las secuencias codificantes de los péptidos de la exotoxina de ribosilación de ADP, pueden insertarse en uno o más vectores adecuados que incluyen secuencias de control ligadas operablemente a la secuencia o secuencias insertadas, proporcionando así casetes de expresión que permiten la expresión de péptidos de las subunidades de la toxina *in vivo* en una especie de sujeto diana.

55 Los promotores típicos para la expresión en células de mamífero incluyen el promotor temprano de SV40, un promotor de CMV como por ejemplo el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor LTR del virus tumoral mamario murino, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP), y otros sistemas promotores adecuadamente eficaces. También pueden usarse promotores no víricos, como por ejemplo un promotor derivado del gen de metalotioneína murina, para la expresión en mamíferos. También pueden usarse promotores inducibles, reprimibles o controlables de otras formas. Habitualmente, también habrá secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación, localizadas en posición relativa 3' de cada codón de terminación de la traducción. Preferiblemente, también hay presente una secuencia para optimizar el inicio de la traducción, en posición relativa 5' de cada secuencia codificante. Los ejemplos de transcripción las señales de terminación de la transcripción y de poliadenilación incluyen las derivadas de SV40, como se ha descrito en Sambrook *et al.*, referencia anterior, así como una secuencia de terminación de hormona de crecimiento bovina. En el diseño del cassette de expresión también pueden incluirse intrones, 60 que contienen sitios donantes y receptores para el ayuste.

65 Además, pueden incluirse elementos potenciadores en los casetes de expresión para aumentar los niveles de expresión. Los ejemplos de potenciadores adecuados incluyen el potenciador génico temprano de SV40 (Dijkema *et al.*

(1985) EMBO J. 4: 761), el potenciador/promotor derivado de la secuencia repetida terminal larga (LTR) del virus del Sarcoma de Rous (Gorman *et al.* (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777), y elementos derivados del CMV humano o murino (Boshart *et al.* (1985) Cell 41: 521), por ejemplo, los elementos incluidos en la secuencia del intrón A de CMV.

5 Se incluye otra secuencia auxiliar que proporciona la secreción del péptido de la subunidad de la exotoxina de ribosilación de ADP de una célula de 3 mamífero. Dichas secuencias directoras de la secreción son conocidas por los expertos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la secuencia de señalización directora del activador de plasminógeno tisular (tpa).

10 Despues de que se haya producido uno o más cassetes de expresión (o construcciones de ácidos nucleicos como por ejemplo vectores plasmídicos) adecuados que contengan las secuencias codificantes de los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés, los cassetes de expresión pueden proporcionarse en un vector de transfección adecuado como por ejemplo un vector plasmídico de ADN o un vector vírico para la administración posterior a un sujeto. A este respecto, pueden usarse las composiciones de polinucleótidos de la invención como 15 composiciones adyuvantes únicas, o pueden coadministrarse con un antígeno de interés, por ejemplo, como parte de una composición de vacuna de componentes múltiples. Por ejemplo, en una composición de vacuna de componentes múltiples, las presentes moléculas de ácido nucleico (que contienen las secuencias codificantes para los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés) pueden combinarse con moléculas de ácido nucleico 20 adicionales que codifican uno o más antígenos que se sabe que son importante para proporcionar protección contra un patógeno, por ejemplo, moléculas que contienen secuencias que codifican los antígenos HA o NA de influenza, o moléculas que contienen secuencias que codifican los antígenos de VIH. De forma alternativa, la composición de vacuna de componentes múltiples puede contener, además de los polinucleótidos que codifican las subunidades de la toxina, el antígeno en forma de virus entero convencional, fracciones de virus, polisacárido, o preparaciones de 25 vacunas con subunidades purificadas como se ha descrito en el presente documento más adelante.

#### *Antígenos*

30 Las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento son de utilidad para actuar de adyuvantes de una respuesta inmunitaria contra una amplia variedad de antígenos administrados de forma concomitante, por ejemplo antígenos obtenidos o derivados de células o tejidos enfermos, de patógenos humanos o animales. Para los fines de la presente invención, un adyuvante se usa o bien para potenciar la respuesta inmunitaria contra un 35 antígeno específico, por ejemplo, cuando un adyuvante se administra de forma concomitante con una composición de vacuna, la respuesta inmunitaria es mayor que la respuesta inmunitaria provocada por una cantidad equivalente de la composición de vacuna administrada sin el adyuvante, o el adyuvante se usa para dirigir un tipo o clase particular de respuesta inmunitaria contra un antígeno administrado de forma concomitante. La administración concomitante de una “cantidad eficaz” de las composiciones adyuvantes de la presente invención será aquella cantidad que potencia 40 una respuesta inmunológica contra el antígeno administrado de forma concomitante de tal forma que, por ejemplo, sean necesarias dosis menores o menos dosis del antígeno para generar una respuesta inmunitaria eficaz.

Tal como se usa en el presente documento, el término “administrado de forma concomitante”, como por ejemplo cuando se “administra de forma concomitante” una composición adyuvante que codifica una subunidad de exotoxina de ribosilación de ADP de acuerdo con la presente invención con un antígeno de interés (por ejemplo, una composición de vacuna), se refiere o bien a la administración simultánea o concurrente de la composición adyuvante y el antígeno, 45 por ejemplo, cuando los dos están presentes en la misma composición o se administran en composiciones separadas casi al mismo tiempo pero en diferentes sitios, así como la administración de la composición adyuvante y el antígeno en composiciones separadas en momentos diferentes, que incluyen la administración en sitios diferentes. Por ejemplo, la composición adyuvante puede administrarse antes o después de la administración del antígeno en el mismo sitio o en uno diferente. La sincronización entre la administración del adyuvante y antígeno puede variar desde aproximadamente 50 varios minutos de intervalo, a varias horas de intervalo, a varios días de intervalo.

Para los fines de la presente invención, el término “patógeno” se usa en un sentido amplio para referirse a un agente causal específico de una enfermedad o afección, e incluye cualquier agente que proporcione una fuente de una molécula que provoca una respuesta inmunitaria. Así, los patógenos incluyen, pero sin limitación, virus, bacterias, 55 hongos, protozoos, parásitos, células cancerosas y similares. Habitualmente, la respuesta inmunitaria es provocada por uno o más antígenos de péptido o carbohidrato producidos por el patógeno. Los procedimientos para identificar los antígenos adecuados, obtener y preparar dichas moléculas, y después determinar las dosis adecuadas, realizando ensayos para determinar la capacidad inmunógena adecuada y tratar con dichos antígenos son notorios en la técnica. Véase por ejemplo, Plotkin *et al.* (1994) *Vaccines*, 2<sup>a</sup> Edición, W.B. Saunders, Philadelphia, PA. Los ejemplos no 60 limitantes de fuentes de antígenos que pueden usarse para vacunar a sujetos vertebrados, en particular, seres humanos y mamíferos no humanos, así incluyen virus, bacterias, hongos y otros organismos patógenos.

Los antígenos víricos adecuados incluyen, pero sin limitación, los obtenidos o derivados de la familia de virus de la hepatitis, que incluyen virus de la hepatitis A (HAV), virus de la hepatitis B (HBV), virus de la hepatitis C (HCV), 65 virus de la hepatitis delta (HDV), virus de la hepatitis E (HEV) y virus de la hepatitis G (HGV). Véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO 89/04669; WO 90/11089; y WO 90114436. El genoma de HCV codifica varias proteínas víricas, que incluyen E1 y E2. Véase, por ejemplo, Houghton *et al.* (1991) *Hepatology* 14: 381-388. Las secuencias que contienen fragmentos genómicos que codifican estas proteínas, así como los fragmentos antigenicos

## ES 2 332 261 T3

de los mismos, encontrarán uso en los presentes procedimientos. De forma similar, se conoce la secuencia codificante para el antígeno  $\delta$  de HDV (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.378.814).

Del mismo modo, puede usarse una amplia variedad de proteínas de la familia herpesvirus como antígenos en la presente invención, que incluyen proteínas derivadas del virus herpes simplex (HSV) tipos 1 y 2, como por ejemplo las glucoproteínas gB, gD y gH de HSV-1 y HSV-2; antígenos del virus varicella zoster (VZV), del virus de Epstein-Barr (EBV) y de citomegalovirus (CMV) que incluyen gB y gH de CMV; y antígenos de otros herpesvirus humanos como por ejemplo HHV6 y HHV7. (Véase, por ejemplo Chee *et al.* (1990) *Cytomegaloviruses* (J.K. McDougall, ed., Springer-Verlag, páginas 125-169; McGeoch *et al.* (1988) *J. Gen. Virol.* 69: 1531-1574; patente de Estados Unidos n.º 5.171.568; Baer *et al.* (1984) *Nature* 310: 207-211; y Davison *et al.* (1986) *J. Gen. Virol.* 67: 1759-1816.)

Se conocen y se han reseñado antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), como por ejemplo las moléculas gp120 para una multitud de cepas aisladas de HIV-1 y HIV-2, que incluyen miembros de los diversos subtipos genéticos de HIV (véase, por ejemplo, Myers *et al.*, Base de datos de Los Alamos, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, Nuevo México (1992); y Modrow *et al.* (1987) *J. Virol.* 61: 570-578) y fragmentos genómicos que contienen antígenos derivados u obtenidos de cualquiera de estas cepas aisladas encontrarán uso en la presente invención. Además, otras proteínas inmunógenas derivadas u obtenidas de cualquiera de las diversas cepas aisladas de HIV encontrará uso en el presente documento, que incluyen fragmentos que contienen una o más de las diversas proteínas de la cubierta como por ejemplo gp160 y gp41, antígenos gag como por ejemplo p24gag y p55gag, así como proteínas derivadas de pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu y de las regiones LTR de HIV.

Los antígenos derivados u obtenidos de otros virus también encontrarán uso en el presente documento, como por ejemplo sin limitación, antígenos de miembros de las familias: Picornaviridae (por ejemplo, poliovirus, rhinovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae (por ejemplo, rotavirus, etc.); Birnaviridae; Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la rabia, etc.); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus influenza de los tipos A, B y C, etc.); Filoviridae; Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio, virus parainfluenza, etc.); Bunyaviridae; Arenaviridae; Retroviridae (por ejemplo, HTLV-I; HTLV-II; HIV-1 (también conocido como HTLV-III, LAV, ARV, hTLR, etc.)), que incluyen, pero sin limitación, antígenos de las cepas aisladas HIV<sub>IIb</sub>, HIV<sub>SF2</sub>, HIV<sub>LAV</sub>, HIV<sub>LAI</sub>, HIV<sub>MN</sub>); HIV-1<sub>CM235</sub>, HIV-1<sub>US4</sub>; HIV-2, entre otros; virus de la inmunodeficiencia simio (SIV); Papillomavirus, el virus de la encefalitis portado por garrapatas; y similares. Véase, por ejemplo *Virology*, 3<sup>a</sup> Edición (W.K. Joklik ed. 1988); *Fundamental Virology*, 2<sup>a</sup> Edición (B.N. Fields y D.M. Knipe, editores 1991), para una descripción de estos y otros virus.

En algunos contextos, puede ser preferible que los antígenos víricos seleccionados se obtengan o deriven de un patógeno vírico que habitualmente penetra en el cuerpo por una superficie mucosa y se sabe que provoca o está asociado a la enfermedad en seres humanos, como por ejemplo, pero sin limitación, HIV (AIDS), virus de la gripe (gripe), virus herpes simplex (infección genital, calenturas, ETS), rotavirus (diarrea), virus paragripal (infecciones respiratorias), virus de la polio (poliomielitis), virus sincitial respiratorio (infecciones respiratorias), virus de sarampión y paperas (sarampión, paperas), virus de la rubéola (rubéola), y rhinovirus (resfriado común).

Los fragmentos genómicos que contienen antígenos bacterianos y parasitarios pueden obtenerse o derivarse de agentes causales conocidos responsables de enfermedades que incluyen, pero sin limitación, difteria, tos ferina, tétanos, tuberculosis, neumonía bacteriana o fúngica, otitis media, gonorréa, cólera, tifus, meningitis, nononucleosis, plaga, shigellosis o salmonelosis, legionela, enfermedad de Lyme, lepra, malaria, tenia, oncocerciasis, esquistosomiasis, tripanosomiasis, leishmania, giardiosis, amebiasis, filariasis, borelia, y triquinosis. Todavía pueden obtenerse o derivarse otros antígenos de virus no convencionales como por ejemplo los agentes causales de kuru, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD), encefalopatía espongiforme ovina, encefalopatía transmisible del visión y enfermedades de consumición crónicas, o provocadas por partículas infecciosas de proteínas como por ejemplo priones que están asociados a la enfermedad de las vacas locas.

Los patógenos específicos pueden incluir *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio Cholera*, *Treponema pallidua*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Franciscella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, estreptococos (tipos A y B), Pneumococos, Meningococos, *Hemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Complilobacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis*, y *Actinomycosis*; patógenos fúngicos que incluyen candidiasis y aspergilosis; patógenos parasíticos que incluyen tenia, trematodo, nemátodos, amebiasis, giardiosis, criptosporidio, esquistosoma, *Pneumocystis carinii*, trichomoniasis y triquinosis. Así, la presente invención también puede usarse para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, como por ejemplo enfermedades de los pies y la boca, Coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus pleuropneumonia*, virus de la diarrea vírica bovina (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y *brochiseptica*.

En algunas realizaciones, el antígeno de interés puede ser un alérgeno. Un “alérgeno” es un antígeno que puede iniciar una estado de hipersensibilidad, o que puede provocar una reacción de hipersensibilidad inmediata en un individuo que ya está sensibilizado al alérgeno. Los alérgenos habitualmente son proteínas o sustancias químicas unidas a proteínas que tienen la propiedad de ser alergénicos; sin embargo, los alérgenos también pueden incluir materiales orgánicos o inorgánicos, derivados de una variedad de fuentes hechas por el hombre o naturales como por ejemplo materiales vegetales, metales, ingredientes de cosméticos o detergentes, látex, o similares. Las clases de alérgenos adecuados para usar en los procedimientos de la invención pueden incluir, pero sin limitación, pólenes, caspa de animales, herbáceas,

## ES 2 332 261 T3

mohos, polvos, antibióticos, venenos de insectos que pican, y una variedad de alérgenos ambientales (que incluyen sustancias químicas y metales), farmacéuticos y alimentarios. Los alérgenos habituales de los árboles incluyen pólenes de los árboles álamo de Virginia, chopo, fresno, abedul, arce, roble, olmo, nogal americano y nogal de pecana; los alérgenos vegetales habituales incluyen los de la cebada, ambrosia, plantago, rumex y amaranto; los alérgenos

- 5 vegetales por contacto incluyen los de avena venenosa, hiedra venenosa, ortigas; los alérgenos herbáceos habituales incluyen los alérgenos de la hierba timotea, sorgo, Bermuda, festuca y poas; los alérgenos habituales también pueden obtenerse de mohos u hongos como por ejemplo Alternaria, Fusarium, Hormodendrum, Aspergillus, Micropolispora, Mucor y actinomicetos termófilos; la penicilina y la tetraciclina son alérgenos antibióticos habituales; los alérgenos 10 epidérmicos pueden obtenerse del polvo de las casas u orgánicos (habitualmente de origen fúngico), de insectos como por ejemplo los ácaros (*dermatphagoides pterosinyssis*), o de fuentes animales como por ejemplo plumas, caspa de gatos y perros; los alérgenos alimentarios habituales incluyen leche y queso (lácteos), huevo, trigo, frutos secos ejemplo, cacahuates), marisco (por ejemplo, crustáceos), alérgenos de guisantes, judías y gluten; los alérgenos ambientales 15 habituales incluyen alérgenos de metales (níquel y oro), sustancias químicas (formaldehído, trinitrofenol y trementina), látex, caucho, fibras (algodón o lana), arpillería, tintes capilares, cosméticos, detergentes y perfumes; los alérgenos de medicamentos habituales incluyen alérgenos de anestésicos locales y salicilatos; los alérgenos antibióticos incluyen 20 alérgenos de penicilina y sulfonamida; y los alérgenos de insectos habituales incluyen los alérgenos de veneno de abeja, avispa y hormiga, y los de secreciones de las cucarachas. Los alérgenos particularmente bien caracterizados incluyen, pero sin limitación, los epítopos principal y críptico del alérgeno Der pi (Hoyne *et al.* (1994) Immunology 83:190-195), fosfolipasa A2 del veneno de abeja (PLA) (Akdis *et al.* (1996) J. Clin. Invest. 98: 1676-1683), alérgeno 25 Bet v 1 del polen de abedul (Bauer *et al.* (1997) Clin. Exp. Immunol. 107: 536-541), y el alérgeno herbáceo recombinante multiepitíptico rKBG8.3 (Cao *et al.* (1997) Immunology 90: 46-51). Estos y otros alérgenos adecuados están disponibles comercialmente y/o pueden prepararse fácilmente en forma de extractos siguiendo técnicas conocidas.

En otras realizaciones, el antígeno de interés puede ser un antígeno específico de tumor. Para los fines de la presente 25 invención, antígenos específicos de tumor incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los diversos MAGE (antígeno E asociado a melanoma), que incluyen MAGE 1, MAGE 2, MAGE 3 (péptido HLA-A1), MAGE 4, etc.; cualquiera de las diversas tirosinasas (péptido HLA-A2); ras mutante; p53 mutante; y antígeno p97 del melanoma. Otros antígenos específicos de tumor incluyen el péptido Ras y el péptido p53 asociado a los cánceres avanzados, los antígenos HPV 30 16/18 y E6/E7 asociados a los cánceres de cuello de útero, el antígeno MUC1-KLH asociado al carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembionario) asociado al cáncer colorrectal, los antígenos gp 100 o MART1 asociado al melanoma, y el antígeno PSA asociado al cáncer de próstata. La secuencia del gen p53 es conocida (véase por ejemplo, Harris *et al.* (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 4650-4656) y está depositada en GenBank con el N.º de acceso M14694. Así, las 35 composiciones adyuvantes de la presente invención pueden usarse para realizar procedimientos inmunoterapéuticos para tratar los cánceres de cuello de útero, mama, colorrectal, de próstata, de pulmón y melanomas.

Los antígenos para usar con la presente invención pueden obtenerse o producirse usando una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En particular, los antígenos pueden aislarse directamente de fuentes nativas, usando técnicas estándar de purificación. De forma alternativa, los antígenos pueden producirse por recombinación usando técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, Molecular Cloning: A 40 Laboratory Manual, Vols. I, II y III, segunda Edición (1989); ADN Cloning, Vols. I y II (D.N. Glover ed. 1985). Los antígenos para usar en el presente documento también pueden sintetizarse, basándose en secuencias de aminoácido descritas, mediante síntesis química con polímeros como por ejemplo síntesis de péptidos en fase sólida. Dichos procedimientos son conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, J. M. Stewart y J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2<sup>a</sup> Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, The Peptides: 45 Analysis, Synthesis, Biology, editores E. Gross y J. Meienhofer, Vol. 2, Academic Press, Nueva York, (1980), páginas 3-254, para las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida; y M. Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlín (1984) y E. Gross y J. Meienhofer, Editores, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, referencia anterior, Vol. 1, para las síntesis clásicas en solución.

Si se desea, las secuencias de polinucleótidos que codifican los antígenos que se describen anteriormente, pueden 50 obtenerse usando procedimientos de recombinación, como por ejemplo cribando adenotetas de ADNc y de ADN genómico de células que expresan el gen, derivando el gen a partir de un vector que se sepa que lo incluye. Además, el gen deseado puede aislarse directamente de las células y tejidos que lo contienen, usando estándar técnicas, como por ejemplo extracción con fenol y PCR de ADNc o de ADN genómico. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, referencia anterior, para una descripción de las técnicas que se usan para obtener y aislar moléculas de ADN. Las secuencias de 55 polinucleótidos también pueden producirse sintéticamente, en lugar de clonarse.

En aquellas composiciones en las que el componente antigénico se proporcionará mediante una secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de interés, la secuencia codificante para el antígeno seleccionado puede combinarse 60 con una o ambas de las secuencias codificantes para péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP para proporcionar una única construcción que porte las tres secuencias codificantes, combinado con sólo una de las secuencias codificantes para una subunidad de la toxina para proporcionar, por ejemplo, una composición de dos plásmidos, o puede proporcionarse en una construcción distinta o bien de una única construcción, o de construcciones múltiples que porten las secuencias codificantes de las subunidades de la toxina. En cada uno de los casos anteriores, 65 el antígeno puede estar ligado operablemente y su transcripción controlada por el mismo o por diferentes elementos de control, por ejemplo, promotores y potenciadores. En esas construcciones en las que se usa un único elemento de control para dirigir la transcripción de dos o más secuencias codificantes, puede usarse una secuencia interna de entrada a los ribosomas (IRES) para facilitar la transcripción de las múltiples secuencias.

*Administración de polinucleótidos*

Los polinucleótidos (moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias codificantes para la péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP seleccionada) que se describen en el presente documento pueden administrarse mediante cualquier procedimiento adecuado. En una realización preferida, que se describe más adelante, los polinucleótidos se administran recubriendo una o más construcciones adecuadas (por ejemplo, una o más construcciones de ADN plasmídico) que contienen las secuencias codificantes para los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés (y, en ciertas realizaciones, una secuencia codificante para un antígeno de interés en la misma construcción o en una diferente) sobre partículas transportadoras nucleares y después administrando las partículas recubiertas al sujeto o a las células. Sin embargo, los polinucleótidos de la presente invención también pueden administrarse usando un vector vírico o usando sistemas no víricos, por ejemplo, administración de ácido nucleico desnudo.

15 *Vectores víricos*

Se han empleado numerosos sistemas con base vírica para la administración génica. Por ejemplo, los sistemas retrovíricos son conocidos y generalmente emplean líneas de empaquetamiento que tienen una provirus defectuoso integrado (el “cooperador”) que expresa todos los genes del virus pero no puede empaquetar su propio genoma debido a una delección de la señal de empaquetamiento, que se conoce como la secuencia psi. Así, la línea celular produce cápsulas víricas vacías. Las líneas productoras pueden derivarse de las líneas empaquetadoras que, además del cooperador, contienen un vector vírico que incluye secuencias necesarias en *cis* para la replicación y el empaquetado del virus, conocidas como repeticiones terminales largas (LTR). La(s) molécula(s) de polinucleótidos de interés puede(n) insertarse en el vector y empaquetarse en las cápsulas virales sintetizadas por el cooperador retrovírico. Después el virus recombinante puede aislarse y administrarse a un sujeto (Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.219.740.) Los vectores retrovíricos representativos incluyen pero sin limitación los vectores como por ejemplo los vectores LHI, N2, INSAL, LSHL y LHL2 que se describen por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.219.740, así los derivados de estos vectores, como por ejemplo el vector N2 modificado que se describe en el presente documento. Los vectores retrovíricos pueden construirse usando técnicas notorias en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.219.740; Mann *et al.* (1983) Cell 33: 153-159.

Se han desarrollado sistemas basados en adenovirus para la administración de genes y son adecuados para administrar las moléculas de ácido nucleico que se describen en el presente documento. Los adenovirus humanos son virus de ADN bicanalario, que penetran en las células mediante endocitosis mediada por receptores. Estos virus están particularmente bien adaptados para la transferencia genética porque son fáciles de producir y de manipular y muestran una gran variedad de huéspedes *in vivo* e *in vitro*. Por ejemplo, los adenovirus pueden infectar células humanas de origen hematopoyético, linfoide y mieloide. Además, los adenovirus infectan las células diana en reposo y las que están replicándose. Al contrario que los retrovirus que se integran en el genoma del huésped, los adenovirus persisten extracromosómicamente minimizando así los riesgos asociados a la mutagénesis por inserción. El virus se produce fácilmente en grandes cantidades y es estable de forma que puede purificarse y almacenarse. Incluso en la forma con replicación competente, los adenovirus provocan únicamente un bajo nivel de morbilidad y no están asociados a enfermedades malignas en seres humanos. Por consiguiente, se han desarrollado vectores adenovirales que emplean estas ventajas. Para una descripción de los vectores adenovirales y sus usos véase, por ejemplo, Haj-Ahmad y Graham (1986) J. Virol. 57: 267-274; Bett *et al.* (1993) J. Virol. 67: 5911-5921; Mittereder *et al.* (1994) Human Gene Therapy 5: 717-729; Seth *et al.* (1994) J. Virol. 68: 933-940; Barr *et al.* (1994) Gene Therapy 1: 51-58; Berkner, K. L. (1988) BioTechniques 6: 616-629; Rich *et al.* (1993) Human Gene Therapy 4: 461-476.

Los vectores víricos adenoasociados (AAV) también pueden usarse para administrar las moléculas de polinucleótidos como se ha descrito en el presente documento. A este respecto, los vectores AAV pueden derivarse de cualquier serotipo de AAV, que incluye sin limitación, los vectores AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV7, etc. Los vectores AAV pueden tener uno o más de los genes AAV de tipo silvestre eliminados total o parcialmente, preferiblemente los genes *rep* y/o *cap*, pero mantienen una o más secuencias de repeticiones terminales invertidas flanqueantes (ITR) funcionales. Generalmente se considera que una secuencia ITR funcional es necesaria para el rescate, replicación y empaquetado del virión AAV. Así, un vector AAV incluye al menos las secuencias necesarias en *cis* para la replicación y el empaquetado (por ejemplo, una ITR funcional) del virus. La ITR no tiene que ser la secuencia nucleotídica de tipo silvestre, y puede alterarse, por ejemplo, mediante la inserción, delección o sustitución de nucleótidos, en tanto en cuanto la secuencia proporcione un rescate, replicación y empaquetado funcionales.

60 Los vectores de expresión AAV se construyen usando técnicas conocidas para proporcionar, en forma de componentes ligados operativamente en la dirección de la transcripción, al menos elementos de control que incluyen una región de inicio de la transcripción, el ADN de interés y una región de terminación de la transcripción. Los elementos de control se seleccionan para que sean funcionales en una célula de mamífero. La construcción resultante que contiene los componentes ligados operativamente está delimitado (5' y 3') por secuencias ITR de AAV funcionales.  
 65 Las construcciones de AAV adecuadas para diseñarse usando técnicas notorias en la técnica. Véase por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.173.414 y 5.139.941; las publicaciones internacionales n.º WO 92/01070 (publicada el 23 de enero de 1992) y WO 93/03769 (publicada el 4 de marzo de 1993); Lebkowski *et al.* (1988) Molec. Cell. Biol. 8: 3988-3996; Vincent *et al.* (1990) Vaccines 90 (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B.J. (1992) Current

# ES 2 332 261 T3

Opinion in Biotechnology 3: 533-539; Muzyczka, N. (1992) Current Topics in Microbiol. and Immunol. 158: 97-129; Kotin, A.M. (1994) Human Gene Therapy 5 : 793-801; Shelling y Smith (1994) Gene Therapy 1 : 165-169; y Zhou *et al.* (1994) J. Exp. Med. 179: 1867-1875.

5

## *Preparaciones farmacéuticas convencionales*

La formulación de una preparación que comprende las moléculas polinucleotídicas de la presente invención, con o sin la adición de una composición de antígenos, puede realizarse usando reacciones químicas y metodologías estándar para las formulaciones farmacéuticas todas las cuales están fácilmente disponibles para las personas de experiencia ordinaria. Por ejemplo, las composiciones que contienen uno o más vectores adecuados pueden combinarse con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar una preparación líquida.

Puede haber presentes sustancias auxiliares, como por ejemplo agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares, en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares generalmente son agentes farmacéuticos que no inducen una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos como por ejemplo agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También pueden incluirse las sales farmacéuticamente aceptables, en ellas, por ejemplo, sales de ácidos minerales como por ejemplo clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos como por ejemplo acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. También se prefiere, aunque no es necesario, que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que sirva como estabilizante, en particular para las moléculas de péptido, proteína u otro antígeno similar a incluir en la composición de la vacuna. Los ejemplos de vehículos adecuados que también actúan como estabilizantes para los péptidos incluyen, sin limitación, calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicos (PEG) de elevado peso molecular, y sus combinaciones. Hay disponible una descripción detallada de los excipientes, vehículos y sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991), que se incorpora al presente documento por referencia.

También pueden incluirse ciertos facilitadores de la captación y/o expresión de los ácidos nucleicos ("agentes facilitadores de la transfección") en las composiciones, por ejemplo, facilitadores como por ejemplo bupivacaína, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos facilitadores de la transfección como por ejemplo preparaciones en liposomas o lípidos que se usan habitualmente para administrar moléculas de ácido nucleico. Los liposomas aniónicos y neutros están ampliamente disponibles y son notorios para administrar moléculas de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Liposomes: A Practical Approach, (1990) RPC New Ed., IRL Press). Las preparaciones de lípidos catiónicos también son vehículos notorios para usar en la administración de moléculas de ácido nucleico. Las preparaciones adecuadas de lípidos incluyen DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio), disponible con la marca Lipofectin™, y DOTAP (1,2-bis(oleiloxy)3-(trimetilamonio)propano), véase, por ejemplo, Felgner *et al.* (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7416; Malone *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6077-6081; patentes de Estados Unidos n.º 5.283.185 y 5.527.928, y publicación de patente internacional n.º WO 90/11092, WO 91/15501 y WO 95/26356. Estos lípidos catiónicos preferiblemente pueden usarse asociados a un lípido neutro, por ejemplo DOPE (dioleilfosfatidiletanolamina). Todavía otras composiciones facilitadoras de la transfección que pueden añadirse a las anteriores preparaciones de lípidos o liposomas incluyen derivados de espermina (véase, por ejemplo, publicación de patente internacional n.º WO 93/18759) y los compuestos de permeabilización de las membranas como por ejemplo GALA, Granlicidine S y sales biliares catiónicas (véase, por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO 93/19768).

De forma alternativa, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden encapsularse, adsorberse o asociarse a los vehículos con partículas. Los vehículos en partículas adecuados incluyen los derivados de polímeros de polimetil metacrilato, así como micropartículas de adecuados derivados de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolida). Véase, por ejemplo, Jeffery *et al.* (1993) Pharm. Res. 10: 362-368. También pueden usarse otros sistemas y polímeros particulados, por ejemplo, polímeros como por ejemplo polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas.

Las composiciones formuladas así habitualmente incluyen uno o más moléculas de polinucleótidos (por ejemplo, vector plasmídico) que contiene las secuencias codificantes para los péptidos seleccionados de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP en una cantidad suficiente para actuar de adyuvante de una respuesta inmunológica contra un antígeno administrado de forma concomitante. Una cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Dicha cantidad entra dentro de un intervalo relativamente amplio que puede determinarse a través de ensayos rutinarios. Por ejemplo, puede obtenerse un efecto adyuvante adecuado usando tan solo 0,1 µg de ADN, mientras que en otras administraciones, puede usarse hasta 2 mg de ADN. Generalmente es de esperar que una dosis eficaz de polinucleótidos que contienen las secuencias codificantes de los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés esté en un intervalo de aproximadamente 1 µg a 1000 µg, sin embargo, las dosis superiores e inferiores a este intervalo también pueden encontrarse eficaces. Las composiciones así pueden contener de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9% de las moléculas polinucleotídicas.

# ES 2 332 261 T3

## *Administración de preparaciones farmacéuticas convencionales*

La administración de las preparaciones farmacéuticas que se describen anteriormente puede realizarse en una dosis, de forma continua o intermitente durante el transcurso del tratamiento. Es decir, una vez formuladas adecuadamente, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a un sujeto *in vivo* usando una variedad de vías y técnicas. Por ejemplo, pueden proporcionarse las preparaciones líquidas en forma de una solución, suspensión o emulsión y administrarse por inyección parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa usando una aguja y jeringuilla convencionales, o usando un sistema de inyección de líquidos a chorro. Las preparaciones líquidas también pueden administrarse por vía tópica a la piel o a tejidos mucosos, o proporcionarse en forma de un spray finalmente atomizado adecuado para la administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen 10 la administración oral, supositorios y técnicas de administración transdérmica activa o pasiva.

De forma alternativa, las composiciones pueden administrarse *ex vivo*, por ejemplo se conoce la administración y reimplante de células transformadas en un sujeto (por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación 15 con fosfato cálcico, electroporación, y microinyección directa a los núcleos). Sin embargo, la administración lo más habitualmente será mediante una aguja y jeringuilla convencionales para las composiciones líquidas y las parásas suspensiones líquidas que contienen composiciones particuladas. Los procedimientos para determinar los medios y dosis de administración más eficaces son notorios para los expertos en la técnica y variarán dependiendo del vehículo de administración, la composición de la terapia, las células diana, y el sujeto que se esté tratando. Las administraciones únicas y múltiples pueden realizarse con el nivel y el patrón de dosis que seleccione el médico a cargo. Debería 20 entenderse que una única construcción de vector polinucleotídico puede portar más de una región codificante de subunidades y/o región codificante de antígenos. De forma alternativa, también pueden administrarse a un sujeto vectores separados (por ejemplo, vectores víricos, plásmidos, o cualquier combinación de los mismos), donde cada uno expresa uno o más péptido(s) de la subunidad(es) y/o antígeno(s) de la toxina derivada de cualquier patógeno como se ha descrito en el presente documento.

Además, también se pretende que los polinucleótidos administrados mediante los procedimientos de la presente invención se combinen con otras composiciones y terapias adecuadas. Por ejemplo, para aumentar más una respuesta inmunitaria en un sujeto, las composiciones y procedimientos que se describen en el presente documento pueden 30 combinarse con la administración de sustancias auxiliares (por ejemplo, otros adyuvantes), como por ejemplo agentes farmacológicos, citocinas o similares. Las sustancias auxiliares pueden administrarse, por ejemplo, en forma de proteínas u otras macromoléculas al mismo tiempo, antes o después de la administración de las moléculas polinucleotídicas que se han descrito en el presente documento. Las composiciones con moléculas de ácido nucleico también pueden administrarse directamente al sujeto o, de forma alternativa, administrarse *ex vivo*, a las células derivadas del sujeto, 35 usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

## *Partículas recubiertas*

En una realización, se administran construcciones de polinucleótido que contienen las secuencias codificantes 40 para los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP seleccionados, y otros componentes auxiliares (como por ejemplo secuencias codificantes para uno o más antígenos) usando partículas portadoras. Los procedimientos para la administración mediada por partículas para administrar dicho ácido nucleico son conocidos en la técnica. Así, una vez preparados y purificados de forma adecuada, las construcciones de vectores plasmídicos que 45 se describen pueden recubrirse sobre partículas portadoras (por ejemplo, vehículos nucleares) usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Las partículas portadoras se seleccionan a partir de materiales que tienen una densidad adecuada con en el intervalo de tamaños de partículas que habitualmente se usan para la administración intracelular a partir de un dispositivo de administración de partículas apropiado. El tamaño de partícula portadora óptimo, por supuesto, dependerá del diámetro de las células diana.

Para los fines de la presente invención, pueden usarse partículas transportadoras nucleares de tungsteno, oro, platino 50 e iridio. Se prefieren las partículas de tungsteno y oro. Las partículas de tungsteno están fácilmente disponibles en tamaños medios de 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Aunque dichas partículas tienen una densidad óptima para usar en los procedimientos de administración de partículas, y permiten un recubrimiento muy eficaz con ADN, el tungsteno puede ser potencialmente tóxico para ciertos tipos celulares. Por consiguiente, las partículas de oro o de oro microcristalino (por ejemplo, oro en polvo A1570, disponible de Engelhard Corp., East Newark, NJ) también encontrarán uso con los presentes procedimientos. Las partículas de oro proporcionan uniformidad de tamaño (disponible de Alpha Chemicals en tamaños de partícula de 1-3  $\mu\text{m}$ , o disponibles en Degussa, South Plainfield, NJ con un intervalo de tamaños de partícula que incluyen 0,95  $\mu\text{m}$ ) y toxicidad reducida.

Se conocen numerosos procedimientos que han sido descritos para recubrir o precipitar ADN o ARN sobre partículas de oro o tungsteno. La mayoría de dichos procedimientos generalmente combinan una cantidad predeterminada 60 de oro o tungsteno con ADN plasmídico,  $\text{CaCl}_2$  y espermidina. La solución resultante se agita en un vórtice continuamente durante el procedimiento de recubrimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Después de la precipitación del ácido nucleico, las partículas recubiertas pueden transferirse a membranas adecuadas y dejarse secar antes de usar, recubrirse sobre superficies de un módulo o casete de muestra, o cargarse en un casete de administración para usar en un dispositivo de administración de partículas adecuado.

# ES 2 332 261 T3

Los antígenos peptídicos también pueden recubrirse sobre las mismas o similares partículas transportadoras nucleares. Por ejemplo, los péptidos pueden unirse a una partícula transportadora simplemente mezclando los dos componentes en una proporción determinada empíricamente, mediante precipitación con sulfato de amonio u otros procedimientos de precipitación en disolventes familiares para los expertos en la técnica, o mediante acoplamiento químico

- 5 del péptido a la partícula transportadora. El acoplamiento de los restos de L-cisteína a oro ha sido descrito anteriormente (Brown *et al.*, Chemical Society Reviews 9: 271-311 (1980)). Otros procedimientos incluirían, por ejemplo, disolver el péptido en etanol absoluto, agua, o una mezcla de alcohol y agua, añadir la solución a una cantidad de partículas transportadoras, y después secar la mezcla en un chorro de aire o gas nitrógeno mientras se agita en un vórtice. De forma alternativa, el antígeno puede secarse sobre partículas transportadoras centrifugando a vacío. Una 10 vez secas, las partículas recubiertas pueden resuspenderse en un disolvente adecuado (por ejemplo, acetato de etilo o acetona), y triturarse (por ejemplo, mediante ultrasonidos) para proporcionar una suspensión sustancialmente uniforme. Las partículas transportadoras nucleares recubiertas con el antígeno después pueden combinarse con partículas 15 transportadoras nucleares que portan la construcción(es) de los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP y administrarse en una única etapa de inyección de las partículas, o administrarse por separado a partir de las composiciones de subunidades de las toxinas.

## *Administración de partículas recubiertas*

20 Tras su formación, las partículas transportadoras nucleares recubiertas con las preparaciones de ácido nucleico de la presente invención, solas o combinadas por ejemplo, con preparaciones de antígenos, se administran a un sujeto usando técnicas de administración mediada por partículas.

En la técnica se conocen diversos dispositivos de administración de partículas adecuados para las técnicas de administración mediada por partículas, y todos son adecuados para usar en la práctica de la invención. Los actuales diseños 25 de dispositivos emplean una descarga explosiva, eléctrica o gaseosa para impulsar las partículas transportadoras nucleares recubiertas hacia las células diana. Las partículas recubiertas pueden estar a su vez unidas de forma que se puedan soltar a una lámina portadora móvil, o unidas de forma que se puedan soltar a una superficie por la que pasa un chorro de gas, levantando las partículas de la superficie y acelerándolas hacia la diana. Un ejemplo de un dispositivo 30 de descarga gaseosa se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.204.253. Un dispositivo de tipo explosivo se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.945.050. Un ejemplo de un aparato de aceleración de partículas del tipo de descarga eléctrica se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.120.657. Otro tipo de aparato de descarga eléctrica adecuado para usar en el presente documento se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.149.655. La descripción de todas estas patentes se incorpora a la presente memoria por referencia en su totalidad.

35 Las partículas recubiertas se administran al sujeto a tratar de una forma compatible con la formulación de la dosis, y en una cantidad que será eficaz para provocar el efecto adyuvante/respuesta inmunitaria deseados. La cantidad de la composición a administrar que, en el caso de las moléculas de ácido nucleico está generalmente en el intervalo desde 0,001 a 1000 µg, más habitualmente de 0,01 a 10,0 µg de moléculas de ácido nucleico por dosis, y en el caso de las 40 moléculas de péptido o proteína es de 1 µg a 5 mg, más habitualmente de 1 a 50 µg de péptido, dependiendo del sujeto a tratar. La cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y el estado general del individuo que esté siendo inmunizado y de la secuencia de nucleótidos o péptido particular que se seleccione, así como de otros factores. La cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica después de leer la presente memoria descriptiva.

45

## *Composiciones con partículas*

De forma alternativa, los polinucleótidos que portan las secuencias que codifican los péptidos de las subunidades 50 de la exotoxina de ribosilación de ADP, así como uno o más restos de antígenos seleccionados, pueden formularse en forma de una composición con partículas. De forma más particular, la formulación de partículas que comprende una o más moléculas polinucleotídicas puede realizarse usando reacciones químicas y metodologías estándar para las formulaciones farmacéuticas todas las cuales están fácilmente disponibles para las personas de experiencia razonable. Por ejemplo, puede combinarse una o más construcciones de vectores y/o componentes antigenicos con uno o más 55 excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición de vacuna. Puede haber presentes sustancias auxiliares, como por ejemplo agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponadoras del pH y similares, en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares generalmente son agentes farmacéuticos que en sí mismos no inducen una respuesta inmunitaria en el individuo que recibe la composición, y que pueden administrarse sin toxicidad indebida. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, 60 pero sin limitación, líquidos como por ejemplo agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. Pueden incluirse en las sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de ácidos minerales como por ejemplo clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos vehículos adecuados que también actúan como estabilizantes para los péptidos incluyen, sin limitación calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, 65 de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicos (PEG) de elevado peso molecular, y sus combinaciones. Hay disponible una descripción detallada de los excipientes, vehículos, estabilizantes y otras sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

## ES 2 332 261 T3

Las composiciones incluirán una cantidad de los polinucleótidos que codifican el péptido de la subunidad de la toxina que es suficiente para proporcionar el efecto adyuvante deseado contra un antígeno administrado de forma concomitante, tal como se define anteriormente. Una cantidad eficaz apropiada puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica. Dicha cantidad entrará dentro de un intervalo relativamente amplio, generalmente en el intervalo de aproximadamente 0,001  $\mu\text{g}$  a 25 mg o más de la construcción del ácido nucleico de interés, y las cantidades específicas adecuadas pueden determinarse a través de pruebas rutinarias. Las composiciones pueden contener de

5 aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9% de la(s) molécula(s) de ácido nucleico. Si se incluye un componente antígeno en la composición, o se usan los procedimientos para proporcionar una composición de antígeno con partículas, el antígeno estará presente en una cantidad adecuada como se describe anteriormente. Después las composiciones se preparan en forma de partículas usando técnicas estándar, como por ejemplo mediante evaporación simple (secado al aire), secado en vacío, secado por pulverización, liofilización, liofilización por pulverización, recubrimiento en spray, precipitación, formación de partículas en fluidos supercríticos y similares. Si se desea, las partículas resultantes pueden densificarse usando las técnicas que se describen en la publicación de patente internacional de propiedad compartida n.º WO 97/48485.

10 15 Los envases monodosis o multidosis, en los que las partículas pueden envasarse antes del uso, pueden comprender un envase sellado herméticamente que incluya una cantidad adecuada de las partículas que comprenda una construcción de ácido nucleico adecuada y/o un antígeno seleccionado (por ejemplo, para proporcionar un composición de vacuna de componentes múltiples). Las composiciones con partículas pueden envasarse en forma de una formulación estéril, y el envase sellado herméticamente puede diseñarse por lo tanto para que mantenga la esterilidad de la formulación hasta su uso en los procedimientos de la invención. Si se desea, los envases pueden adaptarse para su uso directo en un dispositivo de administración de partículas. Dichos envases pueden tomar forma de cápsulas, sobres de papel de aluminio, saquitos, cassetes y similares. En el presente documento se describen los dispositivos de administración de partículas apropiados (por ejemplo, las jeringuillas sin agujas).

20 25 El envase en el que se empaquetan las partículas puede rotularse además de forma que identifique la composición y proporcione información relevante sobre las dosis. Además, el envase puede rotularse con una nota de la forma prescrita por una agencia gubernamental, por ejemplo la Food and Drug Administration, donde la nota indique la autorización de la agencia según la Ley Federal de la fabricación, uso o venta del adyuvante, antígeno (o composición de vacuna) contenido en él para la administración a seres humanos.

30 35 Las composiciones con partículas después pueden administrarse usando una técnica de administración transdérmica. Preferiblemente, las composiciones con partículas se administrarán mediante un procedimiento de inyección en polvo, por ejemplo, se administrarán con un sistema de jeringuilla sin agujas como por ejemplo los que se describen en las publicaciones de patente internacional de propiedad compartida n.º WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513, y WO 96/20022.

40 45 La administración de partículas con tales sistemas de jeringuilla sin agujas habitualmente se practica con partículas que tienen un tamaño aproximado que generalmente varía en el intervalo de 0,1 a 250  $\mu\text{m}$ , preferiblemente que varía en el intervalo de aproximadamente 10-70  $\mu\text{m}$ . Las partículas de un tamaño mayor a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$  también pueden administrarse con los dispositivos, siendo el límite máximo el punto en el que el tamaño de las partículas provocaría un daño impropio a las células de la piel. La distancia real que penetrarán las partículas administradas a la superficie diana depende del tamaño de la partícula (por ejemplo, el diámetro nominal de las partículas asumiendo una geometría básicamente esférica), de la densidad de las partículas, de la velocidad inicial a la que la partícula impacta sobre la superficie, y de la densidad y viscosidad cinemática del tejido epitelial diana. A este respecto, las densidades óptimas de las partículas para usar en la inyección sin agujas generalmente varía entre aproximadamente 0,1 y 25 g/cm<sup>3</sup> preferiblemente entre aproximadamente 0,9 y 1,5 g/cm<sup>3</sup>, y las velocidades de inyección generalmente varían entre aproximadamente 100 y 3.000 m(seg, o más. Con una presión gaseosa apropiada, las partículas que tienen un diámetro medio de 10-70  $\mu\text{m}$  pueden acelerarse a través de la boquilla a velocidades cercanas a las supersónicas de un flujo de gas impulsor.

50 55 Las composiciones que contienen una cantidad terapéuticamente eficaz de las moléculas en polvo que se han descrito en el presente documento pueden administrarse a cualquier tejido diana adecuado mediante los dispositivos de administración de partículas que se describen anteriormente. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse al músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago páncreas, riñón, vesícula, estómago, intestino, testículos, ovarios, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándulas y tejidos conjuntivos. Para las moléculas de ácido nucleico, la administración preferiblemente se realiza, y las moléculas se expresan en células diferenciadas terminalmente; sin embargo, las moléculas también pueden administrarse a células no diferenciadas o parcialmente diferenciadas como por ejemplo células hematopoyéticas y fibroblastos epiteliales.

60 65 Si se desea, estos sistemas de jeringuilla sin agujas pueden proporcionarse en una forma previamente cargada que contenga una dosis adecuada de las partículas que comprenden las secuencias codificantes de los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP de interés. La jeringuilla cargada puede envasarse en un contenedor herméticamente sellado, que puede además estar rotulado como se describe anteriormente.

Así, puede usarse el procedimiento para obtener partículas con ácido nucleico que tengan un tamaño que varíe en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 250  $\mu\text{m}$ , preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150  $\mu\text{m}$ , y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ ; y una densidad de

# ES 2 332 261 T3

las partículas que varíe en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm<sup>3</sup> y una densidad aparente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm<sup>3</sup>, o superior.

De forma similar, pueden obtenerse partículas de los antígenos seleccionados que tengan un tamaño que varíe en el

- 5 intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 µm, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 150 µm, y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 µm; una densidad de las partículas que varíe en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm<sup>3</sup>, y una densidad aparente preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm<sup>3</sup>, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 g/cm<sup>3</sup>.

## 10 *Potenciación de las respuestas inmunitarias*

En otra realización de la invención, se proporciona un procedimiento para potenciar una respuesta inmunitaria contra un antígeno de interés administrado de forma concomitante. En esencia, el procedimiento supone (a) administrar un antígeno de interés a un sujeto, (b) proporcionar una composición adyuvante de acuerdo con la presente invención, en el que dicha composición contiene una o más moléculas de ácido nucleico que contienen secuencias codificantes seleccionadas para péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP, y (c) administrar de forma concomitante la composición adyuvante al sujeto, mediante lo cual los péptidos de las subunidades de la toxina son expresados a partir de sus respectivas secuencias codificantes en una cantidad suficiente para provocar una respuesta inmunitaria potenciada contra el antígeno coadministrado. Como se describe en detalle en el presente documento anteriormente, las secuencias codificantes están ligadas operablemente a la misma o a diferentes secuencias reguladoras para proporcionar uno o más casetes de expresión. Estos casetes de expresión después se proporcionan en un vector adecuado, por ejemplo una construcción de vector plasmídico o un vector vírico.

- 25 En un aspecto, el procedimiento supone administrar la composición polinucleotídica a un sujeto usando técnicas estándar de administración génica que son conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.399.346, 5.580.859, 5.589.466. Habitualmente, la composición de vacuna polinucleotídica está combinada con un excipiente o vehículo de vacuna para proporcionar una preparación líquida (como se ha descrito en el presente documento anteriormente) y después se usa como solución, suspensión o emulsión inyectable para la administración por inyección parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa usando una aguja y jeringuilla convencionales, o usando un sistema de inyección de líquidos a chorro. Se prefiere que la composición se administre a la piel o al tejido mucoso del sujeto. Las preparaciones líquidas también pueden administrarse por vía tópica a la piel o a tejidos mucosos, o proporcionarse en forma de un spray finamente atomizado adecuado para la administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen la administración oral, suppositorios y técnicas de administración 30 transdérmica activa o pasiva. Las composiciones polinucleotídicas de forma alternativa pueden administrarse *ex vivo* a células derivadas del sujeto, después de lo cual las células se vuelven a implantar en el sujeto. Después de introducirla en el sujeto, la secuencia de ácido nucleico se expresa proporcionando los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP *in situ* en una cantidad suficiente para potenciar una respuesta inmunitaria contra el antígeno administrado de forma concomitante en el sujeto vacunado. Esta respuesta inmunitaria mejorada puede caracterizarse 35 como una respuesta humoral (anticuerpos) mejorada, una respuesta celular (CTL) mejorada, o caracterizarse como que mejora tanto la respuesta humoral como la celular contra el antígeno administrado de forma concomitante.

En ciertas realizaciones preferidas, la respuesta inmunitaria mejorada se caracteriza por una respuesta inmunitaria de tipo Th1 (celular) aumentada contra el antígeno administrado de forma concomitante, en lugar de una respuesta 45 de tipo Th2. A este respecto, la respuesta inmunitaria de tipo Th1 aumentada puede cualificarse por uno o más de los siguientes: mayores cantidades de linfocitos T cooperadores CD4+ y/o CTL CD8+ que producen interferón-γ; mayor actividad de los CTL específica de antígeno; mayores cantidades de anticuerpos específicos de antígeno de la subclase que habitualmente están asociados a la inmunidad celular (por ejemplo, IgG2a).

- 50 Se prefiere que las composiciones adyuvantes con polinucleótidos de la presente invención se administren en forma de partículas. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse usando un dispositivo de administración de partículas como se ha descrito en detalle en el presente documento anteriormente. En ciertas realizaciones, las composiciones polinucleotídicas pueden recubrirse sobre partículas transportadoras nucleares usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica y administrarse usando un procedimiento de administración mediado por partículas. 55 Las partículas portadoras se seleccionan a partir de materiales que tienen una densidad adecuada con en el intervalo de tamaños de partículas que habitualmente se usan para la administración intracelular a partir de un dispositivo de administración de partículas. El tamaño de partícula portadora óptimo, por supuesto, dependerá del diámetro de las células diana.

- 60 De forma alternativa, estos procedimientos pueden modificarse mediante la administración concomitante al sujeto de componentes adicionales o auxiliares. Por ejemplo, puede administrarse una composición de vacuna secundaria, en la que la composición secundaria puede comprender una vacuna con ácido nucleico, o la composición de vacuna secundaria puede comprender una vacuna convencional como por ejemplo un virus entero, un virus fraccionado o una vacuna de subunidades. La composición de vacuna secundaria puede combinarse con las composiciones de polinucleótidos de los péptidos de las subunidades de la exotoxina de ribosilación de ADP formando una única composición, o la composición de vacuna secundaria puede administrarse por separado en el mismo sitio o en uno diferente, o bien al mismo tiempo, o secuencialmente o con un intervalo de tiempo significativo como por ejemplo en una etapa de refuerzo algunos días después de que se haya administrado la composición inicial.

# ES 2 332 261 T3

Como anteriormente, la composición de vacuna secundaria y/u otro componente exotoxina auxiliar pueden administrarse mediante inyección usando o bien una jeringuilla convencional, o usando un sistema de administración mediada por partículas como también se ha descrito anteriormente. La administración habitualmente será por vía subcutánea, epidérmica, intradérmica, intramucosa (por ejemplo, nasal, rectal y/o vaginal), intraperitoneal, intravenosa, 5 oral o intramuscular. Otros modos de administración incluyen la administración tópica, oral y pulmonar, suppositorios y aplicaciones transdérmicas. El tratamiento con las dosis puede ser una pauta de dosis única o una pauta de dosis múltiples.

## 10 Sección experimental

A continuación se incluyen ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen únicamente con fin ilustrativo y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención en modo alguno.

15 Se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números que se usan (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.) pero, por supuesto, debería tenerse en cuenta algún error experimental y desviación.

### 20 Ejemplo 1

#### *Desarrollo de vectores de expresión que codifican las subunidades A y B de CT*

Se usó ADN genómico de *Vibrio cholerae* como plantilla para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) 25 para generar fragmentos de ADN que contenían las secuencias codificantes para las subunidades A y B de la toxina del cólera (CT). Para la generación por PCR del fragmento que codifica la subunidad A (CTA), se usaron los dos siguientes cebadores de oligodesoxirribonucleótidos:

30 Cebador 1: 5'-GGA GCT AGC AAT GAT GAT AAG TTA TAT CGG-3' (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 7); y

Cebador 2: 5'-CCT GGA TCC TCA TAA TTC ATC CTT AAT TCT-3' (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 8).

35 Para facilitar la inserción en un vector de expresión, los Cebadores 1 y 2 contienen secuencias adicionales en sus extremos 5' (fuera de la región de homología con la secuencia codificante de CTA) que incluyen sitios de reconocimiento para NheI y BamHI, respectivamente. Los cebadores 1 y 2 se diseñaron para dirigir la generación por PCR de un fragmento de la secuencia codificante de la subunidad A empezando por el nucleótido de la posición 164 y 40 terminando en el nucleótido de la posición 886 (N.<sup>o</sup> de acceso de GenBank D30053). Esta región engloba toda la secuencia codificante para el péptido de la subunidad A maduro pero no incluye la secuencia que codifica el péptido de señalización bacteriano que se encuentra en el extremo amino del péptido de la pre-subunidad A.

45 Para la generación por PCR del fragmento que codifica la subunidad B (CTB), se usaron los dos siguientes cebadores de oligodesoxirribonucleótidos:

Cebador 3: 5'-GGA GCT AGC ACA CCT CAA AAT ATT ACT GAT-3' (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 9); y

50 Cebador 4: 5'-CCT GGA TCC TTA ATT TGC CAT ACT AAT TGC-3' (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 10).

55 Para facilitar la inserción en un vector de expresión, los Cebadores 3 y 4 contienen secuencias adicionales en sus extremos 5' (fuera de la región de homología con la secuencia codificante de CTB) que incluyen sitios de reconocimiento para NheI y BamHI, respectivamente. Los cebadores 3 y 4 se diseñaron para dirigir la generación por PCR de un fragmento de la secuencia codificante de la subunidad B maduro empezando por el nucleótido de la posición 946 y terminando en el nucleótido de la posición 1257 (N.<sup>o</sup> de acceso de GenBank D30053). Esta región engloba toda la secuencia codificante para el péptido de la subunidad B maduro pero no incluye la secuencia que codifica el péptido de señalización bacteriano que se encuentra en el extremo amino del péptido de la pre-subunidad B.

60 Además de las dos reacciones PCR que se describen anteriormente, se realizó una tercera reacción PCR para generar una secuencia codificante para una forma modificada de la subunidad A de CT en la que se había eliminado el motivo KDEL de cuatro aminoácidos del extremo C. Esta reacción usaba el Cebador 1 (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 7) y el siguiente cebador:

Cebador 5: 5'-CCT GGA TCC TCA AAT TCT ATT ATG TGT ATC-3' (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 11).

# ES 2 332 261 T3

Todas las reacciones PCR se realizaron usando DNA polimerasa Pfu Turbo (obtenida de Strategene, La Jolla, CA) junto con el tampón de reacción para PCR que proporcionaba el fabricante. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos de (95°C durante 1 min., 55°C durante 2 min. 15 seg., 72°C durante 1 min.), 72°C durante 5 min., y mantener a 4°C.

Después de completar las reacciones PCR, los fragmentos recién sintetizados se dirigieron con las enzimas NheI y BamHI para generar extremos cohesivos, y los fragmentos individuales se insertaron en el vector de expresión pWRG7054 escindido con NheI y BamHI produciendo los siguientes clones: pPJV2002, pPJV2003, y pPJV2006 que codifican CTA, CTB, y CTA modificado (menos KDEL), respectivamente. El vector de clonación progenitor pWRG7054 contiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano con la secuencia del intrón A asociada. Además, en pWRG7054 se incluye la secuencia codificante para el péptido de señalización del activador de plasminógeno tisular humano para permitir la secreción de las células de mamífero de cualquier proteína cuya secuencia codificante esté insertada en el sitio NheI con el marco de lectura apropiado. Véase, por ejemplo, Chapman *et al.* (1991) Nuc. Acids Res. 19: 3979-3986, y Burke *et al.* (1986) J. Biol. Chem. 261: 12574-12578.)

Los mapas de restricción y las secuencias completas de los plásmidos pPJV2002, pPJV2003, y pPJV2006 se representan en las Figuras 1, 2, y 3, respectivamente.

## 20 Ejemplo 2

### *Desarrollo de vectores de expresión que codifican las subunidades A y B de la enterotoxina termolábil de E. coli*

Se usó ADN genómico de la cepa E078:H11 de *E. coli* (American Type Culture Collection n.º 35401) como plantilla para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para generar fragmentos de ADN que contenían las secuencias codificantes para las subunidades A y B de la enterotoxina termolábil (LT). Para la generación por PCR del fragmento que codifica la subunidad A, se usaron los dos siguientes cebadores de oligodesoxirribonucleótidos:

Cebador 6: 5'-GGA GCT AGC AAT GGC GAC AAA TTA TAC CGT-3' (SEC. ID. N.º: 12); y

Cebador 7: 5'-CCT GGA TCC TCA TAA TTC ATC CCG AAT TCT-3' (SEC. ID. N.º: 13).

Para facilitar la inserción en un vector de expresión, los Cebadores 6 y 7 contienen secuencias adicionales en sus extremos 5' (fuera de la región de homología con la secuencia codificante de LTA) que incluyen sitios de reconocimiento para NheI y BamHI, respectivamente. Los cebadores 6 y 7 se diseñaron para dirigir la generación por PCR de un fragmento de la secuencia codificante de la subunidad A empezando por el nucleótido de la posición 145 y terminando en el nucleótido de la posición 887 de la secuencia que se encuentra en la base de datos de GenBank (N.º de acceso AB011677). Esta región engloba toda la secuencia codificante para el péptido de la subunidad A maduro pero no incluye la secuencia que codifica el péptido de señalización bacteriano que se encuentra en el extremo amino del péptido de la pre-subunidad A.

Para la generación por PCR del fragmento que codifica la subunidad B, se usaron los dos siguientes cebadores de oligodesoxirribonucleótidos:

Cebador 8: 5'-GGA GCT AGC GCT CCC CAG TCT ATT ACA GAA-3' (SEC. ID. N.º: 14); y

Cebador 9: 5'-CCT GGA TCC CTA GTT TTC CAT ACT GAT TGC-3' (SEC. ID. N.º: 15).

Para facilitar la inserción en un vector de expresión, los Cebadores 8 y 9 contienen secuencias adicionales en sus extremos 5' (fuera de la región de homología con la secuencia codificante de LTB) que incluyen sitios de reconocimiento para NheI y BamHI, respectivamente. Los cebadores 8 y 9 se diseñaron para dirigir la generación por PCR de un fragmento de la secuencia codificante de la subunidad B empezando por el nucleótido de la posición 927 y terminando en el nucleótido de la posición 1238 de la secuencia que se encuentra en la base de datos de GenBank (N.º de acceso AB011677). Esta región engloba toda la secuencia codificante para el péptido de la subunidad B maduro pero no incluye la secuencia que codifica el péptido de señalización bacteriano que se encuentra en el extremo amino del péptido de la pre-subunidad B.

Además de las dos reacciones PCR que se describen anteriormente, se realizó una tercera reacción PCR para generar una secuencia codificante para una forma modificada de la subunidad A de LT en la que se había eliminado el motivo RDEL de cuatro aminoácidos del extremo C. Esta reacción usaba el Cebador 6 (SEC. ID. N.º: 12) y el siguiente cebador:

Cebador 10: 5'-CCT GGA TCC TCA AAT TCT GTT ATA TAT GTC-3' (SEC. ID. N.º: 16).

## ES 2 332 261 T3

Todas las reacciones PCR se realizaron usando DNA polimerasa Pfu Turbo (obtenida de Strategene, La Jolla, CA) junto con el tampón de reacción para PCR que proporcionaba el fabricante. Las condiciones para la PCR fueron las siguientes: 95°C durante 2 minutos, 30 ciclos de (95°C durante 1 min., 55°C durante 2 min. 15 seg., 72°C durante 1 min.), 72°C durante 5 min., mantener a 4°C.

5      Despues de completar las reacciones PCR, los fragmentos recién sintetizados se dirigieron con las enzimas NheI y BamHI para generar extremos cohesivos, y los fragmentos individuales se insertaron en el vector de expresión pWRG7054 escindido con NheI y BamHI produciendo los clones pPJV2004, pPJV2005, y pPJV2007 que codifican LTA, LTB, y LTA modificado (menos RDEL), respectivamente.

10     Los mapas de restricción y las secuencias completas de los plásmidos pPJV2004, pPJV2005, y pPJV2007 se muestran en las figuras 4, 5 y 6, respectivamente.

### 15 Ejemplo 3

*Potenciación de la respuesta de anticuerpos específicos de antígeno a una vacuna de ADN usando vectores plasmídicos que codifican CTA y/o CTB*

20     Se empleó un vector de vacunación con vector de ADN que codificaba la proteína M2 del virus influenza A para analizar los efectos adyuvantes de los vectores adyuvantes pPJV2002, pPJV2003, y pPJV2006 en el contexto de la vacunación con ADN mediada por partículas. La vacunación con ADN mediada por partículas se realizó precipitando el vector de vacunación con ADN de M2, con o sin diversas combinaciones de los vectores adyuvantes pPJV2002, pPJV2003 y pPJV2006, sobre partículas microscópicas de oro y acelerando las partículas de oro recubiertas hacia el interior de la epidermis de ratones usando un dispositivo de administración de partículas Powder Ject® XR-1 (PowderJect Vaccines, Inc. Madison, WI).

25     Más particularmente, se usó la secuencia del segmento de ARN n.º 7 (que codifica la proteína M2) de la cepa del virus influenza A/Kagoshima/10/95 (H3N2) como modelo para diseñar cebadores de PCR para facilitar el clonado de la secuencia codificante de M2 a partir de A/Sydney/5/97 (H3N2). Se usó la secuencia A/Kagoshima para el diseño de los cebadores dado que todavía no se ha determinado la secuencia del segmento 7 del ARN de A/Sydney. Era de esperar que el alto grado de conservación entre las secuencias de M2 facilitara el uso de cebadores diseñados a partir de una cepa vírica diferente.

30     Dado que M2 es traducido a partir de un ARN ayustado, se consideró necesario que las posiciones de los nucleótidos 27 a 714 en la región codificante del segmento 7 del ARN fueran eliminadas en el ayuste. Por consiguiente, se generó un conjunto de cebadores de PCR y se diseñó para generar la secuencia codificante de M2 completa pero asegurándose de que el intrón había sido eliminado limpiamente del clon de la secuencia codificante de M2 resultante. Los cebadores de la PCR que se usaron para generar el clon de la secuencia codificante de M2 de longitud completa fueron los siguientes:

35     Cebador 11: 5'-CCC AAG CTT CCA CCA TGA GCC TTC TAA CCG AGG  
                  TCG AAA CAC CTA TCA GAA ACG AAT GGG AGT GC-3'       (SEC. ID. N.º: 17); y

40     Cebador 12: 5'-CCC GGA TCC TTA CTC CAG CTC TAT GCT G-3'       (SEC. ID. N.º: 18).

45     El cebador 11 (SEC. ID. N.º: 17) contiene secuencias adicionales en su extremo 5' que incluyen un sitio de reconocimiento para HindIII y una secuencia de consenso de Kozak para facilitar el inicio de la traducción del ARNm. También, el cebador 12 (SEC. ID. N.º: ) contiene secuencias adicionales en su extremo 5' que incluyen una secuencia de reconocimiento para BamHI.

50     Se aisló ARN vírico de una muestra de A/Sydney/5/97 (H3N2) que se desarrolló en huevos de pollo con embrión. El proceso de aislamiento del ARN vírico empleó técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica. El ARN de este virus se usó en una reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) usando un kit de RT-PCR obtenido de Stratagene (La Jolla, GA). La etapa de reacción con RT se completó añadiendo 5,9 µl de agua sin ARNasas a un tubo de reacción. A este tubo se añadió 1,0 µl de 10X tampón MML V-RT y 1,0 µl de mezcla de dNTP también del kit, 1 µl de ARN de A/Sydney/5/97 y se añadieron 0,6 µl (0,6 µg) del Cebador 11 (SEC. ID. N.º: 17). La reacción se calentó a 65°C durante 5 minutos para desnaturizar el ARN, después de que se añadieran 0,5 µl de la transcriptasa inversa del kit. La reacción se incubó a 37°C durante 15 minutos para completar la etapa de transcripción inversa.

55     La etapa de reacción de la PCR se completó por la adición de los siguientes componentes a un nuevo tubo de reacción: 40 µl de agua; 5 µl de 10X tampón ultra HF del kit; 1,0 µl de mezcla de dNTP del kit; 1,0 µl de Cebador 11 (SEC. ID. N.º: 17) (1,0 µg); 1,0 µl del Cebador 12 (SEC. ID. N.º: 18) (1,0 µg); 1 µl de la mezcla de reacción de transcriptasa inversa anterior; y 1 µl Turbo PFU polimerasa del kit. La reacción PCR se realizó usando el siguiente

## ES 2 332 261 T3

esquema de incubación: 1 minuto a 95°C; seguido de 30 ciclos de (30 seg. a 95°C, 30 seg. a 46°C, 3 min a 68°C), seguido de 10 minutos a 68°C. Los productos de la PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2% revelando una única banda de ADN del tamaño esperado de aproximadamente 300 pb.

5 La banda de aproximadamente 300 pb se aisló del gel y se digirió con HindIII y BamHI para generar los extremos cohesivos necesarios para su inserción en el vector de expresión de vacunación con ADN pWRG7077 (Schmaljohn *et al.* (1997) J. Virol. 71 : 9563-9569). El ADN de pWRG7077 se digirió parcialmente con HindIII y completamente con BamHI para facilitar la inserción del inserto que codifica M2. La necesidad de una digestión parcial con HindIII del vector se debía a la presencia de un segundo sitio HindIII en el marcador de resistencia a Kanamicina de este 10 plásmido. El vector de vacunación con ADN de M2 resultante se denominó pM2-FL. El vector pM2-FL contiene el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hGMV) y su secuencia de intrón A asociada para dirigir la transcripción de la secuencia codificante de M2. Este vector también incluye una secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento bovina.

15 El plásmido pM2-FL después se precipitó sobre partículas de oro de 2 micrómetros sólo el vector, o las muestras de vector mezclado con vector adyuvante (es decir, el vector plasmídico con M2 se combinó con los vectores adyuvantes pPJ2002, pPJ2003, y/o pPJ2006). Específicamente, el ADN plasmídico (vector de M2 solo o vector de M2 más uno o más vectores adyuvantes) se mezcló con partículas de oro de 2 micrómetros (Degussa, Lote 65-0) en un tubo de 20 centrifugado pequeño que contenía 400 µl de espermidina 50 mM. La proporción entre ADN y oro variaba desde 2,5 µg de ADN por mg de oro a 4,0 µg de ADN por mg de oro, y un único lote contenía 26 mg de oro. El ADN se precipitó sobre las partículas de oro mediante la adición de un volumen 1/10 de 10% de CaCl<sub>2</sub> durante la agitación continuada del tubo en una mezcladora giratoria. Los complejos de ADN y oro se lavaron tres veces con etanol absoluto, y después se inyectaron en un tubo TEFZEL® (McMaster-Carr) alojado en una máquina giratoria de recubrimiento en tubos (PowderJect Vaccines, Inc., Madison WI) que recubre el interior del tubo con el complejo de oro y ADN. Esta 25 máquina giratoria con tubos se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.733.600. Véase la solicitud de patente PCT PCT/US95/00780 y las patentes de Estados Unidos n.º. 5.780.100; 5.865.796 y 5.584.807. Después de que se hubo completado el procedimiento de recubrimiento, los tubos se cortaron en forma de "cartuchos" de 1,25 cm (0,5 pulgadas) adecuados para cargar en un dispositivo de administración de partículas.

30 Se generaron las siguientes formulaciones de ADN y oro para un ensayo en ratones con adyuvante de vacuna de ADN.

Formulación n.º 1: vector de ADN pM2-FL solo, 2,5 µg de ADN por mg de oro, 0,5 mg de oro por cartucho;

35 Formulación n.º 2: vector de ADN pM2-FL precipitado sobre un lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro), vectores de ADN pPJ2002 y pPJ2003 coprecipitados sobre un segundo lote de oro (1,75 µg de cada vector adyuvante de ADN por mg de oro), los lotes de oro se mezclaron igual, 0,5 mg de oro por cartucho;

40 Formulación n.º 3: vector de ADN pM2-FL, vectores de ADN pPJ2002 y pPJ2003 todos coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg cada uno de pPJ2002 y pPJ2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

45 Formulación n.º 4: vector de ADN pM2-FL, vectores de ADN pPJ2006 y pPJ2003 todos coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg cada uno de ADN de pPJ2006 y pPJ2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 5: vector de ADN pM2-FL y pPJ2002 coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg de ADN de pPJ2002 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho; y

50 Formulación n.º 6: vector de ADN pM2-FL y pPJ2003 coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg de ADN de pPJ2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho.

55 Estas formulaciones de vacunas de ADN después se administraron a seis grupos de ratones de la manera siguiente. Cada grupo experimental contenía 7 animales y cada animal recibió dos inmunizaciones con la formulación respectiva con un periodo de descanso de 4 semanas entre inmunizaciones. Cada inmunización estaba constituida por dos administraciones en tandem a la epidermis abdominal (un cartucho por administración) usando un dispositivo de administración de partículas Powder Ject® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI) con una presión de helio de 2758 kPa (400 psi). Se recogieron muestras de suero 4 semanas después de la inmunización (primaria justo antes del refuerzo) y dos semanas después de la segunda inmunización o de refuerzo.

60 Las muestras de suero individuales se analizaron para determinar las respuestas de anticuerpos específicos contra M2 usando un ensayo ELISA en el que placas de 96 pocillos se recubrieron previamente con un péptido M2 sintético formado por la siguiente secuencia:

65 SLTTEVETPIRNEWECR (SEC. ID. N.º: 19). Se recubrieron placas ELISA con el péptido M2 toda la noche a 4°C usando el péptido en solución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración de 1 µg/ml. Al día siguiente, las placas se bloquearon leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas después

## ES 2 332 261 T3

se lavaron tres veces con tampón de lavado (solución salina tamponada con Tris 10 mM, 0,1% de Brij-35). Después se añadieron las muestras de suero diluidas a los pocillos y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado y se añadieron 100  $\mu$ L de un anticuerpo secundario y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario estaba formado por un anticuerpo marcado con biotina de cabra contra IgG de ratón (H+L) (Southern Biotechnology) que se diluyó 1:8000 en BSA/PBS/Tween-20 al 0,1%. Las placas después se lavaron tres veces, y se añadió un conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano (Southern Biotechnology) diluido a 1:8000 en PBS/Tween-20 al 0,1% y la placa se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales, se añadieron 100  $\mu$ L de sustrato TMB (Bio Rad, Hercules, CA) y se dejó que se formara el color durante 30 minutos a temperatura ambiente. La formación de color se terminó mediante la adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N y las placas se leyeron a 450 nm. Las titulaciones de las diluciones límite se determinaron identificando la dilución más alta de suero que todavía proporcionaba un valor de absorbancia de dos veces el valor de la absorbancia de ruido de fondo obtenida usando una muestra de control no inmunitaria.

Las titulaciones límites de los anticuerpos para los animales individuales de cada grupo y la media geométrica de las valoraciones para cada grupo experimental se muestran en la Tabla 1 más adelante.

20

TABLA 1

25

| N.º de formulación | Titulaciones individuales | Media geométrica de las titulaciones |
|--------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 1                  | 24.300                    | 99.781                               |
|                    | 24.300                    |                                      |
|                    | 72.900                    |                                      |
|                    | 218.700                   |                                      |
|                    | 218.700                   |                                      |
|                    | 218.700                   |                                      |
| 2                  | 72.900                    | 186.934                              |
|                    | 72.900                    |                                      |
|                    | 218.700                   |                                      |
|                    | 218.700                   |                                      |
|                    | 218.700                   |                                      |
|                    | 656.100                   |                                      |

30

35

40

45

50

55

60

65

## ES 2 332 261 T3

|    |            |           |         |
|----|------------|-----------|---------|
| 5  | 3          | 24.300    | 186.934 |
| 10 |            | 72.900    |         |
| 15 |            | 72.900    |         |
| 20 |            | 218.700   |         |
| 25 |            | 656.100   |         |
| 30 |            | 656.100   |         |
| 35 |            | 656.100   |         |
| 40 |            | 656.100   |         |
| 45 |            | 656.100   |         |
| 50 |            | 656.100   |         |
| 55 | 4          | 24.300    | 350.211 |
|    |            | 218.700   |         |
|    |            | 656.100   |         |
|    |            | 656.100   |         |
|    |            | 656.100   |         |
|    |            | 656.100   |         |
|    | 5          | ---- *    | 262.645 |
|    |            | 72.900    |         |
|    |            | 218.700   |         |
|    |            | 218.700   |         |
|    |            | 218.700   |         |
|    |            | 656.100   |         |
|    |            | 656.100   |         |
| 60 | 6          | 24.300    | 409.722 |
|    |            | 72.900    |         |
|    |            | 218.700   |         |
|    |            | 218.700   |         |
|    |            | 1.968.300 |         |
|    |            | 1.968.300 |         |
|    |            | 5.904.900 |         |
|    | * (muerto) |           |         |

Como puede observarse, todos grupos experimentales inmunizados con una formulación que contenía uno o más de los vectores adyuvantes que codificaban CT (Formulaciones n.<sup>o</sup> 2-6) mostraron una media geométrica de titulación mayor tras la inmunización de refuerzo con respecto a los animales de control inmunizados con el vector de M2 (Formulación n.<sup>o</sup> 1) solo.

# ES 2 332 261 T3

## Ejemplo 4

5 *Potenciación de las respuestas celulares específicas de antígeno a una vacuna de ADN que codifica el antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) usando vectores plasmídicos adyuvantes que codifican los péptidos de las subunidades CT-A y CT-B*

Se construyó un vector plasmídico del antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) de la manera siguiente. Para generar la región codificante de HbsAg, la construcción pAM6 (obtenida de la American Type Culture Collection “ATCC”) se cortó con NcoI y se trató con nucleasa dejudia mung para eliminar el codón inicial del antígeno X. El ADN resultante después se cortó con BamHI y se trató con ADN polimerasa de T4 para dejar el ADN con extremos romos y crear un casete de expresión de HBsAg. El casete de expresión de HBsAg está presente en el fragmento de 1,2 kB. La construcción del plásmido pPJ7077 (Schmaljohn *et al* (1997) J. Virol. 71: 9563-9569) que contenía el promotor temprano inmediato de CMV humano (cepa Towne) de longitud completa (con potenciador) se cortó con HindIII y Bg/II, y después se trató con ADN polimerasa de T4 y fosfatasa alcalina de ternero para crear ADN con extremos romos, y el casete de expresión de HBsAg se ligó en el plásmido proporcionando la construcción pWRG7128.

El plásmido pWRG7128 se precipitó sobre partículas de oro siguiendo el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3 anteriormente, de nuevo usando 2 µg de ADN por mg de oro. Los vectores plasmídicos adyuvantes que expresaban los genes de las subunidades CTA y CTB (pPJ2002 y pPJ2003, respectivamente) se mezclaron y se precipitaron sobre partículas de oro con cada plásmido a 1 µg de ADN por mg de oro de tal forma que la cantidad total también era de 2 µg de ADN por mg de oro. Las partículas de oro recubiertas con pWRG7128 y las recubiertas con pPJ2002 y pPJ2003 se mezclaron 1:1 y después se cargaron en tubos TEFZEL® como anteriormente. Para la inmunización, se administraron longitudes de 0,5 pulgadas de tubo que representaba 1 µg de ADN (0,5 µg de plásmido pWRG7128 y 0,25 µg de cada uno de los plásmidos pPJ2002 y pPJ2003) a la epidermis de ratones Balb/c usando el dispositivo de administración de partículas PowderJect® XR-1 usando las mismas condiciones de administración que se describen anteriormente en el Ejemplo 3. Para los controles, los ratones se inmuniaron con partículas de oro recubiertas solo con pWRG7128 (1 µg de ADN/0,5 mg de oro por administración). A los ratones (4 por grupo experimental) se les administró inmunización y refuerzo a las 4 semanas, después se sacrificaron a las 2 semanas del refuerzo. Se evaluaron las respuestas inmunitarias para determinar los niveles de anticuerpos en suero mediante ELISA. Además, se cuantificaron las respuestas inmunitarias celulares usando un ensayo de ELISPOT para cuantificar la secreción de IFN-γ específica de CD8.

35 Se analizaron las muestras de suero de ratones individuales para determinar los anticuerpos específicos para HBsAg usando un ensayo ELISA. Para el ELISA, se recubrieron placas de microtitulación Falcon Pro Sind toda la noche a 4°C con HBsAg purificado (BioDesign) a 0,1 µg por pocillo en PBS (solución salina tamponada con fosfato, BioWhittaker). Las placas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) con leche en polvo al 5%/PBS después se lavaron 3 veces con tampón de lavado (solución salina tamponada con Tris 10 mM, 0,1% de Brij-35), y las muestras de suero diluidas en tampón de dilución (2% de leche seca/PBS/0,05% de Tween 20) se añadieron a la placa y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces y se añadió un anticuerpo biotinilado 40 de cabra contra ratón (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en tampón de dilución a la placa y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la incubación, las placas se lavaron 3 veces, después de lo cual se añadió un conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en PBS y la placa se incubó 1 h más a temperatura ambiente. Después de tres lavados adicionales, las placas se lavaron 3 veces, después se añadió una solución de sustrato de TMB (BioRad) y la reacción se terminó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N después de 30 minutos. La densidad óptica se leyó a 450 nm. Las titulaciones límite se calcularon comparando las muestras con un patrón de titulación conocida.

50 Para los inmunoensayos celulares, se cultivaron *in vitro* suspensiones de una única célula de esplenocitos del bazo de los animales inmunizados en presencia de un péptido correspondiente a un epítopo de CD8 conocido en ratones Balb/c. El péptido se disolvió en DMSO (10 mg/ml) y se diluyó a 10 µg/ml en cultivo. La secuencia del péptido era IPQSLDSWWTS (SEC. ID. N.º: 20).

55 Para los ensayos ELISPOT de IFN-γ, se recubrieron placas de filtración con membrana Millipore Multiscreen con 50 µl de 15 µg/ml de antisuero contra IFN-γ (Pharmingen) en tampón carbonato 0,1 M estéril (pH 9,6) toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 6 veces con PBS estéril y después se bloquearon con medio de cultivo tisular que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se eliminó el medio y los esplenocitos se dispensaron en los pocillos con un total de 1x10<sup>6</sup> células por pocillo. Para los pocillos a los que se añadieron menos de 1 x 10<sup>6</sup> células de los animales inmunizados, se usaron las células de los animales no expuestos para llevar el total a 1 x 10<sup>6</sup>. Las células se incubaron toda la noche en una incubadora de cultivo tisular en presencia del péptido como se describe anteriormente. Despues las placas se lavaron 2 veces con PBS y 1 vez con agua destilada. Despues se realizaron 3 lavados con PBS. Se añadió un anticuerpo monoclonal biotinilado contra IFN-γ (Pharmingen) a la placa (50 µl de una solución de 1 µg/ml en PBS) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con PBS después de lo cual se añadieron 50 µl de un conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (1:1 000 en PBS, Pharmingen) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con PBS y 65 se añadió un sustrato con color para fosfatasa alcalina (BioRad) y la reacción se dejó proseguir hasta que aparecieron puntos oscuros. La reacción se terminó lavando con agua 3 veces. Las placas se secaron al aire y se contaron los puntos con un microscopio.

## ES 2 332 261 T3

Para los ensayos ELISA para IFN- $\gamma$ , las células se cultivaron toda la noche en placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo redondo en presencia del péptido. Se tomaron muestras del sobrenadante y se usaron para la determinación de los niveles de IFN- $\gamma$ . Se recubrieron placas de alta unión (Costar) con 100  $\mu$ l de 0,5  $\mu$ g/ml de anticuerpo contra IFN- $\gamma$  de ratón (Pharmingen) en tampón de bicarbonato pH 9,6. Las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente 5 con medio de cultivo tisular que contenía 10% de FBS después se lavaron 3 veces con un tampón de lavado de TBS. Las muestras de sobrenadante obtenidas de las células cultivadas se diluyeron en medio de cultivo tisular y se cargaron en la placa y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se añadió un anticuerpo secundario (0,5  $\mu$ g/ml de anticuerpo de rata contra IFN- $\gamma$  de ratón en PBS, Pharmingen) a las 10 placas y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces, y se añadió un conjugado de estreptavidina y peroxidasa de rábano (1:2000 en PBS, Southern Biotechnology) durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces, después se añadió una solución de sustrato de TMB (BioRad) y la reacción se terminó 15 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N. La densidad óptica se leyó a 450 nm.

Los resultados del ELISA se resumen a continuación en la Tabla 2.

15

TABLA 2

20

| Formulación                         | Titulaciones individuales | Titulaciones medias |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| pWRG7128                            | 40.000                    | 55.000              |
|                                     | 84.000                    |                     |
|                                     | 41.000                    |                     |
|                                     | 54.000                    |                     |
| pWRG7128,<br>pPJV2002 y<br>pPJV2003 | 28.000                    | 23.000              |
|                                     | 14.000                    |                     |
|                                     | 27.000                    |                     |
|                                     | 23.000                    |                     |

40

Como puede observarse, se encontró que los niveles de anticuerpos en los ratones de control inmunizados con pWRG7128 eran más elevados que los inmunizados con pWRG7128 combinado con los vectores adyuvantes de CT 45 (pPJV2002 y pPJV2003). La titulación límite media para los animales de control fue de 55.000, mientras que la titulación media en los animales inmunizados con la formulación adyuvante fue de 23.000. Sin, el grupo que recibió la formulación adyuvante en realidad recibió 1/2 de la cantidad de pWRG7128 que los controles, lo que puede justificar la reducción en las titulaciones de anticuerpos.

50

Las respuestas inmunitarias celulares medidas en los dos grupos de ratones indican una potenciación significativa de las respuestas celulares por los vectores adyuvantes CT. De forma más particular, los resultados del ensayo ELISA de IFN- $\gamma$  específico de CD8 se incluyen a continuación en la Tabla 3.

55

60

65

## ES 2 332 261 T3

TABLA 3

| <b>ELISA para IFN-γ</b>             |                                  |                   |                   |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Formulación</b>                  | <b>Número de células/pocillo</b> |                   |                   |
| pWRG7128                            | $1,0 \times 10^6$                | $0,5 \times 10^6$ | $0,1 \times 10^6$ |
|                                     | 0,77                             | 0,213             | 0,001             |
|                                     | 0,828                            | 0,121             | 0,027             |
|                                     | 1,35                             | 0,312             | 0,006             |
|                                     | 1,25                             | 0,323             | 0,007             |
|                                     | <b>(Media)</b>                   | <b>1,05</b>       | <b>0,242</b>      |
| pWRG7128,<br>pPJV2002 y<br>pPJV2003 | 1,96                             | 1,19              | 0,079             |
|                                     | 2,30                             | 1,70              | 0,263             |
|                                     | 2,20                             | 1,83              | 0,377             |
|                                     | 2,44                             | 2,33              | 0,898             |
| <b>(Media)</b>                      | <b>2,23</b>                      | <b>1,76</b>       | <b>0,404</b>      |

En este ensayo ELISA para IFN-γ, el número de células por pocillo representa el número de células recuperado de los animales inmunizados plaqueadas por pocillo. El número total de células por pocillo es constante (por ejemplo  $1 \times 10^6$ ) y está suplementado con las células de animales no expuestos. Los valores son las lecturas de DO medida a 450 nm. Los valores de DO más altos en el ELISA encontrados para las células de los ratones tratados con la formulación adyuvante de CT son indicativos de una mayor cantidad de IFN-γ segregado por estas células en respuesta al antígeno. Las células de ratones no expuestos no dió un valor de DO cuantificable en el ELISA para IFN-γ.

De forma más particular, los resultados del ensayo ELISPOT de IFN-γ específico de CD8 se incluyen a continuación en la Tabla 4.

TABLA 4

| <b>ELISPOT para IFN-γ</b>           |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>Formulación</b>                  | <b>Número de células positivas/<math>1 \times 10^6</math> células</b> |
| pWRG7128                            | 510   |
|                                     | 410   |
|                                     | 530   |
|                                     | 590   |
|                                     | <b>510</b>  |
| pWRG7128,<br>pPJV2002 y<br>pPJV2003 | 1.480   |
|                                     | 2.300   |
|                                     | 2.500   |
|                                     | 3.500   |
|                                     | <b>2.445</b>  |

## ES 2 332 261 T3

En este ensayo de ELISPOT para IFN- $\gamma$ , los números son la media de pocios duplicados y corresponden al número de células positivas por cada  $1 \times 10^6$  células. Las células de los ratones no expuestos no produjeron puntos en este ensayo de ELISPOT. Además, cuanto mayor es el número de ELISPOT que se encontraba en los animales tratados con la formulación adyuvante con CT, indica una mejor respuesta comparando con los animales que recibieron el antígeno (pWRG7128) solo.

Los datos anteriores demuestran que las composiciones adyuvantes novedosas de la presente invención tienen una potente capacidad de potenciar las respuestas inmunitarias celulares contra un antígeno coadministrado, en este caso un HBsAg expresado a partir de una vacuna de ADN.

10

### Ejemplo 5

15 *Potenciación de respuestas inmunitarias humorales y celulares contra el antígeno gp120 de HIV-1 usando la administración simultánea de un vector con el antígeno gp120 y vectores adyuvantes con CTA/CTB*

20 Se construyó un vector plasmídico que codificaba gp120 de HIV-1 de la manera siguiente. El vector se construyó a partir de un esqueleto del plásmido Bluescript (Stratagene, La Jolla, CA), el promotor temprano inmediato del cito-megalovirus humano (hCMV) (Fuller *et al.* (1994) Aids Res. Hum Retrovirus 10: 1433) y el sitio de poliadenilación tardío del virus SV40. El promotor del hCMV estaba contenido en un fragmento AccII de 619 pares de bases (pb) que se extendía 522 pb aguas arriba y 96 pb aguas abajo del sitio de iniciación de la transcripción temprano inmediato. El sitio de poliadenilación tardío del virus SV40 están contenido en un fragmento BamHI-BglI de aproximadamente 800 pb derivado de pSV2dhfr (anteriormente disponible en Bethesda Research Laboratories, n.º de catálogo 5369 SS). Inicialmente, se construyó un plásmido que codificaba gp160 de HIV-1, denominado "pC-Env". Este plásmido contenía 25 un fragmento KpnI-XbaI de 2565 pb de LAV-1<sub>BRU</sub> (N.º de acceso de ATCC 53069, N.º de acceso de GenBank K02013), que se inicia en la secuencia que codifica el aminoácido de la posición n.º 4 del extremo amino de gp160 madura. El fragmento de la secuencia que codifica env se colocó inmediatamente aguas abajo, y fusionado en marco con un fragmento sintético de 160 pb que codifica el péptido de señalización de la glucoproteína D (gD) del virus herpes simplex y ninguno de los aminoácidos del extremo amino de gD madura como se ha descrito anteriormente (Fuller *et al.* (1994) Aids Res. Hum Retroviruses 10: 1433).

30 El plásmido que codifica gp120 de HIV-1, denominado "pCIA-Env/T" en el presente documento, se construyó después de la manera siguiente. El plásmido pCIA-Env/T codifica una forma truncada de gp160 de HIV-1, y es idéntico a la construcción pC-Env pero las secuencias que codifican env están truncadas en el sitio HindIII en el nucleótido de la posición 8188. Esto produce un producto de traducción de gp 160 truncado, donde el punto de truncado está 128 restos aminoacídicos aguas abajo del sitio de procesamiento de gp120/gp41.

35 Se construyó un segundo vector plasmídico que codifica rev de HIV-1, denominado "pC-rev" en el presente documento, de la manera siguiente. Este vector contenía tres regiones discontinuas del provirus LAV-1<sub>BRU</sub> (nucleótidos de las posiciones 678-1085, 5821-6379, y 8188-8944) situados directamente entre el promotor del hCMV y la secuencia de poliadenilación tardía del virus SV40 como se describe anteriormente. Las tres regiones discontinuas contienen el principal donante de ayuste en 5', el primer exón del gen rev, y el segundo exón del gen rev, respectivamente.

40 Se usó una tercera construcción de vector plasmídico denominada "pWRG7054" como vector vacío de control en el estudio. La construcción pWRG7054 contenía una región codificante de SIV nef, el promotor temprano inmediato del hCMV con la región del intrón A, una secuencia directora de TPA y la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. La construcción del plásmido pWRG7054 se describe en el presente documento más adelante en el Ejemplo 6.

50 Se generaron las siguientes formulaciones de ADN y oro para un ensayo en ratones con adyuvante de vacuna de ADN.

55 Formulación n.º 1: Vector de control vacío (pWRG7054 sin el inserto de gp120), 2,5  $\mu$ g ADN por mg de oro, 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 2: Vector de control vacío (pWRG7054), vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), y el vector de ADN de rev (pC-rev) (para permitir la expresión de la molécula gp120 de HIV-1), todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,25  $\mu$ g de cada uno de ADN de pWRG7054 y ADN de pCIA-EnvT por mg de oro, y 0,125  $\mu$ g de pC-rev por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

60 Formulación n.º 3: Vector de control vacío (pWRG7054), vectores de ADN con CTA (pPJ2002) y CTB (pPJ2003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,25  $\mu$ g de ADN de pWRG7054 por mg de oro, y 1  $\mu$ g cada uno de ADN de pPJ2002 y pPJ2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

65 Formulación n.º 4: vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), vector de ADN de rev de HIV-1 (pC-rev), vectores de ADN de CTA (pPJ2002) y CTB (pPJ2003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,25  $\mu$ g de ADN de pCIA-EnvT por mg de oro, 0,125  $\mu$ g de ADN de pC-rev por mg de oro, y 1  $\mu$ g cada uno de ADN de pPJ2002 y pPJ2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho; y

## ES 2 332 261 T3

Formulación n.<sup>o</sup> 5: vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), vector de ADN de rev de HIV-1 (pC-rev), vectores de ADN de CTA-KDEL (pPJ2006) y CTB (pPJ2003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,25 µg de ADN de pCIA-EnvT por mg de oro, 0,125 µg de ADN de pC-rev por mg de oro, y 1 µg cada uno de ADN de pPJ2006 y pPJ2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho.

5

Los vectores plasmídicos pWRG7054, pCIA-EnvT, pC-rev, pPJ2002, pPJ2003 y pPJ2006 se precipitaron sobre partículas de oro siguiendo el procedimiento que se describe en el Ejemplo 3 anteriormente, de nuevo usando 2 µg de ADN por mg de oro. Las partículas de oro recubiertas se cargaron en un tubo TEFZEL®, usando de nuevo los procedimientos que se describen en el Ejemplo 3 anterior. Para la inmunización, se usaron dos longitudes de tubos de 1,25 cm (0,5 pulgadas) para administrar una carga total de 1,0 mg de oro a la epidermis de ratones Balb/c hembra de 5-6 semanas usando un dispositivo de administración de partículas funcionando en las mismas condiciones de administración que se describen anteriormente en el Ejemplo 3 2758 kPa (400 psi) de helio.

10 15 Cada uno de los cinco grupos experimentales (uno por cada formulación de vacuna de ADN) estaba formado por 4 animales, y cada animal recibió inmunizaciones primarias y de refuerzo con sus formulaciones respectivas, a las 0 y 5 semanas. Cada inmunización estaba constituida por dos administraciones en tandem a la epidermis abdominal (un cartucho por administración) usando un dispositivo de administración de partículas Powder Ject® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI).

20 25 30 Se analizaron las respuestas de anticuerpos en suero contra el antígeno gp120 de HIV usando un ensayo ELISA en especímenes recogidos la semana 5 y la semana 6,5 (después de la inmunización primaria y del refuerzo, respectivamente). Para el ELISA, se recubrieron placas Costar high binding EIA con 0,3 µg/pocillo de gp120 de HIV recombinante (Intracel) en 50 µl de PBS incubando toda la noche a 4°C. Las placas, se lavaron tres veces y se bloquearon con 2% de BSA en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Se añadieron diluciones seriadas de suero a las placas recubiertas, y se incubaron a 37°C durante una hora. Después de lavar, las placas se incubaron con una dilución 1:1500 de anticuerpo de cabra contra IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (H+L) (BioRad), seguido de desarrollo del color con p-nitrofenilfosfato (PNPP) (BioRad) y lectura de la DO a 405 nm.

35 Los resultados del ELISA se resumen más adelante en la Figura 7. Como puede observarse, se produjo un aumento de aproximadamente 20 veces de las respuestas inmunitarias específicas contra gp120 en los grupos que recibieron vectores adyuvantes (Formulación n.<sup>o</sup> 4 que contenía los vectores pPJ2002 y pPJ2003, o la Formulación n.<sup>o</sup> 5 que contenía los vectores pPJ2006 y pPJ2003) combinados con el vector gp120 comparado con el grupo que recibió el vector gp120 sin adyuvante (Formulación n.<sup>o</sup> 2, pCIA-EnvT).

40 45 50 55 Tras recoger las muestras de suero posteriores al refuerzo, se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazos de cada ratón. Los esplenocitos se aislaron aplastando los bazos, pasando las células a través de un colador de células de 70 µm y lisando los hematocitos con tampón de lisis ACK (BioWhittaker). Los esplenocitos se lavaron 3 veces con RPMI-5% de FCS y se volvieron a suspender a una concentración de 1 x 10<sup>7</sup> células/ml en RPM 1-10% de FCS suplementado con antibióticos, piruvato sódico y aminoácidos no esenciales.

La cantidad de IFN-γ específico de antígeno segregado por los esplenocitos se determinó usando un ELISA *in situ*. Se recubrieron placas Costar de unión alta con 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal (mAb) de captura contra IFN-gamma de ratón (Pharmingen, San Diego, CA) en 50 µl de tampón de bicarbonato (pH 9,6). Después de incubar toda la noche a 4°C, los pocillos se lavaron 5 veces con PBS y Tween-20 al 0,05% y se bloquearon con 200 µl de complete medio R10 a temperatura ambiente durante 2 horas. Se añadieron 1 x 10<sup>6</sup> esplenocitos a cada pocillo y se estimularon en medio solo (control negativo), o en medio con 1 µg/ml de un péptido gp120 de HIV que tenía la siguiente secuencia: RIQRGPGRAFVITGK (SEC. ID. N.<sup>o</sup>: 21). Después de una incubación de 24 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%, las placas se lavaron 2 veces con agua desionizada (DI) para lisar las células, después se lavaron 3 veces con PBS y Tween 20 al 0,05%, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 50 µl por pocillo de 1 µg/ml de mAb de detección biotinilado contra IFN-γ de ratón (Pharmingen). Las placas después se lavaron 5 veces y se incubaron durante 1 hora con 50 µl por pocillo de una dilución 1:8000 de solución de estrepavidina-peroxidasa de rábano (HRP) (Southern Biotechnology). Las placas se lavaron otra vez 5 veces y se consiguió el revelado colorimétrico mediante la adición de sustrato TMB (BioRad, Hercules, CA) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se terminó con la adición de ácido sulfúrico 1 N. La absorbancia a 450 nm se leyó con un lector de placas óptico.

60 65 Los resultados de este estudio se resumen más adelante en la Figura 8. Esta figura muestra el nivel relativo de producción de IFN-γ específico de antígeno en los 5 grupos diferentes de pruebas de vacunas que recibieron las formulaciones que se describen anteriormente (Formulaciones n.<sup>o</sup> 1-5). Es importante observar que los dos grupos de inmunización que recibieron el vector con gp120 (pCIA-EnvT) combinado con los vectores adyuvantes con CT (es decir, la Formulación n.<sup>o</sup> 4 que contenía los vectores pPJ2002 y pPJ2003, y la Formulación n.<sup>o</sup> 5 que contenía los vectores pPJ2006 y pPJ2003) presentaron niveles de IFN-γ significativamente mayores que el grupo de gp120 sin adyuvante (Formulación n.<sup>o</sup> 2 que contenía el vector de control vacío y pCIA-EnvT), (P <0,000001 y P = 0,0068, respectivamente). Estos datos demuestran la capacidad de las presentes combinaciones de vectores adyuvantes con CT de aumentar notablemente la inmunidad celular específica de antígeno contra un antígeno de HIV en un modelo animal.

## ES 2 332 261 T3

Además de un aumento en el nivel de producción de IFN- $\gamma$ , también aumentó notablemente el número de esplenocitos específicos del péptido gp120 de HIV que producían IFN- $\gamma$ , según se determinó mediante un procedimiento ELISPOT. En el ensayo ELISPOT, se recubrieron placas de nitrocelulosa (Millipore) con un anticuerpo de captura de IFN- $\gamma$ , se lavaron y se bloquearon como se describe anteriormente para el ELISA *in situ* para IFN- $\gamma$  de linfocitos T cooperadores. Los esplenocitos se añadieron a pocillos previamente recubiertos con un número de células inicial de 1 x 10<sup>6</sup> células/pocillo, y se estimularon en medio solo (control negativo) o en medio que contenía 1  $\mu$ g/ml de un péptido que contenía el epítopo de CTL para gp120 de HIV inmunodominante y que tiene la siguiente secuencia: RGPCRAFV-TI (SEC. ID. N.º: 22). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en CO<sub>2</sub> al 5%, se lavaron 2 veces con agua DI, 3 veces con PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 50  $\mu$ l por pocillo de 1  $\mu$ g/ml de mAb de detección contra IFN- $\gamma$  de ratón (Pharmingen). Las placas después se lavaron 5 veces y se incubaron durante 1 hora con 50  $\mu$ l por pocillo de una dilución 1:1000 de solución de estrepavidina y fosfatasa alcalina (ALP) (Mabtech). Las placas se lavaron de nuevo 5 veces y se logró el revelado colorimétrico mediante la adición de sustrato de ALP sobre membrana (BioRad, Hercules, CA) hasta que se formaron puntos (2-30 minutos, temperatura ambiente). La reacción se detuvo lavando con agua DI, y las placas se secaron al aire toda la noche. Los puntos se enumeraron con un microscopio a 40 aumentos. Sólo se valoraron los puntos grandes con bordes borrosos como células formadoras de puntos (SFC).

Los resultados de este ensayo de ELISPOT se representan en la figura 9 que muestra los niveles relativos de esplenocitos que producen IFN- $\gamma$  en los 5 grupos de prueba de vacunas diferentes (que recibieron las Formulaciones n.º 1-5, respectivamente). Es importante observar que los dos grupos de inmunización que recibieron el vector con gp120 (pCIA-EnvT) combinado con los vectores adyuvantes con CT (es decir, la Formulación n.º 4 que contenía los vectores pPJY2002 y pPJY2003, y la Formulación n.º 5 que contenía los vectores pPJY2006 y pPJY2003) presentaron un número significativamente mayor de células que producían IFN- $\gamma$  que el grupo de gp120 sin adyuvante (Formulación n.º 2 que contenía el vector de control vacío y pCIA-EnvT), ( $P < 0,000001$  y  $P = 0,0032$ , respectivamente). Estos datos demuestran la capacidad de las presentes combinaciones adyuvantes con CT de aumentar notablemente la inmunidad celular específica de antígeno contra un antígeno gp120 de HIV coadministrado en un modelo animal. Además, la mayor producción de IFN- $\gamma$  que se observa en estos estudios indica que el uso de las combinaciones de vectores adyuvantes con CT de la presente invención proporciona una respuesta inmunitaria de tipo Th1 robusta en los animales inmunizados.

30

### Ejemplo 6

*Potenciación de las respuestas de anticuerpos contra los antígenos nuclear y superficial de la hepatitis B usando la administración simultánea de un vector que codifica HBcAg y HBsAg con vectores adyuvantes con CTA/CTB*

35

Se construyó un vector plasmídico que contenía secuencias codificantes tanto para el antígeno nuclear de la hepatitis B (HBcAg) como para el antígeno superficial de la hepatitis B (HBsAg) de la manera siguiente. Las secuencias codificantes de HBcAg y HBsAg se obtuvieron ambas del clón pAM6 de HBV (N.º de acceso de ATCC 45020). Para generar la región codificante de HBsAg, la construcción pAM6 se cortó con NcoI y se trató con nucleasa de judía mung para eliminar el codón inicial del antígeno X. El ADN resultante después se cortó con BamHI y se trató con ADN polimerasa de T4 para dejar el ADN con extremos romos y crear un casete de expresión de HBsAg. El casete de expresión de HBsAg está presente en el fragmento de 1,2 kB. La construcción del plásmido pPJY7077 (Schmaljohn *et al* (1997) J. Virol. 71: 9563-9569) que contenía el promotor temprano inmediato de CMV humano (cepa Towne) de longitud completa (con potenciador) se cortó con HindIII y Bg/II, y después se trató con ADN polimerasa de T4 y fosfatasa alcalina de ternero para crear ADN con extremos romos, y el casete de expresión de HBsAg se ligó en el plásmido proporcionando la construcción pWRG7128.

Para generar la región codificante de HBcAg, se cortó la construcción pAM6 para crear un casete de expresión de HBcAg, después de lo cual se truncó la secuencia HBcAg mediante mutagénesis dirigida al sitio para eliminar la 50 región rica en argininas del extremo C de la partícula del antígeno nuclear (cuya delección no interfiere con la formación de las partículas). La secuencia de HBcAg truncada después se clonó en una construcción de plásmido que contenía el promotor del factor de elongación humano ("hELF", Mizushima *et al.* (1990) Nucl. Acids Res. 18: 5322) para proporcionar una construcción del vector con HBcAg.

55 Los cassetes de expresión que contenían: (a) el promotor/potenciador del CMV, la región 5' no traducida del intrón A, y el péptido de señalización del activador de plasminógeno tisular humano (hTPA) ("CMV-IA-TPA"); o (b) la secuencia polia de la hormona de crecimiento bovina (bGHpA) se obtuvieron cada una a partir de la construcción del vector JW4303 (donación del Dr. Harriet Robinson, Universidad de Massachusetts) y se insertó en un esqueleto plasmídico. La construcción resultante se cortó con NheI, se cargó con polimerasa y después se cortó con BamHI para generar un fragmento de vector que contenía el origen de replicación de pUC 19, el gen de resistencia a la ampicilina y la secuencia de bGHpA. El esqueleto del plásmido se cortó una segunda vez con Sall, se cargó con polimerasa, y se cortó con BamHI para liberar un fragmento del vector que contenían el fragmento del vector CMV-IA-TPA. Los dos fragmentos del vector se ligaron proporcionando una construcción denominada pWRG7054.

65 La construcción pWRG7054 se cortó con NheI, se cargó con polimerasa, y se cortó con BamHI para producir un fragmento de vector. La construcción del vector con HBcAg se cortó con NeoI, se cargó con polimerasa, y se cortó con BamHI para producir un fragmento de inserto. Estos dos fragmentos aislados se ligaron después generando una construcción denominada pWRG7063.

# ES 2 332 261 T3

PEL-Bos se cortó con EcoRI y se desfosforiló con fosfatasa intestinal de ternero para producir un fragmento de vector. El plásmido pWRG7063 se cortó con HindIII, se cargó con polimerasa, y se cortó con EcoRI para producir un fragmento de inserto que contenía el péptido de señalización de hTPA, la secuencia del antígeno HBcAg y la región bGHpA. Estos dos fragmentos se ligaron para proporcionar una construcción denominada pWRG7145.

5 La construcción pWRG7128 se cortó con EcoRI y se desfosforiló con fosfatasa intestinal de ternero para producir un fragmento de vector que contenía la región codificante de HBsAg con transcripción controlada por el promotor del hCMV. La construcción pWRG7145 se cortó con MfeI y EcoRI para producir un fragmento de inserto compuesto por el promotor/intrón de hELF, la secuencia del péptido de señalización de hTPA, la secuencia del antígeno de HBcAG y 10 la región bGHpA. Estos fragmentos después se ligaron para proporcionar la construcción del plásmido pPJ7193 que contenía las secuencias codificantes de HBcAg y HBsAg.

Después se generaron las siguientes formulaciones de ADN y oro para un ensayo en cerdos con adyuvante de vacuna de ADN.

15 Formulación n.º 1: Control, el vector con HBcAg/HBsAg (pWRG7193) solo, 2 µg de ADN por mg de oro, 0,5 mg de oro por cartucho; y

20 Formulación n.º 2: El vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193), los vectores de ADN con CTA-KDEL (pPJ72006) y CTB (pPJ72003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,0 µg de ADN de pWRG7193 por mg de oro, y 0,5 µg cada uno de ADN de pPJ72006 y pPJ72003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho.

25 El plásmido pWRG7193 o solo o con los vectores adyuvantes pPJ72006 y pPJ72003 se precipitó sobre partículas de oro siguiendo los procedimientos que se describen en el Ejemplo 3 anteriormente, de nuevo a una concentración final de 2 µg de ADN por mg de oro. Las partículas de oro recubiertas se cargaron en un tubo TEFZEL®, usando de nuevo los procedimientos que se describen en el Ejemplo 3 anterior. Dos grupos experimentales (de 5 cerdos domésticos cada uno) recibieron dos inmunizaciones con la Formulación n.º 1 y la Formulación n.º 2, respectivamente, donde las dos inmunizaciones tenían un intervalo de 6 semanas entre ellas. Cada inmunización consistía en dos disparos en tandem a 3.447,5 kPa (500 psi) en la zona de la ingle usando un dispositivo de administración de partículas PowderJect® XR-1 en el que cada disparo utilizaba un único cartucho. Así, en el grupo de control (Formulación n.º 1), cada inmunización consistía en la administración de un total de 1 mg de oro y 2 µg del vector de vacunación con ADN pWRG7193. De forma similar en el grupo de prueba con adyuvante (Formulación n.º 2), cada inmunización consistía en una administración total de 1 mg de oro, 2 µg del vector de vacunación con ADN pWRG7193, y 1 µg de cada uno 30 de los vectores adyuvantes pPJ72006 y pPJ72003. Se extrajeron muestras de sangre de cada animal en el momento de la inmunización de refuerzo (semana 6) y 2 semanas después de la inmunización de refuerzo (semana 8).

40 La detección de las respuestas específicas de anticuerpo para el antígeno nuclear se realizó de la manera siguiente: se recubrieron placas ELISA con el antígeno nuclear de la hepatitis B (Biodesign) a 100 ng/ml en PBS. Después de recubrir toda la noche a 4°C, las placas se bloquearon leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 3 veces con PBS que contenía 0,05% de Tween-20. Se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suero de los cerdos en leche desnatada al 2%/PBS/0,01% de Tween-20 y se añadieron a las placas de ELISA. Despues de la incubación a temperatura ambiente durante 2 horas, las placas se lavaron 3 veces con PBS/0,05% de Tween-20. El anticuerpo secundario consistía en uno de cabra contra IgG de cerdo conjugado a 45 peroxidasa de rábano (Kirkegaard y Perry) que se diluyó 1:2000 en 2% de leche desnatada/PBS/0,01% de Tween-20, y se añadió a las placas durante a 1 hora de incubación a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 5 veces con PBS/0,05% de Tween-20 y se añadieron 100 µl de sustrato TMB. La formación del color se realizó durante 15 minutos y se terminó mediante la adición de 100 µl de N<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Las placas se leyeron a 450 nm. La figuras 10 y 11 muestran la media geométrica de los valores de absorbancia a las 6 y 8 semanas, respectivamente, para cada uno de 50 los dos grupos de cerdos a 4 diluciones de suero diferentes. Estos datos demuestran una marcada potenciación de las titulaciones de anticuerpo contra el antígeno nuclear de la hepatitis B después del uso de los vectores adyuvantes con CT pPJ72006 y pPJ72003.

55 Además de las elevadas respuestas humorales al antígeno nuclear de la hepatitis B, se observó una elevación cuantificable de las respuestas de anticuerpos específicos para el antígeno superficial de la hepatitis B en el grupo de prueba con adyuvante además. Se cuantificaron los anticuerpos específicos del antígeno superficial en las muestras de suero de los animales individuales usando un kit de ensayo comercial (AUSAB, Abbott Laboratories). Este kit permite cuantificar las respuestas de anticuerpo en términos de miliunidades internacionales (mIU/ml) usando un panel estándar. La media geométrica de las titulaciones de anticuerpos contra el antígeno superficial del grupo de control (Formulación n.º 1) y del grupo de prueba con adyuvante (Formulación n.º 2) fue de 285 y 662 mIU/ml, respectivamente, 60 demostrando la capacidad de los presentes plásmidos adyuvantes (pPJ72006 y pPJ72003) de aumentar las respuestas inmunitarias contra un antígeno codificado por un vector distinto.

## Ejemplo 7

*Potenciación de la respuesta celular de tipo Th1 a una vacuna de ADN usando vectores plasmídicos que codifican subunidades CT o LT*

5 Se empleó el vector de vacunación con ADN pM2-FL que codifica la proteína M2 del virus influenza A para analizar los efectos adyuvantes de los vectores adyuvantes pPJ2002, pPJ2003, pPJ2004, pPJ2005, pPJ2006 y pPJ2007 en el contexto de la vacunación con ADN mediada por partículas. La vacunación con ADN mediada por partículas se realizó precipitando el vector de vacunación con ADN de M2, con o sin diversas combinaciones de 10 los vectores adyuvantes sobre partículas microscópicas de oro y acelerando las partículas de oro recubiertas hacia el interior de la epidermis de ratones usando un dispositivo de administración de partículas Powder Ject® XR-1 (Powder-Ject Vaccines, Inc. Madison, WI). La construcción del vector plasmídico de ADN pM2-FL se describe en el presente documento anteriormente en el Ejemplo 3.

15 Como anteriormente, el plásmido pM2-FL después se precipitó sobre partículas de oro de 2 micrómetros sólo el vector, o las muestras de vector mezclado con vector adyuvante. Específicamente, el ADN plasmídico (vector pM2-FL solo o vector pM2-FL más uno o más vectores adyuvantes) se mezcló con partículas de oro de 2 micrómetros (Degussa) en un tubo de centrifugado pequeño que contenía espermidina. La precipitación se realizó siguiendo las metodologías del Ejemplo 3, y las partículas de oro recubiertas se recubrieron después sobre la superficie interna de 20 un tubo TEFZEL® como también se ha descrito en el Ejemplo 3. El tubo después se cortó en cartuchos de 1,25 cm (0,5 pulgadas) adecuados para cargar en el dispositivo de administración de partículas.

Se generaron las siguientes formulaciones de ADN y oro para un ensayo en ratones con adyuvante de vacuna de ADN.

25 Formulación n.º 1: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector plasmídico vacío pWRG7054 antes de la precipitación sobre el mismo lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (0,1 µg de pM2-FL y 2,0 µg de pWRG7054), 0,5 mg de oro por cartucho;

30 Formulación n.º 2: vector de ADN pM2-FL combinado con los vectores de ADN de CTA y CTB (pPJ2002 y pPJ2003) antes de la precipitación sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de cada vector adyuvante de ADN por mg de oro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

35 Formulación n.º 3: vector de ADN pM2-FL combinado con los vectores de ADN de CTA-KDEL y CTB (pPJ2006 y pPJ2003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de cada vector adyuvante de ADN por mg de oro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

40 Formulación n.º 4: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de CTA-KDEL (pPJ2006) y suplementado con el vector plasmídico vacío pWRG7054 todos combinados y coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de pPJ2006, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

45 Formulación n.º 5: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de CTA (pPJ2002) y suplementado con el vector plasmídico vacío pWRG7054, todos los ADN combinados y coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de pPJ2002, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

50 Formulación n.º 6: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de CTA (pPJ2003) y suplementado con el vector plasmídico vacío pWRG7054, todos los ADN combinados y coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de pPJ2003, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

55 Formulación n.º 7: vector de ADN de pM2-FL combinado con los vectores de ADN de LTA y LTB (pPJ2004 y pPJ2005) antes de la precipitación sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de cada vector adyuvante de ADN por mg de oro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 8: vector de ADN pM2-FL combinado con los vectores de ADN de LTA-RDEL y LTB (pPJ2007 y pPJ2005) todos coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de cada vector adyuvante de ADN por mg de oro, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

60 Formulación n.º 9: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de LTA-RDEL (pPJ2007) y suplementado con el vector plasmídico vacío pWRG7054 todos combinados y coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de pPJ2007, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

65 Formulación n.º 10: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de LTA (pPJ2004) y suplementado con el vector plasmídico vacío pWRG7054, todos los ADN combinados y coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de pPJ2004, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho; y

# ES 2 332 261 T3

Formulación n.º 11: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de LTB (pPJ2005) y suplementado con el vector plasmídico vacío pWRG7054, todos los ADN combinados y coprecipitados sobre un único lote de oro, 2,1 µg de ADN total por mg de oro (1,0 µg de pPJ2005, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho.

5

Estas formulaciones de vacunas de ADN después se administraron a once grupos de ratones de la manera siguiente. Cada grupo experimental contenía 8 animales y cada animal recibió dos inmunizaciones con su formulación respectiva con un periodo de descanso de 4 semanas entre inmunizaciones. Cada inmunización estaba constituida por 10 dos administraciones en tandem a la epidermis abdominal (un cartucho por administración) usando un dispositivo de administración de partículas Powder Ject® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI) con una presión de helio de 2758 kPa (400 psi). Las muestras de suero se extrajeron dos semanas después de la inmunización segunda o de refuerzo.

15 Se ensayaron las muestras de suero individuales para determinar los anticuerpos específicos de M2, las respuestas para ambas subclases IgG1 e IgG2a usando el ensayo ELISA del Ejemplo 3 anterior para determinar la titulación de IgG total, excepto que se empleó un conjugado de anticuerpo secundario específico para IgG1 o IgG2a. El anticuerpo de cabra contra IgG1 de ratón conjugado con biotina se obtuvo de Southern Biotechnology Associates, Inc. (n.º de catálogo 1070-08, concentración de 0,5 mg/ml) y se usó a una dilución de 1/8000. El anticuerpo de cabra contra IgG2 de ratón conjugado con biotina se obtuvo de la misma fuente (n.º de catálogo 1080-08, concentración de 0,5 mg/ml) y también se usó a una dilución de 1/8000.

20 Se determinó la media geométrica de las titulaciones de anticuerpos para IgG1 e IgG2a específicas de antígeno M2 para cada grupo experimental, y se calcularon las proporciones entre IgG1 e IgG2a. Estos datos se reseñan a 25 continuación en la Tabla 5.

TABLA 5

30

35

40

45

50

55

| N.º de formulación | Proporción entre IgG1 e IgG2a |
|--------------------|-------------------------------|
| 1                  | 160,99                        |
| 2                  | 3,44                          |
| 3                  | 13,59                         |
| 4                  | 63,20                         |
| 5                  | 2,63                          |
| 6                  | 30,97                         |
| 7                  | 0,02                          |
| 8                  | 0,50                          |
| 9                  | 9,00                          |
| 10                 | 4,53                          |
| 11                 | 27,00                         |

Como puede observarse con referencia a la Tabla 5, la adición de las subunidades A o B, o de las diversas combinaciones de subunidades A y B a la formulación de vacuna de ADN de M2 produjo reducciones significativas en la proporción entre IgG1 e IgG2a que provocaba la vacuna de ADN de M2 (pM2-FL) en ausencia de adyuvante (Formulación n.º 1). La mayor reducción en la proporción provino del uso de las combinaciones de los vectores de LTA más LTB, y LTA-RDEL más LTB (Formulaciones n.º 7 y n.º 8, respectivamente). En ambas de estas, el uso de los adyuvantes de polinucleótidos de la presente invención provocó mayores titulaciones de IgG2a que de IgG1 específicas del antígeno M2, que es una característica de una respuesta inmunitaria de tipo Th1 en los ratones.

65 Los resultados de los grupos experimentales que recibieron las Formulaciones n.º 1, n.º 2 y n.º 7 se representaron en términos del logaritmo de la proporción entre IgG1 e IgG2a en la figura 12. Como puede observarse en esa figura, al emplear el adyuvante de la composición de vacuna de ADN de pM2-FL con los vectores adyuvantes CTA más CTB

# ES 2 332 261 T3

(Formulación n.º 2) provocó un descenso de orden de magnitud 2 en la proporción entre IgG1 e IgG2a con respecto a la composición de vacuna con pM2-FL sin adyuvante (Formulación n.º 1). Además, se observó otro descenso de orden de magnitud 2 en esta proporción cuando el ADN de la vacuna con pM2-FL se complementó con los vectores adyuvantes de LTA más LTB (Formulación n.º 7).

5

## Ejemplo 8

### *Adición de secuencias codificantes de péptidos de señalización a vectores adyuvantes que codifican CT o LT*

10

Las construcciones de los vectores que contenían las subunidades de las toxinas CTA, CTB, LT A y LTB (pPJ2002, pPJ2003, pPJ2004, y pPJ2005, respectivamente) se modificaron para eliminar las secuencias codificantes de los péptidos de señalización tpa, y se construyó un vector de vacunación con ADN dual que codificaba los antígenos superficial y nuclear de la hepatitis B para usar en los siguientes experimentos.

15

Las condiciones de PCR estándar que se usaron para la construcción/modificación de los vectores fueron las siguientes: 1x tampón nuclear de PCR con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Promega Corp., Madison, WI); 0,400 μM de cada cebador; 200 μM de cada dNTP (USB Inc., Cleveland, OH); 2,5 μg de polimerasa Taq (Promega Corp., Madison, WI); 1,0 ng de ADN plantilla; agua hasta 100 μl; y una capa de recubrimiento de aceite mineral (Aldrich Chemical Inc., Milwaukee WI). Un termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA) se programó para funcionar con la siguiente rutina: 4 minutos a 95°C; 30 ciclos de (1 minuto a 95°C/1 minuto 15 segundos a 55°C/1 minuto a 72°C); 10 minutos a 72°C; mantener a 4°C. Los productos de la amplificación se eliminaron de la reacción PCR usando el kit de purificación de PCR QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia CA) antes de escindir con las enzimas de restricción (New England Biolabs, Beverly, MA). Todos los productos de la PCR se secuenciaron después de clonar para asegurar la fidelidad de la amplificación.

20

Más específicamente, se construyó un vector de vacunación con ADN dual que codificaba los dos antígenos superficial y nuclear de la hepatitis B de la manera siguiente. La construcción pWRG7128 (Ejemplo 4) que contenía la secuencia codificante del antígeno superficial se modificó usando una serie de técnicas estándar de biología molecular para proporcionar la construcción dual (antígenos superficial y nuclear). Inicialmente, la construcción pWRG7128 se modificó para eliminar la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina y sustituirla por la región de poliadenilación de beta-globina de conejo. Se ligó un primer fragmento de inserción que contenía el promotor del CMV con las secuencias del exón 1 y exón 2, y un segundo fragmento de inserción que contenía una segunda región de poliadenilación de beta-globina de conejo en la construcción pWRG7128 modificada, y se insertó un adaptador construido hibridando oligonucleótidos sintéticos entre los sitios Sph1 y Pst1 localizados inmediatamente aguas arriba del promotor del CMV insertado.

25

El plásmido mpSmpCC (GlaxoSmithKline, Reino Unido) se sometió a PCR con los siguientes cebadores: 5'-GCC GCT AGC ATG GAC ATT GAC CCT TAT AAA GA-3' (SEC. ID. N.º: 23) y 5'-CCA GGA TCC TTA ACA TTG AGA TTC C-3' (SEC. ID. N.º: 24) para generar una secuencia codificante con el antígeno nuclear adw2 de la hepatitis B. Este producto de la PCR se cortó con Nhe1 y BamHI para generar un fragmento de inserción, que después se modificó para que incluyera un sitio Bgl2 aguas abajo y se insertó en un vector de clonación. El vector de clonación se cortó con Pst1 y EcoR1 para generar un fragmento de inserción con el antígeno nuclear; el plásmido pWRG7128 modificado se cortó con Pst1 y Mfe1 para generar un fragmento de vector, y el fragmento del inserción del antígeno nuclear se ligó en el fragmento de vector, produciendo la construcción de plásmido dual con los antígenos superficial y nuclear.

30

Las construcciones de vectores que contenían las subunidades de la toxina CTA, CTB, LTA y LTB (pPJ2002, pPJ2003, pPJ2004, y pPJ2005, respectivamente) se modificaron para eliminar las secuencias codificantes del péptido de señalización tpa meramente escindiendo las secuencias codificantes de tpa usando enzimas de restricción para producir las siguientes construcciones: CTA sin TPA, CTB sin TPA, LTA sin TPA, y LTB sin TPA, respectivamente.

35

El plásmido dual con los antígenos superficial y nuclear se combinó con ADN plasmídico irrelevante (para un control sin adyuvante) o con las construcciones de vectores de las subunidades de la toxina y se precipitó sobre partículas de oro de 2 micrómetros. Específicamente, el ADN plasmídico (vector plasmídico dual con los antígenos superficial y nuclear) más dos vectores adyuvantes (para proporcionar una combinación de CTA/CTB o LTA/LTB) se mezcló con partículas de oro de 2 micrómetros (Degussa) en un pequeño tubo de centrifugadora que contenía espermidina. La precipitación se realizó siguiendo las metodologías del Ejemplo 3, y las partículas de oro recubiertas se recuperaron después sobre la superficie interna de un tubo TEFZEL® como también se ha descrito en el Ejemplo 3. El tubo después se cortó en cartuchos de 1,25 cm (0,5 pulgadas) adecuados para cargar en el dispositivo de administración de partículas.

40

Así, se generaron las siguientes formulaciones de ADN y oro para un ensayo en ratones con adyuvante de vacuna de ADN:

45

Formulación n.º 1: (“sin adyuvante”) 1 μg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 μg de vector plasmídico de ADN irrelevante;

## ES 2 332 261 T3

Formulación n.º 2: (“CT”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN pPJ2002 (CTA), 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN pPJ2003 (CTB);

5 Formulación n.º 3: (“CT sin TPA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de CTA sin TPA, 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN con CTB sin TPA;

Formulación n.º 4: (“CTA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de pPJ2002 (CTA);

10 Formulación n.º 5: (“CTA sin TPA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de CTA sin TPA;

Formulación n.º 6: (“CTB”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de pPJ2003 (CTB);

15 Formulación n.º 7: (“CTB sin TPA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de CTB sin TPA;

20 Formulación n.º 8: (“LT”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de pPJ2004 (LTA), 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de pPJ2005 (LTB);

Formulación n.º 9: (“LT sin TPA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de LTA sin TPA, 0,5  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de LTB sin TPA;

25 Formulación n.º 10: (“LTA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN pPJ2004 (LTA); Formulación n.º 11: (“LTA sin TPA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de LTA sin TPA;

30 Formulación n.º 12: (“LTB”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN pPJ2005 (LTB); y

Formulación n.º 13: (“LTS sin TPA”) 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1  $\mu\text{g}$  de vector plasmídico de ADN de LTS sin TPA.

35 En un primer estudio, se administraron varias de las formulaciones de vacuna de ADN que se describen anteriormente a cinco grupos de ratones usando el dispositivo de administración de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI). Cada grupo experimental contenía 5 animales y cada animal recibió dos inmunizaciones con la formulación respectiva con un periodo de descanso de cuatro semanas entre inmunizaciones. Las Formulaciones 40 que se analizaron fueron las siguientes: Formulación n.º 1 (sin adyuvante); la Formulación n.º 2 (CT); la Formulación n.º 3 (CT sin TPA); la Formulación n.º 8 (LT); y Formulación n.º 9 (LT sin TPA). Todos los animales se sacrificaron dos semanas después de la segunda inmunización, y se recolectaron los bazo para usarlos en los ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL-4. Para los inmunoensayos celulares, se cultivaron *in vitro* suspensiones de una única célula de esplenocitos del bazo de los animales inmunizados en presencia de un péptido correspondiente a un építopo de linfocito T 45 (o bien del antígeno superficial o del nuclear) en ratones. El péptido se disolvió en DMSO (10 mg/ml) y se diluyó a 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en cultivo.

Para los ensayos ELISPOT, se recubrieron placas de filtración con membrana Millipore Multiscreen con 50  $\mu\text{l}$  del antisero apropiado (15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de antisero contra IFN- $\gamma$  o contra IL-4, Pharmingen) en tampón carbonato 0,1 M estéril (pH 9,6) toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 6 veces con PBS estéril y después se bloquearon con medio de cultivo tisular que contenía suero bovino fetal (FBS) al 10% durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se eliminó el medio y los esplenocitos se dispensaron en los pocillos con un total de  $1 \times 10^6$  células por pocillo. Para los pocillos a los que se añadieron menos de  $1 \times 10^6$  células de los animales inmunizados, se usaron las células de los animales no expuestos para llevar el total a  $1 \times 10^6$ . Las células se incubaron toda la noche en una incubadora de cultivo tisular en presencia del péptido como se describe anteriormente. Después las placas se lavaron 2 veces con PBS y 1 vez con agua destilada. Despues se realizaron 3 lavados con PBS. Se añadió un anticuerpo monoclonal biotinilado contra IFN- $\gamma$  o contra IL-4 (Pharmingen) a la placa (50  $\mu\text{l}$  de una solución de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en PBS) y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 6 veces con PBS después de lo cual se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de un conjugado de estreptavidina y fosfatasa alcalina (1:1 000 en PBS, Pharmingen) y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. 55 Las placas se lavaron 6 veces con PBS y se añadió un sustrato con color para fosfatasa alcalina (BioRad) y la reacción se dejó proseguir hasta que aparecieron puntos oscuros. La reacción se terminó lavando con agua 3 veces. Las placas 60 se secaron al aire y se contaron los puntos con un microscopio.

Se evaluó el efecto adyuvante de las secuencias codificantes de las subunidades de la toxina segregadas o no segregadas determinando las respuestas en ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL-4 a los dos antígenos superficial y nuclear de la hepatitis B (“sAg” y “cAg”) codificados por la construcción dual de antígenos superficial y nuclear, y estos resultados se compararon como se indica en las figuras 13A-13D. Como puede observarse, los vectores adyuvantes segregados (que contenían la secuencia de señalización) con CT y LT (Formulaciones n.º 2 y n.º 8, respectivamente) produjeron

aumentos significativos ( $P \leq 0,05$ ) en las respuestas de IFN- $\gamma$  a ambos antígenos superficial y nuclear, y en la respuesta de IL-4 al antígeno superficial (véanse las figuras 13A, 13B y 13C). Con respecto a las respuestas de IL-4 al antígeno nuclear, la falta de efecto adyuvante por los vectores de LT (Formulaciones n.<sup>o</sup> 8 y n.<sup>o</sup> 9) es coherente con las observaciones de que la toxina LT es más adyuvante de las respuestas Th1 que la toxina CT. Y lo más importante, los vectores

5 CT y LT que carecen de las secuencias de señalización (Formulaciones n.<sup>o</sup> 3 y n.<sup>o</sup> 9, respectivamente) mostraron un efecto adyuvante más débil, que se observa particularmente en los datos ELISPOT de IFN- $\gamma$  para los dos antígenos superficial y nuclear (véanse las figuras 13A y 13C, donde se produjo un descenso estadísticamente significativo en la actividad adyuvante gracias a la delección de las secuencias de señalización.

10 Finalmente, la diferencia claramente observable del efecto adyuvante entre los segregados (Formulaciones n.<sup>o</sup> 2 y n.<sup>o</sup> 8) y los no segregados (Formulaciones n.<sup>o</sup> 3 y n.<sup>o</sup> 9) ayuda a establecer que los efectos adyuvantes observados no se deben a los motivos CpG incluidos en los vectores adyuvantes dado que los vectores que contenían señal y los que no contenían señal no tienen ninguna diferencia en el contenido en ADN bacteriano (CpG) sin embargo muestran diferencias significativas en su capacidad de aumentar las respuestas de IFN- $\gamma$  específicas del antígeno superficial.

15 En un segundo estudio, se administraron las formulaciones de vacuna de ADN que se describen anteriormente a ocho grupos de ratones usando el dispositivo de administración de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI). Cada grupo experimental contenía 5 animales y cada animal recibió dos inmunizaciones con la formulación respectiva con un periodo de descanso de cuatro semanas entre inmunizaciones. Las Formulaciones que se analizaron fueron las siguientes: Formulación n.<sup>o</sup> 1 (sin adyuvante); Formulación n.<sup>o</sup> 2 (CT); Formulación n.<sup>o</sup> 4 (CTA); Formulación n.<sup>o</sup> 5 (CTA sin TPA); Formulación n.<sup>o</sup> 6 (CTB); Formulación n.<sup>o</sup> 7 (CTB sin TPA); Formulación n.<sup>o</sup> 8 (LT); Formulación n.<sup>o</sup> 10 (LTA); Formulación n.<sup>o</sup> 11 (LTA sin TPA); Formulación n.<sup>o</sup> 12 (LTB); y Formulación n.<sup>o</sup> 13 (LTB sin TPA). Todos los animales se sacrificaron dos semanas después de la segunda inmunización, y se recolectaron losbazos para usarlos en los ensayos ELISPOT de IFN- $\gamma$  e IL-4 que se describen en el presente documento anteriormente.

20 Como resultado de este segundo estudio (no se muestran datos), se observó de nuevo que no existía ningún efecto adyuvante discernible que pudiera atribuirse al contenido en CpG de los diversos plásmidos adyuvantes. Aunque en general no se observó ningún efecto adyuvante estadísticamente relevante con los diversos vectores adyuvantes de las subunidades de las toxinas, los vectores con las subunidades LT (Formulaciones n.<sup>o</sup> 10-13) sí mostraron efecto adyuvante en la respuesta de IFN- $\gamma$  e IL-4 al antígeno superficial (sAg) que se vio influenciada por la presencia/ausencia 25 de la secuencia de señalización de la secreción.

#### Ejemplo 9

30 *Vectores plasmídicos adyuvantes que codifican los péptidos de las subunidades CTA/CTB o LTA/LT en un estudio de exposición vírica*

40 Para evaluar la capacidad de los vectores plasmídicos adyuvantes de la presente invención de proporcionar un efecto protector en un modelo de exposición a virus Herpes Simplex de tipo 2 (HSV-2), se realizó el siguiente estudio. Se construyó una vacuna de ADN que codificaba un antígeno de HSV-2 y después se combinó con diversas combinaciones de los presentes vectores plasmídicos adyuvantes para proporcionar composiciones de vacuna. Después de la inmunización, los animales inmunizados fueron expuestos al virus HSV-2, y se determinó el efecto protector de las diversas composiciones de vacuna.

45 Con respecto a la construcción del plásmido antigenético de ADN, se usaron técnicas estándar de PCR para la construcción del plásmido. Las condiciones estándar de PCR que se usaron para la construcción del vector fueron las siguientes: 1x tampón nuclear de PCR con MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM (Promega Corp., Madison, WI); 0,400  $\mu$ M de cada cebador; 200  $\mu$ M de cada dNTP (USB Inc., Cleveland, OH); 2,5  $\mu$ g de polimerasa Taq (Promega Corp., Madison, WI); 1,0 ng de ADN plantilla; agua hasta 100  $\mu$ l; y una capa de recubrimiento de aceite mineral (Aldrich Chemical Inc., Milwaukee WI). Un termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., Waltham, MA) se programó para funcionar con la siguiente rutina: 4 minutos a 95°C; 30 ciclos de (1 minuto a 95°C/1 minuto 15 segundos a 55°C/1 minuto a 72°C); 10 minutos a 72°C; mantener a 4°C. Los productos de la amplificación se eliminaron de la reacción PCR usando el kit de purificación de PCR QIAquick® (Qiagen Inc., Valencia CA) antes de escindir con las enzimas de restricción (New England Biolabs, Beverly, MA). Todos los productos de la PCR se secuenciaron después de clonar para asegurar la fidelidad de la amplificación.

55 Más específicamente, se construyó un vector plasmídico de vacunación con ADN que codificaba el antígeno ICP27 temprano de HSV-2 de la manera siguiente. HSV es un virus de ADN bicatenario que tiene un genoma de aproximadamente 150-160 kpb. El genoma vírico está empaquetado en una nucleocápside icosaédrica que está envuelto en una membrana. La membrana (o cubierta) incluye al menos 10 glucoproteínas codificadas por el virus, de las cuales las más abundantes son gB, gC, gD, y gE. El genoma vírico también codifica más de otras 70 proteínas, que incluyen un grupo de aproximadamente cinco antígenos de ICP. Estas proteínas tempranas se sintetizan temprano en el ciclo de replicación vírica, al contrario que las glucoproteínas de la cubierta que sólo se producen de forma tardía en el ciclo vital del virus. Para una revisión de la estructura y organización moleculares de HSV, véase, por ejemplo, Roizman y Sears (1996) "Herpes simplex virus and their replication" en Rieds Virology, 3<sup>a</sup> ed., Fields *et al.* editores, Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia, PA. El antígeno ICP27 de HSV-2 puede obtenerse fácilmente a partir del genoma de HSV-2, por ejemplo la región genómica que cubre desde aproximadamente el nucleótido 114589 al 134980 de del

## ES 2 332 261 T3

genoma de HSV-2, o un fragmento EcoRI que cubre los nucleótidos 110931 a 139697 del genoma de HSV-2. La secuencia del genoma de HSV-2 está disponible en fuentes publicadas, por ejemplo la secuencia depositada en GenBank con el número de acceso NC\_001798.

5 Para construir el vector de ICP27 que se usó en el presente estudio, la región codificante de ICP27 se sometió a PCR a partir del genoma de HSV-2 usando los siguientes cebadores: 5'-GCC ACT CTC TTC CGA CAC-3' (SEC. ID. N.º: 25) y 5'-CAA GAA CAT CAC ACG GAA C-3' (SEC. ID. N.º: 26) para obtener un fragmento de nucleótidos que contenía las secuencias de nucleótidos 114523-116179 (GenBank) de HSV-2 que corresponden a la región codificante de ICP27. El fragmento ICP27 después se clonó en la región de clonación múltiple del vector pTarget (Promega Corp.,  
10 Madison, WI).

Se combinaron las construcciones de los vectores plasmídicos adyuvantes que contenían las subunidades de las toxinas CTA, CTB, LTA y LTB (pPJ2002, pPJ2003, pPJ2004, y pPJ2005, respectivamente) para proporcionar los adyuvantes CTA/CTB (pPJ2002 + pPJ2003) y LTA/LTB (pPJ2004 + pPJ2005). El plásmido con el antígeno ICP27 se combinó con los pares de construcciones de subunidades de las toxinas y se precipitó sobre partículas de oro de 2 micrómetros. Específicamente, el ADN plasmídico (vector plasmídico con el antígeno ICP27) más dos vectores adyuvantes (para proporcionar una combinación de CTA/CTB o LTA/LTB) se mezcló con partículas de oro de 2 micrómetros (Degussa) en un pequeño tubo de centrifugadora que contenía espermidina. La precipitación se realizó siguiendo las metodologías del Ejemplo 3, y las partículas de oro recubiertas se recubrieron después sobre la superficie interna de un tubo TEFZEL® como también se ha descrito en el Ejemplo 3. El tubo después se cortó en cartuchos de 1,25 cm (0,5 pulgadas) adecuados para cargar en el dispositivo de administración de partículas. Así, se generaron las siguientes formulaciones de ADN y oro para un ensayo de exposición a HSV-2:

25 Formulación n.º 1: (sin adyuvante) 2 µg vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27;

Formulación n.º 2: ("CT alto") 900 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 50 ng de pPJ2002 (CTA), 50 ng de pPJ2003 (CTB);

30 Formulación n.º 3: ("CT bajo") 500 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 250 ng de pPJ2002 (CTA), 250 ng de pPJ2003 (CTB);

Formulación n.º 4: ("LT alto") 900 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 50 ng de pPJ2004 (LT A), 50 ng de pPJ2005 (LTB); y

35 Formulación n.º 5: ("LT bajo") 500 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 250 ng de pPJ2004 (LTA), 250 ng de pPJ2005 (LTB).

40 En el estudio, se administraron las formulaciones de vacuna de ADN que se describen anteriormente a cinco grupos diferentes de ratones usando el dispositivo de administración de partículas PowderJect® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI). Cada grupo experimental contenía 5 animales y cada animal recibió dos inmunizaciones (disparo único aplicado en el abdomen) con la formulación respectiva con un periodo de descanso de cuatro semanas entre inmunizaciones. Un sexto grupo de ratones se estableció como control negativo (sin exposición), y no recibió ninguna vacunación. Se sacrificaron 4 ratones de cada grupo 2 semanas después de la segunda inmunización y se usaron para los ensayos ELISPOT de IFN-γ (no se muestran los datos).

45 Dos semanas después de la segunda inmunización, todos los ratones que quedaban (grupo B1) se expusieron a 1 x10<sup>6</sup> UFP del virus HSV2, cepa MS, mediante instalación intranasal. La gráfica de supervivencia que representa los resultados del estudio de exposición se representa en la figura 14. Como puede observarse, 100% de los animales no expuestos sucumbió en los 4 días posteriores a la exposición. Los animales no expuestos se representan en la gráfica mediante la curva (●). Además, 100% de los animales que recibieron el vector plasmídico con el antígeno ICP27 solo (Formulación n.º 1) murieron en los 7 posteriores a la exposición. Los animales que recibieron la Formulación n.º 1 se representan en la gráfica mediante la curva (▼). Por el contrario, el 25% (2/8) de los animales que recibieron el plásmido con ICP27 con el adyuvante de CT a dosis baja (Formulación n.º 3) fueron protegidos contra la exposición vírica, y 38% (3/8) de los animales que recibieron el ICP27 con el adyuvante de CT a dosis elevada (Formulación n.º 2) fueron protegidos contra la exposición vírica. Los animales que recibieron la Formulación n.º 3 se representan en la gráfica mediante la curva (■). Los animales que recibieron la Formulación n.º 2 se representan en la gráfica mediante la curva (◆). Finalmente, tanto la vacuna de ICP27 con adyuvante de LT a dosis baja (Formulación n.º 5) como la vacuna de ICP27 con adyuvante de LT a dosis altas (Formulación n.º 4) proporcionaron una protección completa (100%) a los animales inmunizados. Los animales que recibieron la Formulación n.º 5 se representan en la gráfica mediante la curva (▲). Los animales que recibieron la Formulación n.º 4 se representan en la gráfica mediante la curva (○).

Por consiguiente, se han descrito las moléculas polinucleotídicas adyuvantes novedosas, las composiciones que comprenden esas moléculas adyuvantes, y técnicas de inmunización convencionales y con ácidos nucleicos.

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Una composición adyuvante que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico; (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico; y (iii) vehículos nucleares, en la que: (a) dicha primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad A truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana; (b) dicha segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad B truncada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana; (c) dichas secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda recubren los vehículos nucleares y están ligadas operablemente, o cada una está ligada operablemente a un promotor activo en una célula de mamífero; y (d) cada una de dichas regiones codificantes de las subunidades truncadas tiene una delección en 5', codifica un péptido de una subunidad que no tiene un péptido de señalización bacteriana en el extremo amino y está ligada operablemente a una secuencia directora para su secreción desde una célula de mamífero.
- 10      2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la región codificante de la subunidad A truncada ha sido modificada genéticamente además para eliminar un motivo KDEL o RDEL del extremo C del péptido de la subunidad codificado por ella.
- 15      3. Una composición adyuvante que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico; (ii) una segunda secuencia de ácido nucleico; y (iii) vehículos nucleares, en la que: (a) dicha primera secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad A modificada obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana; (b) dicha segunda secuencia de ácido nucleico es una región codificante de la subunidad B obtenida o derivada de una exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana; (c) dichas secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda recubren los vehículos nucleares y están ligadas operablemente, o cada una está ligada operablemente a un promotor activo en una célula de mamífero; y (d) cada una de dicha región codificante de la subunidad A modificada modificada y dicha región codificante de la subunidad B codifican cada una un péptido de la subunidad maduro, y con la condición adicional de que la región codificante de la subunidad A modificada ha sido modificada genéticamente de forma que se elimine un motivo KDEL o RDEL del extremo C en el péptido de la subunidad codificado por ella y está ligada operablemente a una secuencia directora para la secreción desde una célula de mamífero.
- 20      4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la región codificante de la subunidad A modificada y la región codificante de la subunidad B han sido truncadas cada una mediante una delección en 5' por la cual cada una de dichas regiones codificantes de las subunidades truncadas codifica un péptido de una subunidad que no tiene un péptido de señalización bacteriana en el extremo amino.
- 25      5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la exotoxina de ribosilación de ADP bacteriana es una enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*.
- 30      6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende un antígeno de interés.
- 35      7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de interés.
- 40      8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en la que el antígeno es de un patógeno bacteriano, un patógeno vírico, un patógeno parasitario, un alérgeno o un antígeno específico de tumor.
- 45      9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el antígeno es de un influenza virus, un virus Herpes simplex (HSV), virus de la hepatitis, o papillomavirus.
- 50      10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55      11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición con partículas es adecuada para la administración transdérmica mediante un dispositivo de administración de partículas.
- 60      12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la partícula transportadora nuclear tiene un diámetro medio de 0,1 a 10 µm.
- 65      13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la partícula transportadora nuclear comprende un metal.
- 70      14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el metal es oro.
- 75      15. Una composición adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para usar para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado contra un antígeno de interés mediante la administración del antígeno de interés y la composición al sujeto.

## ES 2 332 261 T3

16. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 15, en la que el antígeno de interés y la composición se administran en el mismo sitio del sujeto.
17. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 15 ó 16, en la que el antígeno de interés y la composición se administran al mismo tiempo.
18. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la composición además comprende el antígeno de interés.
19. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la composición comprende una tercera secuencia de ácido nucleico que codifica el antígeno de interés.
20. Una composición adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en la que el antígeno de interés es de un patógeno bacteriano, un patógeno vírico, un patógeno parasitario, un alérgeno o un antígeno específico de tumor.
21. Una composición adyuvante de acuerdo con la reivindicación 20, en la que el antígeno es un influenza virus, un virus Herpes simplex (HSV), virus de la hepatitis, o papillomavirus.
22. Una composición adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, en la que las partículas transportadoras nucleares se administran al sujeto usando una técnica de administración mediada por partículas.
23. Una composición adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en la que el sujeto es un ser humano.
24. Productos que contienen una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un antígeno de interés en forma de una preparación combinada para el uso simultáneo, por separado o secuencial para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado contra dicho antígeno.
25. Un dispositivo de administración de partículas para la administración transdérmica que se carga con una composición con partículas como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
26. Un dispositivo de acuerdo con la reivindicación 25 que es una jeringuilla sin agujas.
27. Un envase monodosis o multidosis herméticamente sellado adaptado para usar en un dispositivo de administración de partículas, comprendiendo dicho envase una composición adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
28. Uso de unas secuencias de ácidos nucleicos primera y segunda como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para la fabricación de un medicamento para potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto vertebrado contra un antígeno de interés mediante la administración del antígeno de interés y el medicamento al sujeto.

45

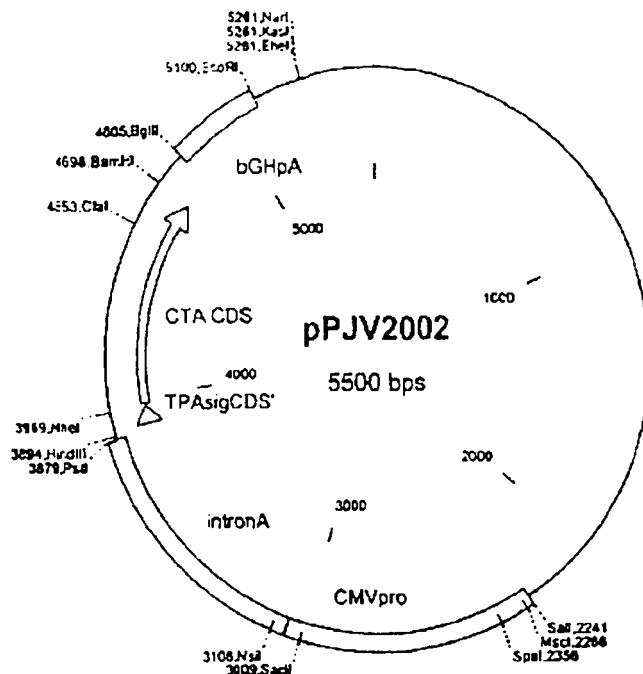
50

55

60

65

# ES 2 332 261 T3



Molécula: pPJV2002, 5500 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJV2002.cm5,

Descripción: Ligado del frag de CTA cortado en Nhe Bam en el vector 7054 en Nhe Bam

Notas

Características de la molécula.

| Tipo   | Inicio | Fin  | Nombre     | Descripción |
|--------|--------|------|------------|-------------|
| REGIÓN | 2242   | 3060 | CMVpro     |             |
| REGIÓN | 3061   | 3884 | Intrón A   |             |
| GEN    | 3906   | 3696 | TPAsigCDS' |             |
| GEN    | 3975   | 4697 | CDS CTA    |             |
| REGION | 4805   | 5101 | bGHPA      |             |

Enzimas (15 sitios)

|      |       |       |       |         |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| SalI | 2241, | MscI  | 2266, | Spel    | 2356, | SacI  | 3009, |
| NsiI | 3105, | PstI  | 3879, | HindIII | 3894, | NheI  | 3969, |
| Clal | 4553, | BamHI | 4698, | BglII   | 4805, | EcoRI | 5100. |

Figura 1-1

# ES 2 332 261 T3

|      |             |             |            |             |             |             |
|------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| 1    | GACGAAAGGG  | CCTCGTATA   | CGCCTATTIT | TATAGTTAA   | TGTATGATA   | ATAATGGTT   |
| 61   | CTTACACGTC  | AGGTGGACT   | TTTCGGGAA  | ATGTGCGCG   | AACCCATT    | TGTTTATTIT  |
| 121  | TCTAAATACA  | TICAAATATG  | TATCCGCTA  | TGAGACAATA  | ACCCGTATA   | ATGCTCAAT   |
| 181  | AATATTGAAA  | AAGGAAGAGT  | ATGAGTATIC | AACATTCCG   | TGTGCCCTI   | ATTCCCTTT   |
| 241  | TTGCGGCATT  | TTGCCTTCCT  | TTTTTGCTC  | ACCCAGAAC   | GCTGGTAAA   | GTAAAAGATG  |
| 301  | CTGAAGATCA  | GTGGGIGCA   | CGAGTGGGTT | ACATCGAAT   | GGATCTAAC   | AGCGTAAGA   |
| 361  | TCTTGAGAG   | TTTTCGCCCC  | GAAGAACGTT | TTCCAATGAT  | GAGCACTTT   | AAAGTTCTGC  |
| 421  | TAATGCGC    | GGTATTATCC  | CGTATGAC   | CCGGCGAAGA  | GCAACTCGGT  | CGCCGCATAC  |
| 481  | ACTATTCTCA  | GAATGACTTG  | GTGAGTACT  | CACCACTCAC  | AGAAAAGCAT  | CTTACGGATG  |
| 541  | GCATGACAGT  | AAGAGAATTA  | TGCAGTGCTG | CCATAACCAC  | GAGTGATAAC  | ACTGCGGCCA  |
| 601  | ACTTACTTCT  | GACAACGATC  | GGAGGACCGA | AGGAGCTAAC  | CGCTTTTG    | CACAAATATGG |
| 661  | GGGATCATGT  | AACTCGCTT   | GATCGTTGGG | AACCGGAGCT  | GAATGAAGCC  | ATACCAAACG  |
| 721  | ACGAGCGTGA  | CACCAACGATG | CCTGTAGCAA | TGGCAACAAAC | GTTCGCAAA   | CTATTAACG   |
| 781  | GCGAACTACT  | TACTCTAGCT  | TCCCGCAAC  | AATTAATAGA  | CTGGATGGAG  | GCGGATAAAG  |
| 841  | TTGCGGGACC  | ACTTCTGCGC  | TCGGGCTTC  | CGGCTGGCTG  | TTTATTGCT   | GATAAACTG   |
| 901  | GAGCCGCTGA  | GGGTGGGCT   | CGCGGTATCA | TTGCGACACT  | GGGGCCAGAT  | GGTAAGCCCT  |
| 961  | CCCGTATCGT  | AGTTATCTCA  | ACGACGGGGA | CTCAGGCAAC  | TATGATGAA   | CGAAATAGAC  |
| 1021 | AGATCGTGA   | GATAGGTGTC  | TCAGTATTAA | AGCATGGTA   | ACTGTCAGAC  | CAAGTTTACT  |
| 1081 | CATAATATCT  | TTAGATTGAT  | TTAAAACCTC | ATTTTTAATT  | TAAAAGGATC  | TAGGTGAAGA  |
| 1141 | TCCTTTTGT   | TAATCTCATG  | ACCAAAATCC | CTTAACGTTA  | GTTTTCGTC   | CACTGAGCGT  |
| 1201 | CAGACCCCCG  | AGAAAAGATC  | AAAGGATCTT | TTGAGATCC   | TTTTTTCTG   | CGCGTAATCT  |
| 1261 | GCTGCTTGCA  | AAACAAAAAA  | CCACCGCTAC | CAGCGGTGGT  | TIGTTGCCG   | GATCAAGAGC  |
| 1321 | TACCAACTCT  | TTTCCGAAAG  | GTAACTGGCT | TCAGCAGAGC  | GCAAGATACCA | AATACTGTC   |
| 1381 | TTCTAGTGT   | GGCGTAGTTA  | GGCCACACT  | TCAAGAACTC  | TGAGCACCCG  | CCTACATACC  |
| 1441 | TCGCTCTGCT  | AAATCTGTTA  | CCAGTGTGTC | CTGCCAGTGG  | CGATAAGTCG  | TGTCTTACCG  |
| 1501 | GGTGGACTC   | AAGACGATAG  | TTACCGGATA | AGGCGCAGCG  | GTCGGGCTGA  | ACGGGGGTT   |
| 1561 | CGTGCACACA  | GCCCAGCTG   | GAGCGAACGA | CTACACCGA   | ACTGAGATAC  | CTACAGCGTG  |
| 1621 | AGCATTGAGA  | AAAGGCCACG  | CTTCCCGAAG | GGAGAAAGGC  | GGACAGGTAT  | CGGGTAAGCG  |
| 1681 | GCAGGGCTCG  | AAACACGGAGG | CGCACCGAGG | AGCTTCCAGG  | GGGAAACGCC  | TGGTATCTT   |
| 1741 | ATAGTCTGTC  | CGGGTTTCG   | CACCTCTGAC | TTGAGCGTCG  | TTTTTGTTGA  | TGCTCGTCAG  |
| 1801 | GGGGCCCCGAG | CTTATGGAA   | AAACCCAGCA | ACCGGGCTT   | TTTACGGTTC  | CTGGCCCTTT  |
| 1861 | GCTGGCTT    | TGCTCAGATG  | TTCTTCTG   | CGTATCCCC   | TGATTCTGTG  | GATAACCGTA  |
| 1921 | TTACCGCTT   | TGAGTGAGCT  | GATACCGCTC | GCCGCAGCCG  | AAACGACCGAG | CGCAGCGAGT  |
| 1981 | CAGTGAGCGA  | GGAAGCGGAA  | GAGCCCCAA  | TACGCAAACC  | GCCTCTCCCC  | GGGGCTTGGC  |
| 2041 | CGATTCAATT  | ATGCAGCTGG  | CACGACAGGT | TTCCGACTG   | GAAGCGGGC   | AGTGAGCGCA  |
| 2101 | ACGAATTAA   | TGTGAGTTAG  | CTCACTATT  | AGGCACCCCA  | GGCTTACAC   | TTTATGCTTC  |
| 2161 | CGGCTCGTAT  | GTGTTGTGGA  | ATTTGAGCG  | GATAACATT   | TCACACAGGA  | AAACGCTATG  |
| 2221 | ACCATGATTA  | CGCCAAAGCTA | GTCGACATTA | ATCAATATTG  | GCTATTGGCC  | ATTGCAATACG |
| 2281 | TTGTATCTAT  | ATCATATAAT  | GTACATTAT  | ATTTGCTCAT  | GTCCAATATG  | ACCGCCATGT  |
| 2341 | TGACATTGAT  | TATTGACTAG  | TTATTAAATG | TAATCAATT   | CGGGGTCTATT | AGTTCATAGC  |
| 2401 | CCATATATGG  | AGTTCCGCGT  | TACATAACTT | ACCGTAAATG  | GCCCCCTCG   | TGACCCCCCA  |
| 2461 | ACGACCCCCG  | CCCATTGACG  | TCAATAATGA | CGTATGTTCC  | CATACTAACG  | CCAATAGGGA  |
| 2521 | CTTTCATG    | ACGTCAATGG  | GTGGAGTATT | TACGGTAAAC  | TGCCCACCTG  | GCAGTACATC  |
| 2581 | AAGTGTATCA  | TATGCCAATG  | CCGGCCCCCT | ATFIGACGTCA | ATGACGGTAA  | ATGGCCCCGC  |
| 2641 | TGGCATTATG  | CCCAGTACAT  | GACCTTACGG | GACTTTCCTA  | CTTGGCAGTA  | CATCTACGTA  |
| 2701 | TTAGTCATCG  | CTATTACCAT  | GGTGATGCGG | TTTGGCAGT   | ACACCAATGG  | GGCTGGATAG  |
| 2761 | CCGGTTGACT  | CACGGGGATT  | TCCAAGTCTC | CACCCCCATTG | ACGTCAATGG  | GAGTTTGT    |
| 2821 | TGGCACCAAA  | ATCAACGGGA  | CTTTCCAAA  | TGTCGTAATA  | ACCCCGCCCC  | GTTGACGCAA  |
| 2881 | ATGGCGGT    | GGCGTGTACG  | GTGGGAGGTC | TATATAAGCA  | GAGCTCGTTT  | AGTGAACCGT  |
| 2941 | CAGATCGCCT  | GGAGACCCCA  | TCCACGCTGT | TTGACCTCC   | ATAGAAGACA  | CCGGGACCGA  |
| 3001 | TCCAGCCTCC  | CGGGCCGGGA  | ACGGTGCATT | GGACCGCGGA  | TTCCCCGTGC  | CAAGAGTGC   |
| 3061 | GTAAGTACCG  | CCTATAGACT  | CTATAGGAC  | ACCCCTTTCG  | CTCTTATGCA  | TGCTATACG   |
| 3121 | TTTTGGCTT   | GGGGCCTATA  | CACCCCCCT  | CTTATGCTA   | TAGGTGATGG  | TATAGCTTAG  |
| 3181 | CCTATAGCTG  | TGGGTTATG   | ACCATTTATG | ACCACTCCCC  | TATGGTGAC   | GATACTTCC   |
| 3241 | ATTACTAATC  | CATAACATGG  | CTCTTGTGCA | CAACTATCTC  | TATGGCTAT   | ATGCCAATAC  |
| 3301 | TCTGCTCTTC  | AGAGACTGAC  | ACGGACTCTG | TATTTTACA   | GGATGGGGTC  | CCATTATTA   |
| 3361 | TTTACAAATT  | CACATATACA  | ACAACGCCGT | CCCCCTGCCC  | CCCACTTTT   | ATTAACACATA |
| 3421 | GGCTGGGATC  | TCCACGCCAA  | TCTCGGGTAC | GTGTTCCGG   | CATCGCTCT   | TCTCCGGTAG  |
| 3481 | CGGCGGAGCT  | TCCACATCCG  | AGCCCTGGTC | CCATGCCTCC  | AGCGGCTCAT  | GGTCGCTCGG  |
| 3541 | CAGCTCTT    | CTCTAACAG   | TGGAGGCCAG | ACTTAGGCAC  | AGCACAATGC  | CCACCAACAC  |
| 3601 | CACTGTGCCG  | CACAAGGGCG  | TGGGGTAGG  | GTATGTGCT   | GAATAATGAGC | TCGGAGATTG  |

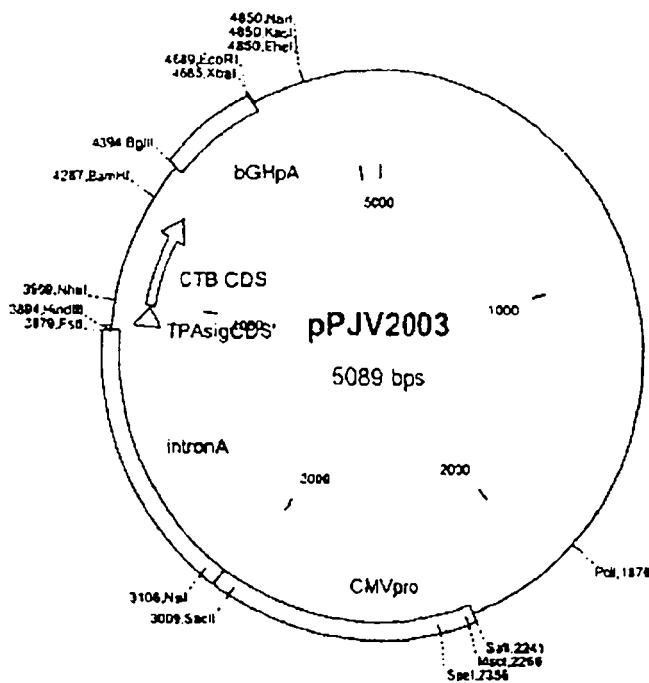
FIGURA 1-2

# ES 2 332 261 T3

1661 GGCTCGCACC GTCA~~G~~CACA TGGAAAGACTT AAGGCACCGG CAGAAGAAGA TCCAGGCAGC  
 1721 TGAGTGTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAATCCTCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG  
 1781 GAGGGCAGTG TAGCTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAAG ACATAATAGC  
 1841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCACATG GGTCTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG  
 1901 CAATCATGGA TGCATGAAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT  
 1961 TCGTTCCGGC TAGAACATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA  
 2021 TAAAGCAGTC ACCTGGCTCTT ATGCCAAGAG GACAGACTGA GTACTTGTAC CGAGGTACTC  
 2081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGAACATCA GACGGGATTT GTTAGGCACG  
 2141 ATGATGGATA TGTTCCACC TCAATTAGTT TGAGAAAGTGC CCACCTTAGTG GGTCAAACTA  
 2201 TATTGCTCGG TCAATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA  
 2261 ACCTTAATGTA TGTTATTAGGG GCATACAGTC CTACATCCAGA TCAACAAGAA GTTTCTGCTT  
 2321 TAGGTGGGAT TCCATACCTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCAATTG GGGGTGCTTG  
 2381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG  
 2441 CTCCACCGAGC AGATGGTTAT GGATIGGCAG GTTTCCTCC GGAGCATAGA GCTTGGAGGG  
 2501 AAGAGCCGTG GATTCAATCAT GCACCGCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA  
 2561 GTAATACTTG CGATGAAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGAAA ATTCCCTGAC GAATACCAAT  
 2621 CTAAGTTAA AAGACAAAATA TTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA  
 2681 TTAAGGATGTA ATTATGAGGA TCCCTCGCAAT CCCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGGAGCT  
 2741 CACGGCTCTTG TGAGGGACAG AAATACATC AGGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA  
 2801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCCTCTA GTTGCAGGCC ATCTGTTGTT  
 2861 TGCCCCCTCCC CCGTGCTTC CTTGACCCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCTAA  
 2921 TAAAATGAGG AAATTCGATC CCATTGCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG  
 2981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG  
 3041 CTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GGCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG  
 3101 AATTCACTGG CCGTCGTTT ACAACCTGCGT GACTGGAAA ACCCTGGGT TACCCAACTT  
 3161 AATTCGCTTG CAGCACATCC CCTTTCGCG AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCCCACC  
 3221 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT  
 3281 CTCCCTACGC ATCTGTGCGG TATTTCACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC  
 3341 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA  
 3401 CGGGCTTGTG TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC  
 3461 ATGTGTCAGA GTTTTCACC GTCATCACCG AAACGCGCGA

FIGURA 1-3

# ES 2 332 261 T3



Molécula: pPJ2003, 5089 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJ2003.cm5,

Descripción: Ligado del frag de CTB cortado en Nhe Bam en el vector 7054 en Nhe Bam

Notas:

Características de la molécula:

| Tipo   | Inicio | Fin  | Nombre     | Descripción |
|--------|--------|------|------------|-------------|
| REGION | 2242   | 3060 | CMVpro     |             |
| REGION | 3061   | 3884 | Intrón A   |             |
| GEN    | 3906   | 3696 | TPAsigCDS' |             |
| GEN    | 3975   | 4286 | CDS CTB    |             |
| REGION | 4394   | 4690 | bGHPA      |             |

Enzimas (16 sitios)

|       |       |       |       |       |       |         |      |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|------|
| PciI  | 1876, | SalI  | 2241, | MscI  | 2266, | SpeI    | 2356 |
| SacII | 3009, | NsiI  | 3106, | PstI  | 3879, | HindIII | 3894 |
| NheI  | 3969, | BamHI | 4287, | BglII | 4394, | XbaI    | 4685 |

Figura 2-1

# ES 2 332 261 T3

1 GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTIT TATAGGTAA TGTCAATGATA ATAATGGTTT  
 61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTGGGGAA ATGTGCCGG AACCCCTATT TGTGTTATTTT  
 121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGTCGA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAT  
 181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTCCG TGTGCCCTT ATTCCTTTT  
 241 TTGGGCATT TTGCTTCCT GTTTTTCCTC ACCCAGAAC GCTGGTAAA GTAAAAGATG  
 301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAAT GGATCTCAAC AGCGTAAGA  
 361 TCCCTGAGAC TTTTCCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC  
 421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CCTATTGACG CGGGGAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC  
 481 ACTATCTCA GAATGACTTG GTTGAATGACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG  
 541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGCCA  
 601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGTTTTTTC CACAACATGG  
 661 GGGATCATGT AACTCGCTT GATCGTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG  
 721 ACGAGCGTGA CACCAACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAAC GTTGCAGAAA CTATTAACG  
 781 GCGAAGTACT TACTCTACCT TCCCAGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAC GCGGATAAAC  
 841 TTGCAAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCCCTC CGGCTGGCTG GTTATTGCT GATAAATCTG  
 901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGGGTATCA TTGCAAGACT GGGGCCAGAT GTTAAGCCCT  
 961 CCCCTATCGT AGTTATCTAC ACCGACGGGA GTCAGGAAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC  
 1021 AGATCGTGA GATAAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTACT  
 1081 CATATATAC TTAGATTGAT TTTAAACTCT ATTTTTAAT TAAAGGATC TAGGTGAAGA  
 1141 TCCCTTTGTA TAATCTCATG ACCAAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT  
 1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGACATCC TTTTTTTCTG CGCGTAATCT  
 1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTGCGG GATCAAGAGC  
 1321 TACCAACTCT TTTTCCGAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATAACCA AATACTGTCC  
 1381 TTCTAGTGTG GCCGTAGTTA GGCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC  
 1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG  
 1501 GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT  
 1561 CGTGCACACA GCCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG  
 1621 AGCATTGAGA AAGCCCRCCG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACACGGTAT CGCGTAAGCG  
 1681 GCAGGGTCCGG AACACGGAGAG CGCACCGAGG AGCTTCCAGG GGAAACAGCC TGGTATCTT  
 1741 ATAGCTCTGT CGGGTTTCTGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG  
 1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACAGCGCCCT TTACGGTTT CTGGCTTTT  
 1861 GCTGGCCCTT TGCTCACATG TTCTTCCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA  
 1921 TTACCGCCTT TGACTGAGCT GATACCGCTC GCGCAGCCG AACGACCCGAG CGCAGCGAGT  
 1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCCTTGGC  
 2041 CGATTCACTA ATGCACTGG CACGACAGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAAGCGCA  
 2101 ACGCAATTAA TGTGAGITAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GCGCTTACAC TTTATGTTTC  
 2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG  
 2221 ACCATGATTA CGCCAAAGCTA GTGACATCAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCAATACG  
 2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTAT ATTGCTCAT GTCCAATATG ACCGGCATGT  
 2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATT CCGGGTCATT AGTTCATAGC  
 2401 CCATATATGG AGTCCCGCTG TACATAACTT ACGGTAATG GCCCCGCCTCG TGACCGCCCA  
 2461 ACGACCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA  
 2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAC TGCCCACITG GCAGTACATC  
 2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CGGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCGCC  
 2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTA TTGGCAGTA CATCTACGTA  
 2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG  
 2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAGTCCTC CACCCCATG ACGTCAATGG GAGTTTGT  
 2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTCGTAATA ACCCCCGCCCC GTTGACGCC  
 2881 ATGGGCGGTA GGCCTGTACG TGTGAGGCTG TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT  
 2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACCGCTG TTGACCTCC ATAGAAGACA CGGGGACCGA  
 3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCCGTGC CAAGAGTCAC  
 3061 GIAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCCTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG  
 3121 TTTTGGCTT GGGCCTATA ACCATTATTC ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTCC  
 3181 CCTATAGGTG TGGTTATTG CTCCTTGCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC  
 3241 ATTACTAATC CATAACATGG ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA  
 3301 TCTGTCCCTTC AGAGACTGAC TCTGTCCCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA  
 3361 TTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACACATA  
 3421 GCGTGGGATC TCCACCGCAGA TCTCGGGTAC GTGTCGGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG  
 3481 CGGCAGGAGCT TCCACATCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTCC AGCGGCTCAT GGTGGCTCGG  
 3541 CAGCTCCCTG CTCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCAC  
 3601 CAGTGTGCGG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

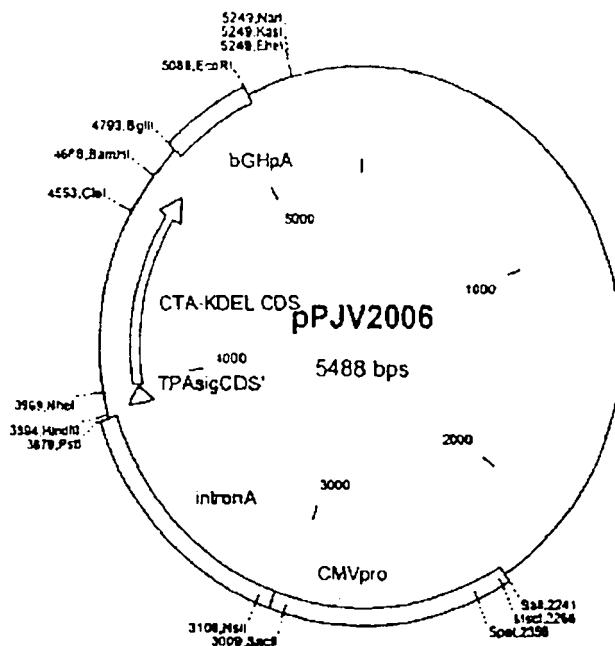
FIGURA 2-2

ES 2 332 261 T3

|      |             |             |             |             |             |             |            |
|------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 3661 | GGCTCGCACC  | GTC         | GCAGA       | TGGAAGACTT  | AAGGCAGGG   | CAGAAGAAGA  | TGCAGGCAGG |
| 3721 | TGAGTTGTTG  | TATTCTGATA  | AGAGTCAGAG  | GTAAC       | CCCG        | TTGCCGTGCT  | TTAACCGGTG |
| 3781 | GAGGGCAGTC  | TAGTCTGAGC  | AGTACTCGTT  | GCTGCCGCGC  | GCGCCACCAAG | ACATAATAGC  |            |
| 3841 | TGACAGACTA  | ACAGACTGTT  | CCTTTCCATG  | GGTCTTTCT   | GCAGTCACCG  | TCCAAGCTTG  |            |
| 3901 | CAATCATGGA  | TGCAATGAAG  | AGAGGGCTCT  | GCTGTGTGCT  | GCTGCTGTGT  | GGAGCAGTCT  |            |
| 3961 | TCGTTTCCGC  | TAGCACACCT  | CAAATATTA   | CTGATTTGTC  | TGCAAAATAC  | CACAAACACAC |            |
| 4021 | AAATATATAC  | GCTAAATGAT  | AAGATATTTT  | CGTATACAGA  | ATCTCTAGCT  | GGAAAAAAGAG |            |
| 4081 | AGATGGCTAT  | CATTACTTT   | AAGAATGGTG  | CAATTTTCA   | AGTAGAAGTA  | CCAGGTAGTC  |            |
| 4141 | AACATATAGA  | TTCACAAAAA  | AAAGCCATTG  | AAAGGATGAA  | GGATAACCTG  | AGGATTGCA   |            |
| 4201 | ATCTTACTGA  | AGCTAAAGTC  | GAAAAGTTAT  | GTGTATGGAA  | TAATAAAACG  | CCTCATGCCA  |            |
| 4261 | TTGCCGCAAT  | TAGTATGGCA  | AATTAAGGAT  | CCTCGCAATC  | CCTAGGAGGA  | TTAGGCAAGG  |            |
| 4321 | GCTTGAGCTC  | ACGCTCTTGT  | GAGGGACAGA  | AATACAATCA  | GGGGCAGTAT  | ATGAATACTC  |            |
| 4381 | CATGGAGAAA  | CCCAGATCTA  | CGTATGATCA  | CCCTCGACTG  | TGCCTCTAG   | TTGCCAGCCA  |            |
| 4441 | TCTGTTGTTT  | GCCCCCTCCCC | CGTGCCTTCC  | TTGACCCCTGG | AAGGTGCCAC  | TCCCACGTGTC |            |
| 4501 | CTTTCCTAAT  | AAAATGAGGA  | AATTGATCG   | CATTGTCTGA  | CTAGGTGTCA  | TTCTTATTCTG |            |
| 4561 | GGGGGTGGGG  | TGGGGCAGGA  | CAGCAAGGGG  | GAGGATTGGG  | AAGACAATAG  | CAGGCATGCT  |            |
| 4621 | GGGGATGCGG  | TGGGCTCTAT  | GGCTTCTGAG  | GGGGAAAGAA  | CCAGCTGGGG  | CTCCGACAGCT |            |
| 4681 | CGACTCTAGA  | ATTCACTGGC  | CGTGTGTTTA  | CAACGTGTTG  | ACTGGGAAAAA | CCCTGGGCGTT |            |
| 4741 | ACCCAACCTA  | ATCGCCTTGC  | AGCACATCCC  | CCTTTOGCCA  | GCTCGCGTAA  | TAGCGAAGAG  |            |
| 4801 | GCCCCGCACCG | ATCGCCCTTC  | CCAAACAGTTG | CGCAGCCTGA  | ATGGCGAATG  | GCGCCTGATG  |            |
| 4861 | CGGTATTTC   | TCCCTTACGCA | TCTGTGCGGT  | ATTTACACC   | GCATATGGTG  | CACCTCTCACT |            |
| 4921 | ACAATCTGCT  | CTGATGCCGC  | ATAGTTAACG  | CAGCCCCGAC  | ACCCGCCAAC  | ACCCGCTGAC  |            |
| 4981 | GCGCCCTGAC  | GGGCTTGTCT  | GCTCCCGGCA  | TCCGCTTACA  | GACAAGCTGT  | GACCGTCTCC  |            |
| 5041 | GGGAGCTGCA  | TGTGTCAAGAG | GTTCACCGG   | TCATCACCGA  | AACGCGCGA   |             |            |

FIGURA 2-3

# ES 2 332 261 T3



Molécula: pPJ2006, 5488 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJ2006.cm5,

Descripción: Ligado del frag de PCR CTA-KDEL cortado con Nhe Bam en el vector 7054 en Nhe Bam

Notas:

Características de la molécula:

| Tipo   | Inicio | Fin  | Nombre       | Descripción |
|--------|--------|------|--------------|-------------|
| REGIÓN | 2242   | 3060 | CMVpro       |             |
| REGIÓN | 3061   | 3884 | Intrón A     |             |
| GEN    | 3906   | 3696 | TPAsigCDS'   |             |
| GEN    | 3975   | 4685 | CDS CTA-KDEL |             |
| REGION | 4793   | 5089 | bGHpA        |             |

Enzimas (15 sitios)

|      |       |       |       |         |       |       |       |
|------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|
| Sall | 2241. | MscI  | 2266. | Spel    | 2356, | SacII | 3009, |
| NsiI | 3105, | PstI  | 3879, | HindIII | 3894, | NheI  | 3969, |
| Clal | 4553, | BamHI | 4698, | BgIII   | 4796. | SalI  | 5088. |

Figura 3-1

# ES 2 332 261 T3

|      |   |                        |
|------|---|------------------------|
| 1    | GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGTTAA    | TGTCAATGATA ATAATGGTTT |
| 61   | CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGAA ATGTGCCGG     | AACCCCTATT TGTTTATTTT  |
| 121  | TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA   | ACCCGTATAA ATGCCTCAAT  |
| 181  | AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCGG   | TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT  |
| 241  | TTGCGGCATT TTGCGCTTCCT GTTTTGCTC ACCCACAAAC   | GCTGGTGAAA GTAAAAGATG  |
| 301  | CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT   | GGATCTCAAC AGCGGTAAAGA |
| 361  | TCCTTGAGAG TTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT    | GACCACTTT AAAGTTCTGC   |
| 421  | TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA   | GCAACTCGGT CGCCGCATAC  |
| 481  | ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAAGTCAC  | AGAAAAGCAT CTTACGGATG  |
| 541  | GCATGACAGT AAGAGAAITA TGCACTGCTG CCATAACCAT   | GAGTGATAAC ACTGCGGCCA  |
| 601  | ACTTACTCT GACAACGATC GGAGGACCGA ACCAGCTAAC    | CGCTTTTTTG CACAACATGG  |
| 661  | GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT   | GAATGAAGCC ATACCAAACG  |
| 721  | ACCGAGCTGA CACCCAGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAAC  | GTGGCAGAAA CTATTAACIG  |
| 781  | GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA   | CTGGATGAG GCGGATAAAG   |
| 841  | TTGCAGGACC ACTTCTGCCTC TCAGGCCCC TGCGCTGGCT   | GTTTATTGCT GATAAAATCTG |
| 901  | GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAAGCT    | GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT  |
| 961  | CCCCTATCGT AGTATATCTAC ACGACGGGA GTCAAGGCAAC  | TATGGATGAA CGAAATAGAC  |
| 1021 | AGATCGCTGA CATAAGTGCC TCACTGATTA ACCATTGGTA   | ACTGTCAAGAC CAAGTTTACT |
| 1081 | CATAATACT TTAGATTGAT TAAAAACTTC ATTTTTAATT    | IAAAAGGATC TAGGTGAAGA  |
| 1141 | TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGCTA    | GTTCCTCGTC CACTGAGCGT  |
| 1201 | CAGACCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC    | TTTTTTCTG CGCGTAATCT   |
| 1261 | GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCCCTAC CACCGGTGGT   | TTGTTTCCCG GATCAAGAGC  |
| 1321 | TACCAACTCT TTTCGGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC    | GCAGATACCA AATACTGTCC  |
| 1381 | TTCTAGTGTG GCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC    | TGTAGCACC CGCTACATACC  |
| 1441 | TCGCTCTGCT AATCTCTTAA CCAGTGGCTG CTGCGCTGG    | CGATAAGTCG TGTCTTACCG  |
| 1501 | GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG   | GTGGGCTGA ACGGGGGGT    |
| 1561 | CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA   | ACTGAGATAC CTACAGCGTG  |
| 1621 | AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC   | GGACAGGTAT CCGGTAAGCG  |
| 1681 | GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACCGAGG AGCTTCCAGG   | GGGAAACGCC TGGTATCTT   |
| 1741 | ATAGTCTGTG CGGGTTTCG CACCTCTGAC TTGAGCGTCG    | TTTTTCTG TGCTCGTCAG    |
| 1801 | GGGGCCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACUGGGCTT    | TTTACGGTTC CTGGCCTTTT  |
| 1861 | GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTCTG CGTTATCCCC     | TGATTCTGTG GATAACCGTA  |
| 1921 | TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCG    | AACGACCGAG CGCAGCGAGT  |
| 1981 | CACTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC   | GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC  |
| 2041 | CGATTCTTA ATGCACTG CACGACAGGT TTCCGACTG       | AAAAGCGGGC AGTGAGCGCA  |
| 2101 | ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA   | GGCTTTACAC TTTATGCTTC  |
| 2161 | CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT   | TCACACAGGA AACAGCTATG  |
| 2221 | ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG   | GCTATTGGCC ATTGCATACG  |
| 2281 | TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTAT ATTGGCTCAT    | GTCCAATATG ACCGCCATGT  |
| 2341 | TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATT    | CGGGGTCTT AGTTCATAGC   |
| 2401 | CCATATATGG AGTTCGGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG   | CCCCGGCTCG TGACCCGCCA  |
| 2461 | ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC   | CATAGTAACG CCAATAGGGA  |
| 2521 | CTTTCCATTG ACGTCAATTGG GTGGAGTATT TACCGTAAAC  | TGCCCCACTTG GCAGTACATC |
| 2581 | AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA   | ATGACGGTAA ATGGCCCGCC  |
| 2641 | TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTA    | CTTGGCAGTA CATCTACGTA  |
| 2701 | TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTCGGAGT    | ACACCAATGG GCGTGGATAG  |
| 2761 | CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCCTC CACCCCATG   | ACGTCAATGG GAGTTTGT    |
| 2821 | TGGCACAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA     | ACCCCGCCCC GTTGACGCAA  |
| 2881 | ATGGCGGTA GGCCTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA    | GAGCTGTT AGTAACCGT     |
| 2941 | CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTGACCTCC    | ATAGAAGACA CGGGGACCGA  |
| 3001 | TCCAGCCTCC GCGGGGGGGG ACGGTGCAATT GGAACGCCGA  | TTCCCCGTGC CAAGAGTGC   |
| 3061 | GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCTTTGG    | CTCTTATGCA TGCTATACTG  |
| 3121 | TTTTTGGCTT GGGGCTATA CACCCCGCT CCTTATGCTA     | TAGGTGATGG TATACTT     |
| 3181 | CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC   | TATGGTGAC GATACTTCC    |
| 3241 | ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTGTCCA CAACTATCTC   | TATTGGCTAT ATGCCAATAC  |
| 3301 | TCTGTCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA     | GGATGGGTC CCATTITATTA  |
| 3361 | TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC   | CGCAGTTTT ATTAACATA    |
| 3421 | GCGTGGGATC TCCACCGCAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA   | CATGGGCTCT TCTCCGGTAG  |
| 3481 | CGGGGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTCC  | AGCGGCTCAT GGTCGCTCGG  |
| 3541 | CAGCTCCCTTG CTCCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC | AGCACAATGC CCACCACAC   |
| 3601 | CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGCT    | GAATATGAGC TCGGAGATTG  |

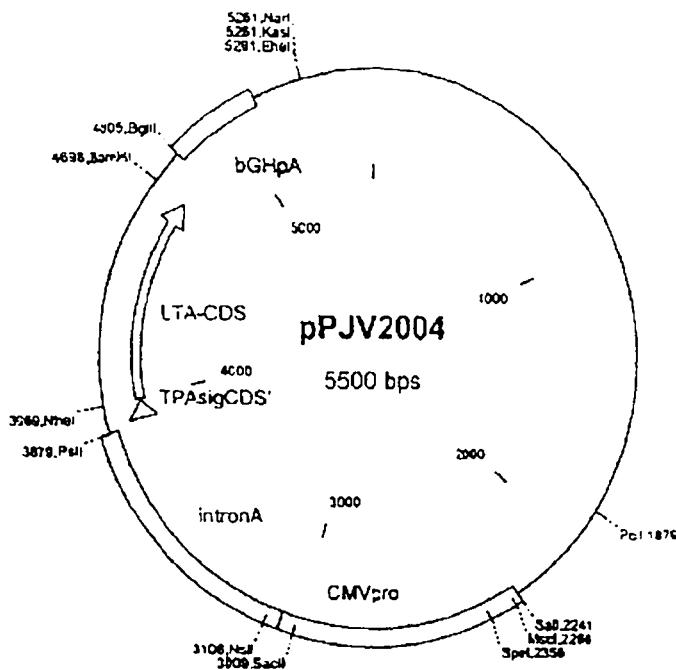
FIGURA 3-2

# ES 2 332 261 T3

3661 CGCTCGCACC GTG AGA TCGGAAGACTT AAGGCAGCCGGCAGAA \_\_\_G GCAAGGCAGC  
 3721 TGAGTTGTTG TAATTCGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCCG TTGCGGTGC CTTAACGGTG  
 3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC ACTACTCGTT GCTGCCCGC GCGCCACCG ACATAATACC  
 3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CTITTCATG GGTCTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG  
 3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGTGTGT GGAGCAGTCT  
 3961 TCGTTTCGGC TAGCATTGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA  
 4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC  
 4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACCTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG  
 4141 ATGATGGATA TGTITTCACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACTTAGTG GGTCAAACTA  
 4201 TATTTCTCG TCATCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA  
 4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATCACGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTCTGCTT  
 4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG  
 4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAOTAAC TTAGATATTG  
 4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GTTCCCTCC GGAGCATAGA CCTTGGAGGG  
 4501 AAGAGCCGTG GATTCACTCAT GCACCCGCCG GTTGTGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA  
 4561 GTAATACTTG CGATAAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAA ATTCCCTGAC GAATACCAAT  
 4621 CTAAAGTTAA AAGACAAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA  
 4681 TTTGAGGATC CTGCAATCC CTAGGGAGGAT TAGGCAGGG CTTGAGCTCA CGCTCTTGTG  
 4741 AGGGACAGAA ATACAATCAG GGGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAC CCAGATCTAC  
 4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGGTGTGTTG CCCCTCCCCC  
 4861 GTGCCCTCCT TGACCCCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCTAATA AAAIGAGGAA  
 4921 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC  
 4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGGGT GGGCTCTATG  
 5041 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGSC TGACAGCTC GACTCTAGAA TTCACTGGCC  
 5101 GTCGTTTTAC AACGTGCTGA CTGGGAAAAC CCTGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA  
 5161 GCACATCCCC CTITTCGCCAG CTGGCGTAAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCCCTTCC  
 5221 CAACAGTTGC GCAGGCTGAA TGGCGAATGG CGCTGTGTC GGTATTTCT CTTTACGCAT  
 5281 CTGTGCGGTA TTTCACACCG CATATGGTGC ACTCTCACTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA  
 5341 TAGTTAACCC AGCCCCGACCA CCCGCCAACCA CCCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG  
 5401 CTCCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCT GGTGTCAGAGG  
 5461 TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGA

FIGURA 3-3

# ES 2 332 261 T3



Molécula: pPJV2004, 5500 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJV2004.cm5,

Descripción: Ligado del inserto Nhe-Bam de LTA en el vector 7054 en Nhe Bam

Notas:

Características de la molécula:

| Tipo   | Inicio | Fin  | Nombre     | Descripción |
|--------|--------|------|------------|-------------|
| REGIÓN | 2242   | 3060 | CMVpro     |             |
| REGIÓN | 3061   | 3884 | Intrón A   |             |
| GEN    | 3906   | 3696 | TPAsigCDS' |             |
| GEN    | 3975   | 4697 | CDS LTA    |             |
| REGION | 4805   | 5101 | BGHpA      |             |

Enzimas (13 sitios)

|       |       |       |       |      |       |      |      |
|-------|-------|-------|-------|------|-------|------|------|
| Pcl   | 1876, | Sall  | 2241, | MscI | 2266, | Spel | 2356 |
| SacII | 3009, | Nsil  | 3106, | PstI | 3879, | NheI | 3969 |
| BamHI | 4698, | BglII | 4805, | Ehel | 5261, | KasI | 5261 |

Figura 4-1

# ES 2 332 261 T3

1 GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTAA TATAGGTAA TGTCAATGATA ATATGGTTT  
 61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGAA ATGTGCCGG AACCCCTATT TGTTTATTIT  
 121 TCTAAATACA TTCAATATG TATCCGCTA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTCAAT  
 181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTICCG TGTCGCCCT ATTCCCTTT  
 241 TTGCGGCATT TTGCGCTTCCT GTTTTGCTC ACCCGAAAAC GCTGGTGAA GTAAAAGATG  
 301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA  
 361 TCCTTGAGAG TTTCGGCCCC GAACAAACGTT TTCCAATGAT GAGCACITTT AAAGTTCTGC  
 421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC  
 481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCACTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG  
 541 GCATGACAGT AAGAGAATTAA TGCACTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAAC ACTGCGGCCA  
 601 ACTTACTCTC CACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTMTG CACAACATGG  
 661 GGGATCATGT AACTCGCCCT GATCGTTGGG AACCCGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG  
 721 ACGACCGTGA CACCCAGATG CCTGTAGCAA TGCGAACAAAC GTTGGCGAAA CTATTAACG  
 781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCAGGAAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG  
 841 TTGCAGGACC ACTTCCTGCG TCAGGGCTTC CGGCTGGCTG GTTATATGCT GATAAACTG  
 901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCACTGACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT  
 961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACAGACGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC  
 1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTACT  
 1081 CATATATACT TTAGATTGAT TAAAAACTTC ATTTTTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA  
 1141 TCCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT  
 1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT  
 1261 CCTGCTTGC AAAAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCG GATCAAGAGC  
 1321 TACCAACTCT TTTCGGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC  
 1381 TTCTAGTGTG GCGGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACC CGCTACATACC  
 1441 TCGCTCTGCT AATCTGTAA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTGC TGTCTTACCG  
 1501 GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGGCGAGCG CTCGGGCTGA ACGGGGGTT  
 1561 CGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCCAAACGA CCTACACCGA ACTGACATAC CTACACGGTG  
 1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCGGAAAG GGAGAAAAGGC GGACAGGGTAT CCGGTAGCG  
 1681 GCAGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTT  
 1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCTCG ATTTTTGTA TGCTCGTCAG  
 1801 GGGGGCGAG CCTATGGAA AAGCCAGCA ACAGCGGCTT TTACGGTTT CTCGGCTTTT  
 1861 GCTGGCCTT TGTCACATG TTCTTTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA  
 1921 TTACGGCCTT TGAGTGGACT GATACCGCTC GCCGCAAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT  
 1981 CAGTGAGCGA CGAAGCGGAA GAGCGCCAA TACGCAAACCC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC  
 2041 CGATTCAATTA ATGCACTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGCC AGTGAGCGCA  
 2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACACTT AGGCACCCCA GGCTTACAC TTTATGCTTC  
 2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACATT TCACACAGGA AACAGCTATG  
 2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATTA ATCAATATTG CTATGGGCC ATTGCATACG  
 2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTATT ATTGGCTCAT GTCACATATG ACCGCCATGT  
 2341 TGACATTGAT TATTGACTGT TTATTAATAG TAAATCAATIA CGGGGTCAATT AGTTCATAGC  
 2401 CCATATATGG AGTTCGGCT TACATAACTT ACGGTAAATG GCGCCGCTCG TGACCCCGCA  
 2461 ACGACCCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTC CATACTAACCG CCAATAGGG  
 2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACCTG GCAGTACATC  
 2581 AAGTUTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCGCC  
 2641 TGCCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTA CTTGGCACTA CATCTACGT  
 2701 TTAGTCATCG CTATTAACCAT GTGIGATGCGG TTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG  
 2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATG ACGTCAATGG GAGTTTGTIT  
 2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTCGCAATAA ACCCCGGCCCC GTTGACGCCA  
 2881 ATGGGCGGTG GGGCTGTACG CTGGGAGGTCTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT  
 2941 CAGATCGCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA  
 3001 TCCAGCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCTT GGAAACCGGA TTCCCGTGC CAAGAGTGC  
 3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCCTTGG CTCTTATGCA TGCTATACG  
 3121 TTTTIGCTT GGGCCCTATA CACCCCGCT CCTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG  
 3181 CCTATAGGTG TGGGTATIG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGCAC GATACTTTCC  
 3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTGTCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC  
 3301 TCTGTCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTTACA GGATGGGGTC CCATTATTAA  
 3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTT ATTAAACATA  
 3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG  
 3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG  
 3541 CAGCTCTTGTG CTCCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCAC  
 3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

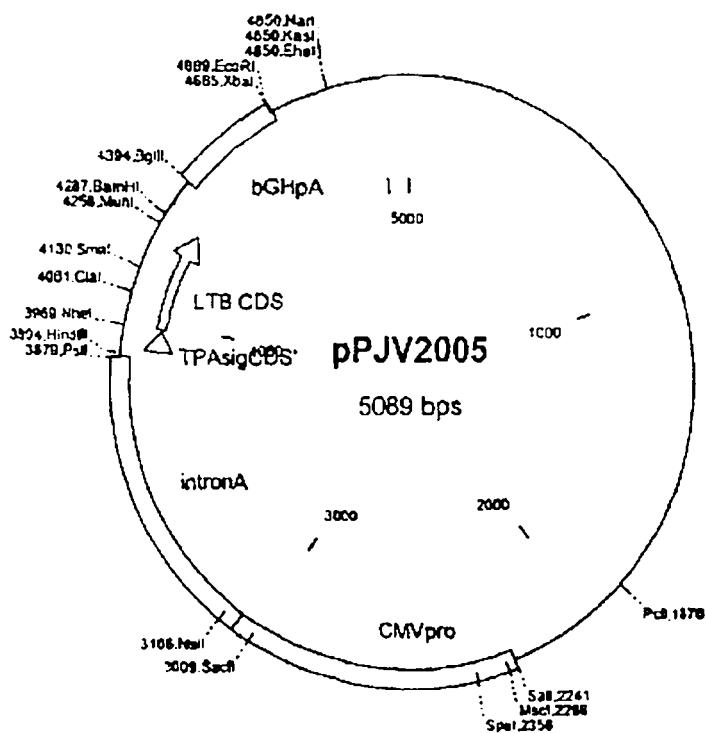
FIGURA 4-2

ES 2 332 261 T3

3661 GGCTCGUACC CTGATCCAGA TGGAAAGACTT AAGGCAGCGG CAGARGAAGA TCCACGCCAGC  
 3721 TGAGTTGTIG TATTCTGATA AGACTCAGAG GTAACTCCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG  
 3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT CCTTCCCAG GGTCTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG  
 3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTCCCAG GGTCTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG  
 3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT  
 3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGCC GACAATTAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA  
 4021 TAAAACGTT CGGGAGGTCTT ATGCCAGAG GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACTC  
 4081 AAAAGAATAT TAATCTTAT GATCACCGGA GAGGAACACA AACCGGCTTT GTCAGATATG  
 4141 ATGACGGATA TGTTCGCACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA  
 4201 TATIATCAGG ATATTCACACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGCACCA AATATGTTA  
 4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACAGGAG GTTCTGCGT  
 4321 TAGTGGAAAT ACCATAATTCT CAGATATATG GAIGGTATCG TGTAAATTCTT GGTGTGATTG  
 4381 ATGAAACGATT ACATCGTAAC AGGGAAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG  
 4441 CTCCGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTCCCACCC GGATCACCAA GCTTGGAGAG  
 4501 AAGAACCCCTG GATTCATCAT GCACCCACAAG GTTGTGGAAA TTCATCAAGA ACAATTACAG  
 4561 GTGATCTTG TAATCAGGG ACCCCAAATC TGAGCACAAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT  
 4621 CAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GTTGCACATA TATAACAGAA  
 4681 TTCCGGATGA ATTATGAGGA TCTTCGCAAT CCCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT  
 4741 CACCTCTTG TGAGGGACAG AAATACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA  
 4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCCTCTA GTGCCAGGC ATCTGTTGTT  
 4861 TGCCCTCTCC CGGTGCCTTC CTTGACCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTCTCTAA  
 4921 TAAAATGAGG AAATTGCAATC GCATTGCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG  
 4981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGAATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCC  
 5041 GTGGGCTCTA TGGCTCTGA GGCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG  
 5101 AATTCACTGG CCGTCGTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACTT  
 5161 AATCGCCCTTG CAGCACATCC CCCTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC  
 5221 GATCGCCCTT CCCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTCTT  
 5281 CTCCCTAOGC ATCTGTGGG TATTCACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC  
 5341 TCTCATGCGC CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCCTGA  
 5401 CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAAGCTG TGACCGTCTC CGGGACCTGC  
 5461 ATGTGTCAAG GGTTCACCC GTCATCACCG AACCGCCGGA

FIGURA 4-3

ES 2 332 261 T3



Molécula: pPJY2005, 5089 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJ2005 cm5,

Descripción. Ligado del frag Nhe Bam de LTB en el vector 7054 en Nhe Bam

## Notas

## Características de la molécula

| Descripción | Nombre   | Fin  | Inicio | Tipo   |
|-------------|----------|------|--------|--------|
| CMVpro      | INTRON A | 3060 | 2242   | REGIÓN |
| TPAsigCDS'  | CDS LTB  | 3696 | 3906   | GEN    |
| bGHPA       |          | 4690 | 4394   | REGION |
|             |          | 4286 | 3975   | GEN    |

## Enzimas (19 sitios)

|       |       |      |       |      |       |         |      |
|-------|-------|------|-------|------|-------|---------|------|
| PcII  | 1876, | Sall | 2241, | MscI | 2266, | Spel    | 2356 |
| SacII | 3009, | NsII | 3106, | PstI | 3879, | HindIII | 3894 |
| NheI  | 3969, | Clal | 4061, | Smal | 4130, | MunI    | 4258 |

Figura 5-1

# ES 2 332 261 T3

1 GACGAAAGGG CCTCGTGTATA CGCCTATTTC TATAGGTAA TGTCATGATA ATAAIGGTIT  
 61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGAA ATGTGGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTC  
 121 TCTAAATACA TICAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT  
 181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTG AACATTTCCG TGTGCCCTT ATTCCCTTT  
 241 TTGGCCATT TTGCTTCTC GTTTTGCTC ACCCAGAAC GCTGGTAAA GTAAAAGATG  
 301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGCTT ACATCGAAT GGATCTCAAC AGCGGTAAAGA  
 361 TCCTGAGAG TTTTGCCTC GAAGAACGTT TTCCAATCAT GAGCACTTT AAAGTTCTGC  
 421 TATGTCGGC GGTATTATCC CGTATTGACG CGGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC  
 481 ACTATTCTCA GAAAGACTTG GTTGAGTACT CCGAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG  
 541 GCATGACAGT AAGAGAATTG TGCACTGCTG CCATAACCAC GAGTGATAAC ACTGGGCCA  
 601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTIG CACAACATGG  
 661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG ACCCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG  
 721 ACGAGCCTGA CACCAAGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAA GTTGCGCAAAT CTTAAACTG  
 781 CCGAACTACT TACTCTAGT TCCCAGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG  
 841 TTGCAAGGACC ACTTCTGCAC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTATTGCT GATAAAATCTG  
 901 GACCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT  
 961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGA GTCAAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC  
 1021 AGATCGCTGA GATAGGTGTC TCACTGATA AGCATGGTA ACTGTCAAGAC CAAGTTACT  
 1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTTAAACTTC ATTTTAATT TAAAAGATC TAGGTGAAGA  
 1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAATCC CTTAACGTGA GTTTCGTTT CACTGAGCGT  
 1201 CAGACCCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT TTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT  
 1261 GCTGCTTGA AACAAAAAAA CCACCOCTAC CAGCGGTGGT TTGTTGCGG GATCAAGAGC  
 1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC  
 1381 TTCTAGTGTG GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC  
 1441 TCGCTCTGCT AATCTGTGTT CCAGTGGCTG CTGCGTAGGG CGATAAGTCG TGCTTACCG  
 1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCCAGCGG GTCGGGCTGA ACGGGGGGTT  
 1561 CGTCACACA GGGCACTTG GAGCGAACCA CCTAACCGA ACTGAGATAAC CTACAGCGTG  
 1621 AGCATGAGA AAGGCCAACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CGCGTAAGCG  
 1681 CGACCGTCGG AACAGGAGAG CGCACCGAGG AGCTTCCAGG GGGAAACCCC TGGTATCTT  
 1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTGC ATTTTTGTGA TGCTCGTCAG  
 1801 GGGGGGGAG CCTAAGGAAA AACGCCAGCA ACGCAGCTT TTTACGGTTC CTGGCTTTT  
 1861 GCTGGCTTT TGCTCACATG TTCTTCCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA  
 1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATAACGCTC GCGCGAGCGG AACGACCGAG CGCAGCGAGT  
 1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCCCAAAC TACGCAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC  
 2041 CGATTCTTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAACCGGG AGTGAGCGCA  
 2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACCTATT AGGCACCCCCA GGCTTACAC TTATGCTTC  
 2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACATTT TCACACAGGA AACAGCTATG  
 2221 ACCATGATTG CGCCAAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCAATAG  
 2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTIAI ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCATGT  
 2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTG CGGGCTATT AGTTCAATAGC  
 2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGCTAAATG GCCCCTCTG TGACCUCCCA  
 2461 ACGACCCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGG  
 2521 CTTCATG TACGCTAAATGG GTGGAGTATT TACCGTAAAC TGCCCACCTG GCAGTACATC  
 2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CGGGCCCCCT ATTGACGGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCC  
 2641 TGGCATTATG CCGCTACATG SACCTTACGG GACTTTCTA CTGGCGAGTA CATCTACGTA  
 2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGGG TTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG  
 2761 CGGTGGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATGG ACGTCAATGG GAGTTGGTT  
 2821 TGGCACAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAA TTGCGTAATA ACCCCGCC GGTGACGGCAA  
 2881 ATGGCGGTTA GGCGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTT AGTGAACCGT  
 2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACCGTGT TTGACCTCC ATAGAAGACA CGGGACCGA  
 3001 TCCAGCCTCC GCGGCGGGGA ACGGTGCATT GGAACGGGA TTCCCGTGC CAAGAGTGAC  
 3061 GTAAGTACCG CCTATAAGACT CTATAAGGCAC ACCCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG  
 3121 TTTTGGCTT GGGGCCATA CACCCCGCT CCTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG  
 3181 CCTATAGGTG TGGTTATG ACCATTATGG ACCACTCCCC TATTGGTAC GATACTTCC  
 3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTGGCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC  
 3301 TCTGTCCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTATTC  
 3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGGCGT CCCCCGTGCC CGAGTTTTT ATTAAACATA  
 3421 GCGTGGGATC TCCACGGCAA TCTGGGTAC GTGTICCGGA CATGGCTCT TCTCCGGTAG  
 3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTC AGGGCTCAT GGTCGCTCGG  
 3541 CAGCTCTTG CTCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTGGCAC AGCACAAATGC CCACCAAC  
 3601 CAGTGTGCCG CACAAGGGCG TGGCGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

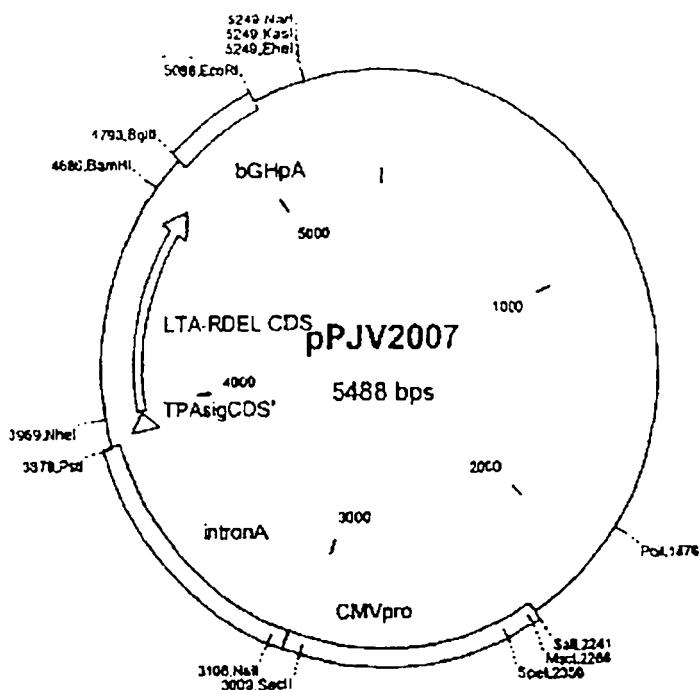
FIGURA 5-2

# ES 2 332 261 T3

3661 GGCTCGCACCC TGATTCAGA TGGAAAGACTT AAGGCAGC<sup>G</sup> CAGAAGAAGA<sup>A</sup> TGCAGGGCAGC  
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACTCCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG  
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GC3CCACCAAG ACATAATAGC  
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTCT GCACTCACCG TCCAAGCTTG  
3901 CAATCATGGA TGCATATGAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT  
3961 TCGTTTCGGC TAGGGCTCCC CAGTCTTATA CAGAACTATG TTGGAAATAT CGAACACAC  
4021 AAATATATAC GATAAAATGAC AAGATACTAT CATATACGGA ATCGATGGCA GGCAAAAGAG  
4081 AARTGGTTAT CATTACATTI AAGAGCGCGC CAACATTCA GGTGCAAGTC CCCGGCAGTC  
4141 AACATATAGA CTCCCCAAAAA AAAGCCATTG AAAGGATGAA GGACACATTA AGAACATCAC  
4201 ATCTGACCGA GACCAAAATT GATAAAATTAT GTGTATGGAA TAATAAAACC CCCAATTCAA  
4261 TTGCGGCAAT CAGTATGGAA AACTAGGGAT CCTCGCAATC CCTAGGAGGA TTAGGCAAGG  
4321 GCTTGAGCTC ACGGCTTGT GAGGGACAGA AATACAATCA GGGGCACTAT ATGAATACTC  
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA  
4441 TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC CGTGCCTTCC TTGACCCCTGG AAGGTGCCAC TCCCACCTGTC  
4501 CTTTCTTAAT AAAATGAGGA AATTGCACTG CATTGCTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG  
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT  
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTGACAGCT  
4681 CGACTCTAGA ATTCACTGGC CGTCGTTTA CAACTCGTG ACTGGGAAA CCCTGGCGTT  
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA CCTGGCGTAA TAGCGAACAG  
4801 GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG  
4861 CGGTATTTTC TCCCTTACGCA TCTGTGGGT ATTTACACCC GCATATGGTG CACTCTCAGT  
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAACG CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC  
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCCGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGCTTCC  
5041 GGGAGCTGCA TGTGTCAAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGA

FIGURA 5-3

# ES 2 332 261 T3



Molécula: pPJV2007, 5488 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJV2007.cm5.

Descripción: Ligado del frag de PCR Nhe Bam de LTA-KDEL en el vector 7054 en Nhe Bam

Notas:

Características de la molécula:

| Tipo   | Inicio | Fin  | Nombre       | Descripción |
|--------|--------|------|--------------|-------------|
| REGIÓN | 2242   | 3060 | CMVpro       |             |
| REGIÓN | 3061   | 3884 | Intrón A     |             |
| GEN    | 3906   | 3696 | TPAsigCDS'   |             |
| GEN    | 3975   | 4685 | CDS LTA-KDEL |             |
| REGION | 4793   | 5089 | bGHPA        |             |

Enzimas (14 sitios)

|       |       |       |       |       |       |      |      |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|
| PciI  | 1876, | Sall  | 2241, | MscI  | 2266, | SpeI | 2356 |
| SacII | 3009, | NsiI  | 3106, | PstI  | 3879, | NheI | 3969 |
| BamHI | 4686, | BglII | 4793, | EcoRI | 5008, | EheI | 5249 |

Figura 6-1

# ES 2 332 261 T3

1 GACGAAAGGG CCTCGTGTATA CGCCTATTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTT  
 61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGAA ATGTCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTT  
 121 TCTAAATACA TTCAAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAT  
 181 AATATTGAAR AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCGG TGTCGCCCTT ATTCCCTTT  
 241 TTGGCCAIT TTGCCCTTCCT GTTTTGCTC ACCCAGAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG  
 301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTCGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA  
 361 TCCITGAGAG TTTTCGCCCT GAAGAACGTT TICCAATGAT GAGCACTTT AAAGTTCTGC  
 421 TAATGTCGSC GGTATTATCC CGTATTGACG CGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC  
 481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTAAT CACCACTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG  
 541 GCATGACAGT AACAGRAATT TGCACTGCTG CCATAACCAT GAGTGTAAAC ACTGCGGCCA  
 601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTG CACAACATGG  
 661 GCGATCATGT AACTCGCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG  
 721 ACGAGCGTGA CACCAACGATG CCTGTAGCA TGCGAACACG TTGCGCAGAA CTATTAACG  
 781 CGGAACACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG CGGGATAAAG  
 841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG TTITATTGCT GATAAACTG  
 901 GASCCCCGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAACACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT  
 961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC  
 1021 AGATGCGTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTACT  
 1081 CATATATACT TTAGATTGAT TAAAAACTTC ATTITTAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA  
 1141 TCCTTTTGTG TAATCTCATG ACCAAAATCC CTEAACGTGA TTITTCGTT CACTGAGCGT  
 1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT TTGAGATCC TTITTTCTG CGCGTAAATCT  
 1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC  
 1321 TACCAACTCT TTTCGGAAAG GTAACTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC  
 1381 TTCTAGTGTG GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACCTC TGAGCACCG CCTACATACC  
 1441 TCGCTCTGCT AATCTGTGTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTGC TGTCTTACCG  
 1501 GGTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCCAGCG GTCGGGCTG ACGGGGGGTT  
 1561 CGTGCAACACA CCCCAGCTG GAGCGAACG CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACACCGTG  
 1621 ACCATTGAGA AAGGCCACG TTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CGGTPAACCG  
 1681 GCAGGGTCGG AACACGGAG CGCAGCAGGG AGCTTCCAGG GCGAAACGCC TGGTATCTTT  
 1741 ATAGTCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTCACCGTCA ATTITTTGTGA CGCTCTCG  
 1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCCCTT TTACCGGTC CTCGGCTTTT  
 1861 GCTGGCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGT GATAACCGTA  
 1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGAGGCCG AACGACCGAG CGCAGGGAGT  
 1981 CAGTGAAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACCGAACCC GCCTCTCCCC GCGCGTGGC  
 2041 CGATTCTTAA ATGCACTGG CACCGACAGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAACCGA  
 2101 ACCCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTPACAC TTATGCTTC  
 2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATACACATT TCACACAGGA AACACCTATG  
 2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTGACACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG  
 2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTAT ATTGGCTCAT CTCCAATATG ACCGCCATGT  
 2341 TGACATTGAT TATGACTAG TTATTATAG TAATCAATTAA CGGGGTCAATT AGTTCTATGC  
 2401 CCATAATCG AGTTCCCGT TACATAACTT ACGGTAATG GCGCCGCTCG TGACCGCCCA  
 2461 ACGACCCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATACTAACG CCAATAGGGA  
 2521 CTTCCATTG AGTCAATGG GTGCACTATT TACCGTAAC TGCCCACCTTG GCAGTACATC  
 2581 AAGTGTATCA TATGCAACT CGGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCGCC  
 2641 TGGCATTATG CCCACTACAT GACCTTACGG GACTTCTTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA  
 2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTCGGCACT ACACCAATCG GCGTGATAG  
 2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGCTC CACCCCATTC ACGTCATATG GAGTITGTTT  
 2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTCGTAATA ACCCGGCCCC GTTGAOGCAA  
 2881 ATGGCCGTA GCGCTGTACG GTGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTT AGTGAACCGT  
 2941 CAGATGCCCT GGAGACGCCA TCCACCGTGT TTTCACCTCC ATAGAAAGACA CGGGGACCGA  
 3001 TCCAGCCTCC CGGGCCCCGG ACGGTGCAATT GCAACCCCGA TTCCCCGTC CAAAGATGAC  
 3061 GTAAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCCTTGG CTCTTATGCA TGCTTAACTG  
 3121 TTTTGGCTT GGGGCTATAA CCCCCCGCT CCTTATGCTA TAGGTGATG TATACTTAG  
 3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATG ACCACTCCCC TATGGGTGAC QATACTTTCC  
 3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTGTGCA CAACTATCTC TATGGCTAT ATGCCAATAC  
 3301 TCTGTCTTC ACAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGAAGGGGTG CCATTATTA  
 3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGGCGT CCCCCGTGCC CGAGTTTTT ATTAACATA  
 3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTGGGTAC GTGGTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG  
 3481 CGGCGGAGCT TCCACATCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTAC AGCGGCTCAT GGTGGCTCGG  
 3541 CAGCTCTTG CTCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCAC  
 3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

FIGURA 6-2

# ES 2 332 261 T3

|      |              |             |             |             |                 |             |
|------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|-------------|
| 3661 | GGCTCGCACC   | GTG[A]GAGA  | TGGAAGACTT  | AAGGCAGCGG  | CAGA[A]G[A]G[A] | GCAGGCAGC   |
| 3721 | TGAGTTGTTG   | TATTCTGATA  | AGAGTCAGAG  | GTAAC[CCC]  | TTGCCGTGCT      | GTTAACGGTG  |
| 3781 | GAGGGCAGTC   | TAGTCTGACC  | AGTACTCGTT  | GCTGCCGCGC  | GCGCCACCAAG     | ACATAATAGC  |
| 3841 | TGACAGACTA   | ACAGACTGTT  | CCTTTCATG   | GGTCCTTTCT  | GCAGTCACCG      | TCCAAGCTTG  |
| 3901 | CAATCATGGA   | TGCAATGAAG  | AGAGGGCTCT  | GCTGTGTCGT  | GCTGCTGTGT      | GGAGCAGTCT  |
| 3961 | TCGTTTCGGC   | TAGCAATGGC  | GACAAATTAT  | ACCGTGCTGA  | CTCTAGACCC      | CCAGATGAAA  |
| 4021 | TAAAACGTTTC  | CGGAGGTCTT  | ATGCCAGAT   | GGCATAATGA  | GTACTTCGAT      | AGAGGAACTC  |
| 4081 | AAAAGAATAT   | TAATCTTAT   | GATCACGCGA  | GAGGAACACA  | AACCGGCTTT      | GTCAGATATG  |
| 4141 | ATGACGGATA   | TGTTTCCACT  | TCTCTTAGTT  | TGAGAAGTGC  | TCACTTAGCA      | GGACAGTCTA  |
| 4201 | TATTATCAGG   | ATATTCAC    | IACATATAT   | ATGTTATAGC  | GACAGCACCA      | AATAIGTTTA  |
| 4261 | ATGTTAATGA   | TGTATTAGCC  | GTATACAGCC  | CTCACCCATA  | TGAACACCGAG     | TTTTCTGCGT  |
| 4321 | • TAGGTGGAAT | ACCATATTCT  | CAGATATATG  | GATGGTATCG  | TGTTAAATTTT     | GGTGTGATTG  |
| 4381 | ATGAACGATT   | ACATCGTAAC  | AGGGAATATA  | GAGACCGGT   | TTACAGAAAT      | CTGAATATAG  |
| 4441 | CTCCGGCAGA   | GGATGGTTAC  | AGATTAGCAG  | TTTCCCCACC  | GGATCACCAA      | GCTTGGAGAG  |
| 4501 | AAGAACCCCTG  | GATTCAATCAT | GCACCCACAAG | TTTGTGGAAA  | TTCATCAAGA      | ACAATTACAG  |
| 4561 | GTGATACCTG   | TAATGAGGAG  | ACCCAGAAATC | TGAGCACAAAT | ATATCTCAGG      | AAATATCAAT  |
| 4621 | CAAAGTTEAA   | GAGGCAGATA  | TTTICAGACT  | ATCAGTCAGA  | GGTTGACATA      | TATAACAGAA  |
| 4681 | TTTGAGGATC   | CTCGCAATCC  | CTAGGAGGAT  | TAGGCAAGGG  | CTTGAGCTCA      | CGCTCTTG    |
| 4741 | AGGGACAGAA   | ATACAATCAG  | GGGCAGTATA  | TGAATACTCC  | ATGGAGAAAC      | CCAGATCTAC  |
| 4801 | GTATGATCAG   | CCTCGACTGT  | GCCTCTACT   | TGCCACCCAT  | CTGTTGTTTG      | CCCCCTCCCC  |
| 4861 | GTGCCCTTCCT  | TGACCCCTGGA | AGGTGCCACT  | CCCACTGTCC  | TTTCCTAATA      | AAATGAGGAA  |
| 4921 | ATTCATCGC    | ATTGTCTCAG  | TAGGTGTCTAT | TCTATTCTGG  | GGGGTGGGGT      | GGGGCAGGAC  |
| 4981 | AGCAAGGGGG   | AGGATTGGGA  | AGACAATAGC  | AGGCATGCTG  | GGGATGCGGT      | GGGCTCTATG  |
| 5041 | GCTTCTGAGG   | CGGAAAGAAC  | CACCTGGGGC  | TCGACAGCTC  | GACTCTAGAA      | TTCACTGGCC  |
| 5101 | GTCTTTTTAC   | AACGTCTGTA  | CTGGGAAAAC  | CCTGGCGTTA  | CCCAACTTAA      | TCGCCCTTGCA |
| 5161 | GCACATCCCC   | CTTTCGCAG   | CTGGCGTAAT  | AGCGAAGAGG  | CCCGCACCGA      | TGCCCCCTTCC |
| 5221 | CAACAGTTGC   | GCAGCCTGAA  | TGGGAATGG   | CGCCTGATGC  | GGTATTCTCT      | CCTTACCCAT  |
| 5281 | CTGTGCGGTA   | TTTCACACCG  | CATACTGGTC  | ACTCTCAGTA  | CAATCTGCTC      | TGATGCGCAG  |
| 5341 | TAGTTAAGCC   | AGCCCCGACA  | CCCGCCAACA  | CCCGCTGACG  | CGCCCTGACG      | GGCTTGTCTG  |
| 5401 | CTCCCGGCAT   | CCGCTTACAG  | ACAAGCTGTG  | ACCGCTCTCG  | GGAGCTGCAT      | GTGTCAGAGG  |
| 5461 | TTTCACCGT    | CATCACCGAA  | ACGGCGGA    |             |                 |             |

FIGURA 6-3

ES 2 332 261 T3

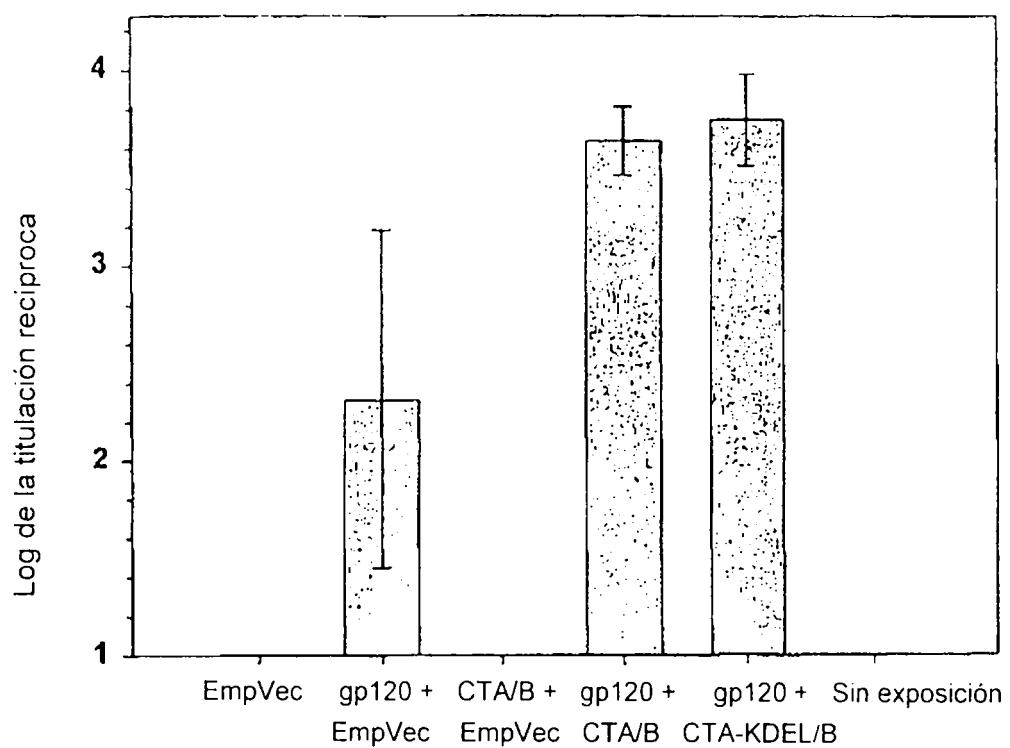


Figura 7

ES 2 332 261 T3

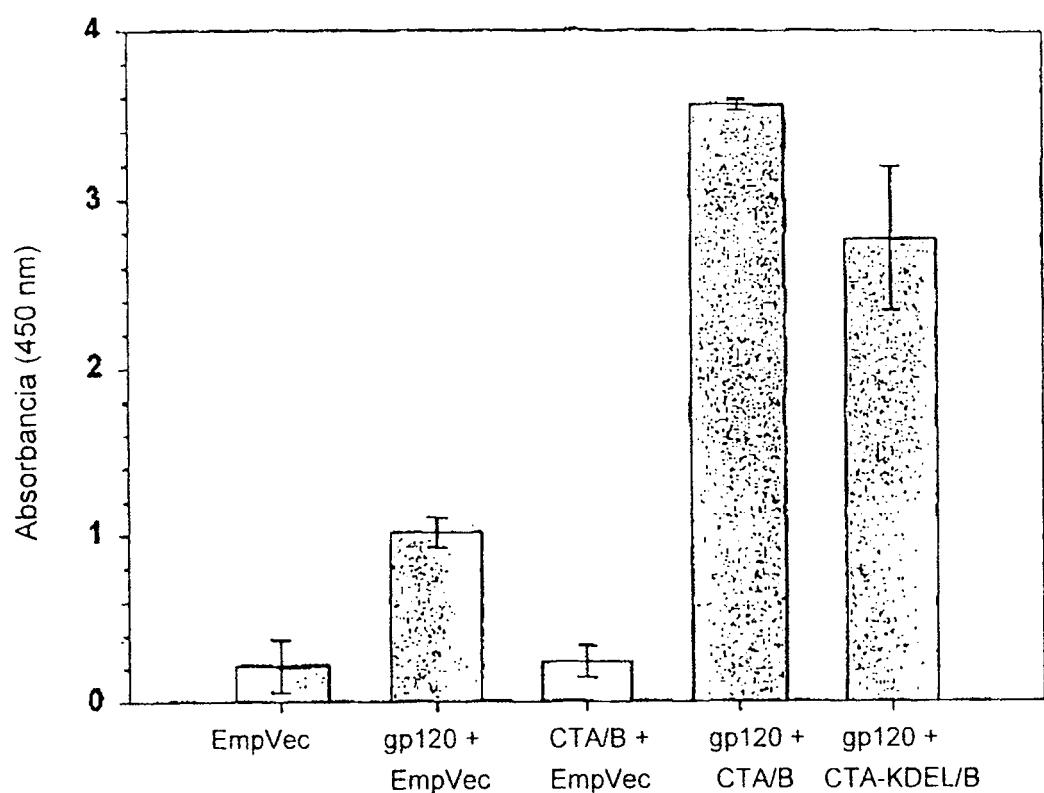


Figura 8

ES 2 332 261 T3

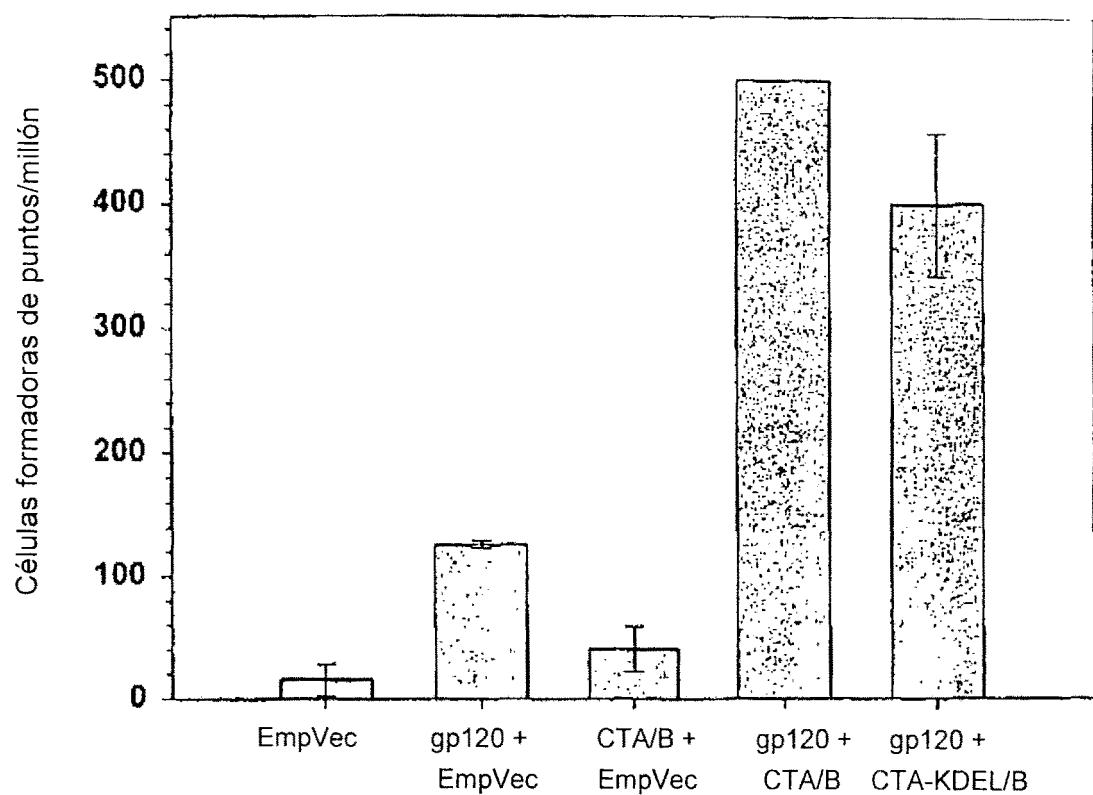


Figura 9

ES 2 332 261 T3

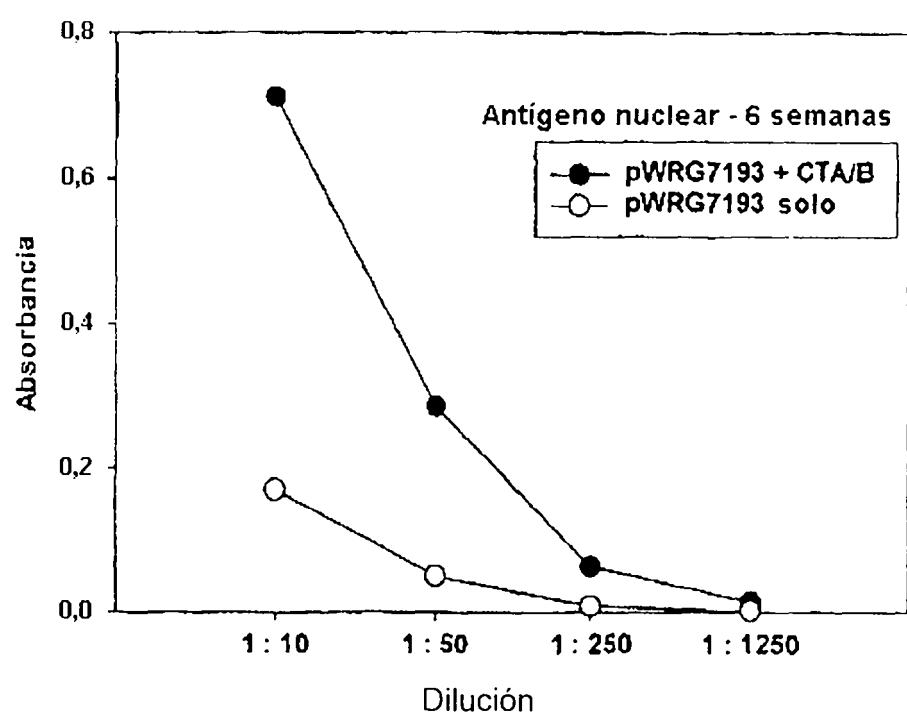


Figura 10

ES 2 332 261 T3

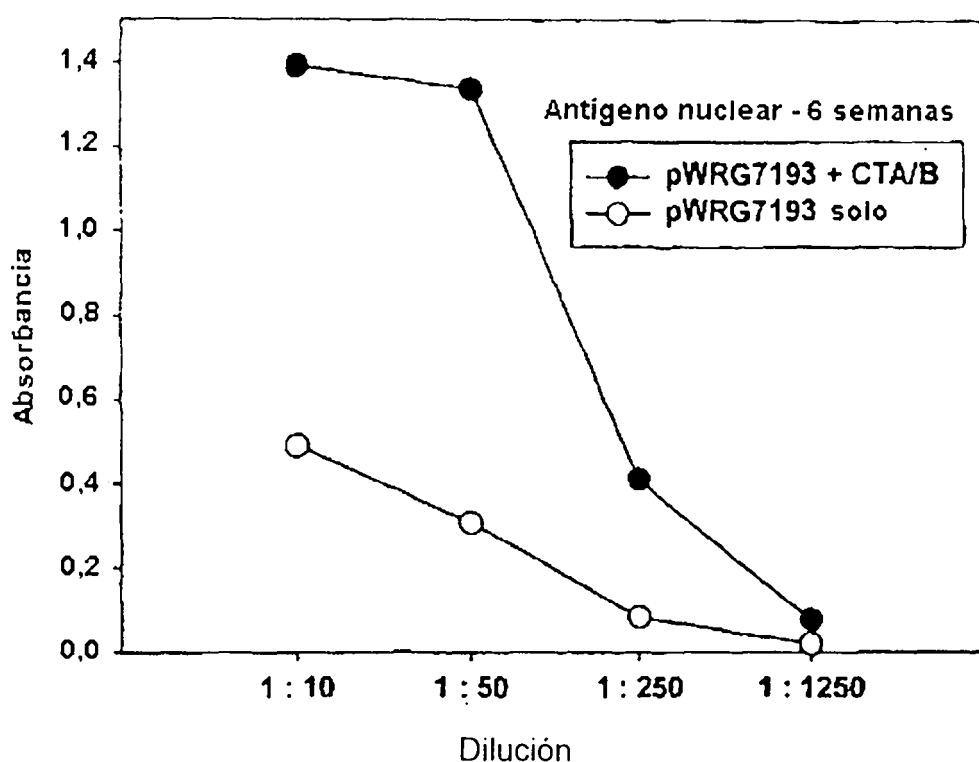


Figura 11

ES 2 332 261 T3

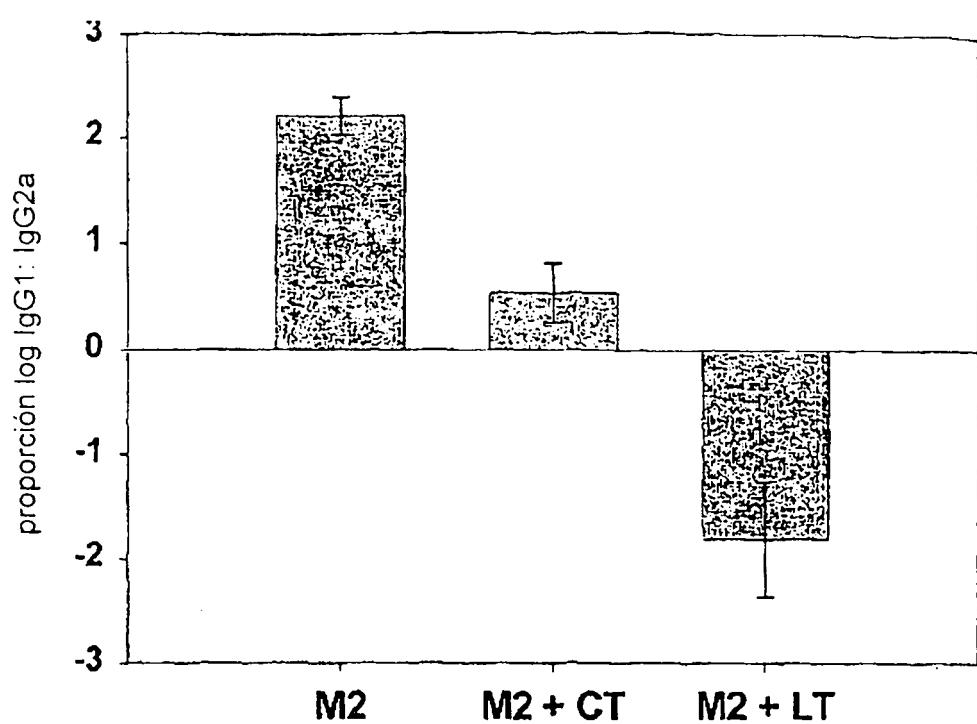
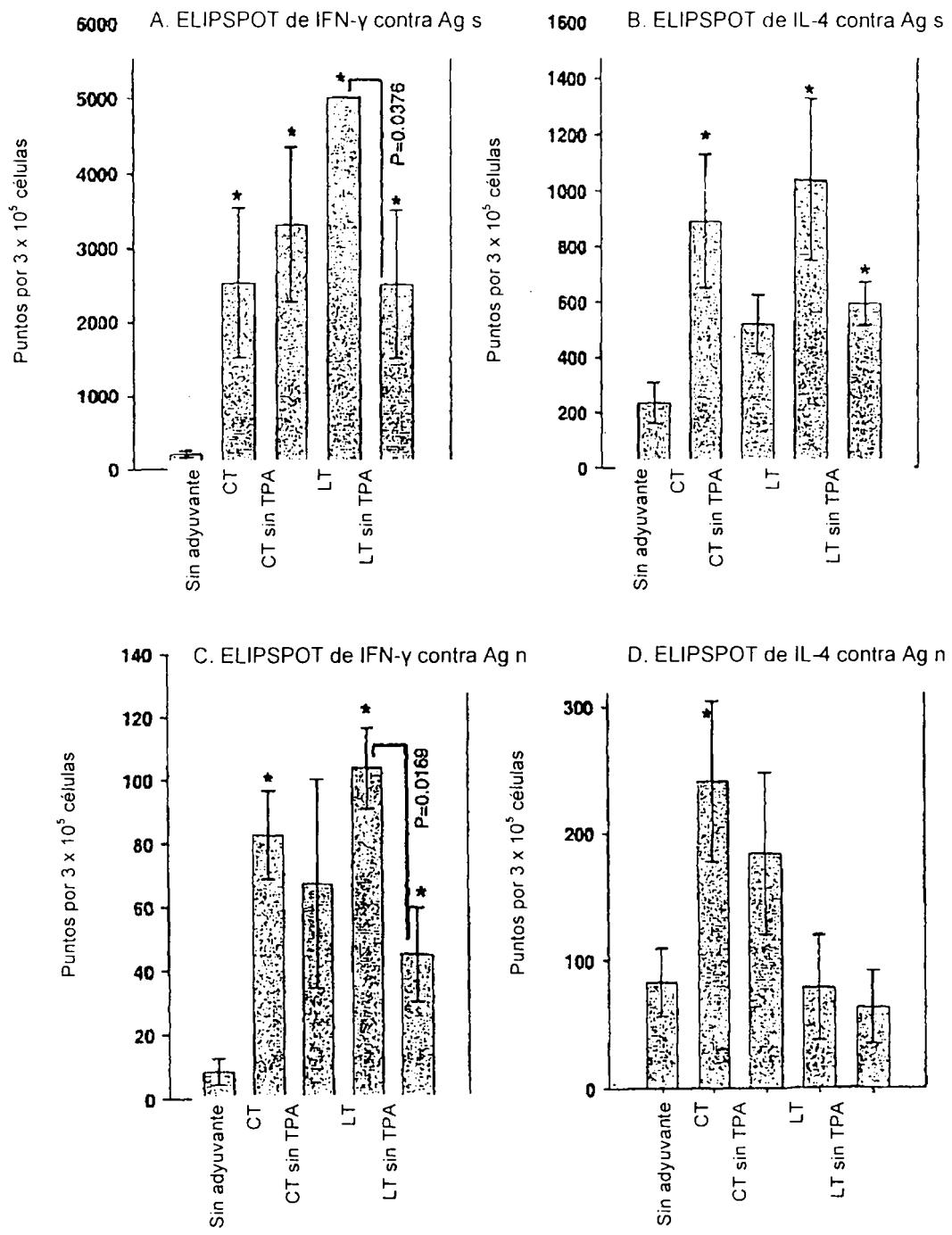


Figura 12

# ES 2 332 261 T3



FIGURAS 13A-13D

Protección contra la exposición a HSV-2 en ratones

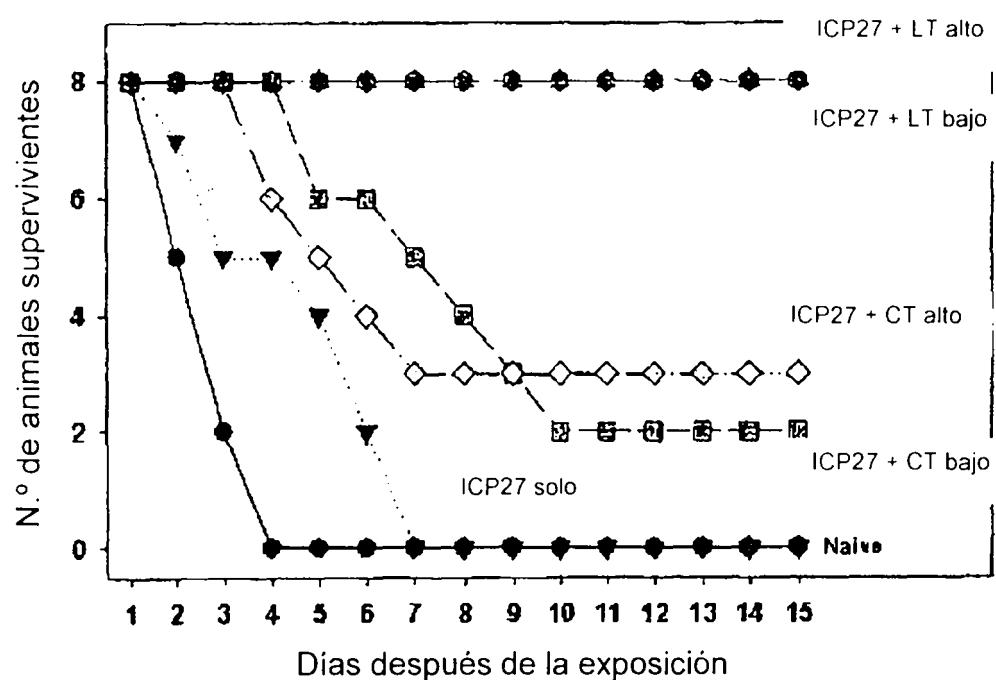


FIGURA 14

# ES 2 332 261 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> HAYNES, Joel R.  
ARRINGTON, Joshua  
5 <120> ADYUVANTES DE ÁCIDOS NUCLEICOS  
<130> APF41.40  
<140>  
10 <141> 26-11-2001  
<160> 22  
<170> PatentIn Ver. 2.1  
15 <210> 1  
<211> 5500  
<212> ADN  
<213> plásmido pPJV2002  
20 <400> 1

gacgaaaggg cctcgtata cgccatttt tataaggtaa tgtcatgata ataatggttt 60  
25 ctttagacgtc aggtggact ttccgggaa atgtgcggg aaccctatt tgtttatttt 120  
tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180  
aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtgcgcctt attcccttt 240  
ttgcggcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300  
ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatgaaact ggatctcaac agcggtaaaa 360  
30 tccttgagag tttcgcccc gaagaacgtt ttccaaatgtat gaggactttt aaagttctgc 420  
tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg cccggcaaga gcaactcggg cggcgcatac 480  
actattctca gaatgacttg gttgagttact caccagtac agaaaagcat ctacggatg 540  
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtc ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600  
acttactct gacaacgatc ggaggaccga aggagcta ac cgtttttt cacaacatgg 660  
35 gggatcatgt aactcgccctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720  
acgagcgtga caccacgatg cctgtacaa tggcaacaac gttgcgc当地 ctatcaactg 780  
gcgaactact tactcttagct tccccggaaac aattaaataga ctggatgggg gccgataaaag 840  
ttgcaggacc acttctgcgc tggcccttc cggctggctg gtttattgtct gataaatctg 900  
gagccgggtga gcgtgggtct cgcgttatca ttgcagact gggccagat ggttaagccct 960  
40 cccgtatctg agttatctac acgacgggg a gtcaggcaac tatggatgaa cggaaatagac 1020  
agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080  
catatataact ttagattgtat taaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140  
tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttAACGTGA gtttgcgttc cactgagcgt 1200  
cagacccctgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1260  
50 gctgcttgc aaaaaaaaaa ccaccgtac cagcgtgggt ttgtttggcc gatcaagagc 1320  
taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380  
ttcttagtga gcccgtatca ggcaccaact tcaagaactc tgcgtggctg ctgcgc当地 cactacatacc 1440  
tcgcctctgtc aatccgttcc ccaactggctg ctgcgc当地 cgtataagtcg tgcgtttaccg 1500  
ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcaggc gtcgggctga acgggggggtt 1560  
cgtgcacaca gcccagctt gaggcgtatca cttacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620  
a g cattgaga aagcgcacg cttccggaaag ggagaaaggc ggacaggatc cccgttaagcg 1680  
55 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggc agcttccagg gggaaacgccc tgcgtatctt 1740  
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg attttgtga tgctcgtcag 1800  
ggggcggag cctatggaaa aacgcgcctt tttacgggttc ctggcccttt 1860

55

60

65

# ES 2 332 261 T3

|    |             |             |             |             |             |             |      |
|----|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
|    | gctggcctt   | tgctcacatg  | ttcttctctg  | cgtttatccc  | tgatttctgtg | gataaccgt   | 1920 |
|    | ttaccegett  | tgagttagct  | gataaccgtc  | gcccggccgg  | aacgaccggag | ccgagcgggt  | 1980 |
|    | cagtggcgaa  | ggaagcgaaa  | gagcgcggaa  | taegcaaaacc | gcctctcccc  | gcgcgttggc  | 2040 |
| 5  | cgattcatta  | atgcagctgg  | cacgacaggt  | ttcccgactg  | gaaagcgggc  | agtgagcgt   | 2100 |
|    | acgcaattaa  | tgtgagttag  | ctcactcatt  | aggcacccca  | ggctttacac  | tttatgettc  | 2160 |
|    | cgyctcgat   | gttgtgtgga  | attgtgagcg  | gataacaatt  | tcacacagga  | aacagctatg  | 2220 |
|    | accatgatta  | cgccaagacta | gtcgacataa  | atcaatattt  | getattggcc  | attgcatacg  | 2280 |
|    | ttgtatctat  | atcataatat  | gtacatttt   | attggctcat  | gtccaatatg  | aceggcatgt  | 2340 |
| 10 | tgacattgtat | tattgtactag | ttatataatag | taatcaatta  | cggggtcatt  | agttcatagc  | 2400 |
|    | ccatatatgg  | agttccgcgt  | tacataactt  | acggtaaatg  | gcccgcctcg  | tgaccggcca  | 2460 |
|    | acgacccccc  | cccattgacg  | tcaataatga  | cgtatgttcc  | catagtaacg  | ccaataggg   | 2520 |
|    | ctttccattt  | acgtcaatgg  | gtggaggatt  | tacggtaaac  | tgcccacttg  | gcagtagatc  | 2580 |
|    | aagtgtatca  | tatgccaagt  | ccggccccc   | attgacgtca  | atgacggtaa  | atggccgccc  | 2640 |
|    | tggcattatg  | cccagtacat  | gaccttaacgg | gactttctt   | cttggcagta  | catctacgta  | 2700 |
| 15 | tttagtcatcg | ctattaccat  | ggtgatgggg  | ttttggcagt  | acaccaatgg  | gcgtggatag  | 2760 |
|    | cggtttgact  | cacggggatt  | tccaaagtctc | cacccattt   | acgtcaatgg  | gagtttgtt   | 2820 |
|    | tggcacccaa  | atcaacggga  | ctttccaaaa  | tgtcgtaata  | accccgcccc  | gttgcaccaa  | 2880 |
|    | atggggggta  | ggcgtgtacg  | gtggggaggtc | tatataagca  | gagctcgtt   | agtgaaccgt  | 2940 |
|    | cagatcgcc   | ggagacgcca  | tccacgctgt  | tttgcaccc   | atagaagaca  | ccgggaccga  | 3000 |
| 20 | tcacgccttc  | ggggccggga  | acggtgcat   | ggaacgcgga  | ttccccgtgc  | caagagtgac  | 3060 |
|    | gtaaagtacgg | cctatagact  | ctataggcac  | accccttgg   | cttttatgca  | tgctatactg  | 3120 |
|    | tttttggctt  | ggggccctata | caccccccgt  | ccttatgcta  | tagtgatgg   | tatagcttag  | 3180 |
|    | cctataggtg  | tgggttattt  | accattttt   | accactccc   | tattgtgtac  | gatactttcc  | 3240 |
|    | attactaatac | cataacatgg  | ctctttgcca  | caactatctc  | tattggatat  | atgccaatac  | 3300 |
| 25 | tetgtcette  | agagactgac  | acggactctg  | tatttttaca  | ggatggggtc  | ccatttatta  | 3360 |
|    | tttacaaattt | cacatataca  | acaacgcgt   | cccccggtcc  | cgcaagtttt  | attaaacata  | 3420 |
|    | gegtgggatc  | tccacgceaa  | tctcggtac   | gtgttccgga  | catgggctct  | tctccgttag  | 3480 |
|    | cggccggagct | tccacatccg  | agccctggc   | ccatgcctcc  | agcggctcat  | gttcgcctgg  | 3540 |
| 30 | cagctcttgc  | ctcctaacag  | tggaggccag  | acttaggcac  | agcacaatgc  | ccaccaccac  | 3600 |
|    | cagtgtgcgg  | cacaaggccg  | tggcggtagg  | gtatgtgtct  | aaaaatgagc  | tcggagattg  | 3660 |
|    | ggctcgccacc | gtgacgcaga  | tggaaagactt | aaggcagcgg  | cagaagaaga  | tgcaggcage  | 3720 |
|    | tgagttgttg  | tattctgata  | agagttagag  | gtaaactccc  | ttgcgggtgct | gttaacggtg  | 3780 |
|    | gaggcagtg   | tagtctgagc  | agtactcggt  | gctgcccgc   | gcgccaccag  | acataatagc  | 3840 |
| 35 | tgacagacta  | acagactgtt  | cctttccatg  | gttctttct   | gcagtcaccg  | tccaagcttg  | 3900 |
|    | caatcatgg   | tgcaatgaag  | agagggctct  | gtgtgtgtct  | gctgctgtgt  | ggagcagtct  | 3960 |
|    | tcgtttcgcc  | tagcaatgt   | gataagttat  | atcgggcaga  | ttctagacct  | cctgatgaaa  | 4020 |
|    | taaagcagtc  | agggtgttct  | atgccaagag  | gacagagtga  | gtactttgac  | cgaggtactc  | 4080 |
|    | aaatgaatat  | caacctttat  | gatcatgca   | gaggaactca  | gacgggattt  | gttaggcacg  | 4140 |
| 40 | atgatggata  | tgtttccacc  | tcaattatgt  | tgagaagtgc  | ccactttagtg | gttcaacta   | 4200 |
|    | tattgtctgg  | tcattctact  | tattatata   | atgttatagc  | cactgcaccc  | aacatgttta  | 4260 |
|    | acgttaatga  | tgtttaggg   | gcatacagtc  | tcatccaga   | tgaacaagaa  | gtttctgtt   | 4320 |
|    | taggtggat   | tccatactcc  | caaataatatg | gatgtatcg   | agttcatttt  | gggggtgcttg | 4380 |
|    | atgaaacaatt | acatcgtaat  | aggggtaca   | gagatagata  | ttacagtaac  | ttagatattt  | 4440 |
| 45 | ctccagcage  | agatggttat  | ggattggcag  | gtttccctcc  | ggagcataga  | gtttggaggg  | 4500 |
|    | aagagccgtg  | gattcatcat  | gcaccgcgg   | gttggggaa   | tgctccaaga  | tcatcgatga  | 4560 |
|    | gtaatacttg  | cgatgaaaaa  | acccaaagtc  | taggtgtaaa  | atcccttgac  | gaataccaaat | 4620 |
|    | ctaaagttaa  | aagacaaaata | ttttcaggct  | atcaatctga  | tattgataca  | cataatagaa  | 4680 |
|    | ttaaggatga  | attatgagga  | tcctcgcaat  | cccttaggagg | attaggcaag  | ggcttgagct  | 4740 |
|    | cacgccttt   | tgagggacag  | aaatacaatc  | aggggcagta  | tatgaatact  | ccatggagaa  | 4800 |
| 50 | acccagatct  | acgtatgatc  | agccctcgact | gtgccttcta  | gttgcacggc  | atctgttgtt  | 4860 |
|    | tgccttcctcc | ccgtgccttc  | cttgaccctg  | gaaggtgcca  | ctcccactgt  | cctttcttaa  | 4920 |
|    | taaaatgagg  | aaattgcata  | gcattgtctg  | agtaggtgtc  | attttattct  | gggggggtgg  | 4980 |
|    | gtggggcagg  | acagcaaggg  | ggaggattgg  | gaagacaata  | gcaggcatgc  | tggggatgcq  | 5040 |
| 55 | gtgggcctca  | tggcttctga  | ggcgaaaga   | accagctggg  | gtctcgacage | tgcactctag  | 5100 |
|    | aattcactgg  | ccgtcggttt  | acaacgtctg  | gactggaaa   | accctggcgt  | tacccaaactt | 5160 |
|    | aatcgccctt  | cgcacatcc   | cccttcgccc  | agctggcgta  | atagcgaaga  | ggcccgccacc | 5220 |
|    | gatcgccctt  | cccaacagtt  | gcccggctgt  | aatggcgaat  | ggccctgtat  | gcggattttt  | 5280 |
|    | ctcccttacgc | atctgtgcgg  | tatttcacac  | cgcatatgtt  | gcactctcag  | tacaatctgc  | 5340 |
| 60 | tctgatggcc  | catagttaa   | ccagccccga  | cacccgccaa  | cacccgctga  | cgccgcctga  | 5400 |
|    | cgggcttgc   | tgctcccgcc  | atccgcttac  | agacaagctg  | tgaccgtctc  | cgggagctgc  | 5460 |
|    | atgtgtcaga  | gttttcacc   | gtcatcaccg  | aaacgcgcga  |             |             | 5500 |

# ES 2 332 261 T3

<210> 2

<211> 5089

<212> ADN

5 <213> Plásmido pPJ2003

<400> 2

|    |  |
|----|--|
| 10 | gacgaaaggg cctcgtata cgccatttt tataggtaa tgtcatgata ataatggttt 60<br>cttagacgtc aggtggact ttccggaa atgtgcgcgg aaccctatt tgtttatttt 120<br>tcataataca ttcaaataatg tatccgtca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180<br>aatattgaaa aaggaaaggt atgagtattc aacattccg tgccggctt attcccttt 240  |
| 15 | ttccggcatt ttgccttctt gttttgttc acccagaaac gctggtaaa gtaaaagatg 300<br>ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgact ggatctcaac agcggtaaga 360<br>tccttgagag tttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgtat gagcaattt aaagttctgc 420<br>tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480<br>actattctca gaatgacttg gttgagtaact caccagtac agaaaagcat cttacggatg 540   |
| 20 | gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600<br>acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgctttttt cacaacatgg 660<br>gggatcatgt aactcgccctt gatcggttgg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720<br>acgagcgtga caccacgatg cctgtacaa tgcaacaac gttgcgc当地 ctattaactg 780<br>gcgaactact tactcttagt tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaaag 840  |
| 25 | ttcaggacc acttctgcgc tcggccctt cggctggctg gtttattgtt gataaaatctg 900<br>gagccggta gcgtgggtct cgccgtatca ttgcagact gggccagat ggtaagccct 960<br>cccgtatctgt agttatctac acgacggggta gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020<br>agatcgctga gatagggtgcc tcactgatta agatggta actgtcagac caagtttact 1080<br>catatataact ttagattgtat taaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140   |
| 30 | tcctttttaa taatctcatg accaaaatcc ctaacgtga gtttgcgtt cactgagcgt 1200<br>cagacccctt agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1260<br>gctgcttgc aaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtt tttttgc当地 gatcaagagc 1320<br>taccaactt tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacc aataactgtcc 1380<br>ttcttagtgc gccgtatgtt gcccaccact tcaagaactc ttagcacccg cctacataacc 1440  |
| 35 | tcgcctgtt aatcctgttta ccagtggctg ctgcctgtt cgataagtcg tgccttaccg 1500<br>ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcggctga acgggggggtt 1560<br>cgtgcacaca gcccagctt gaggcaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620<br>agcattgaga aagccacg cttcccaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680  |
| 40 | gcagggtcgg aacaggagag cgacacgaggg agttccagg gggaaacgcc tggatcttt 1740<br>atagtcctgt cgggttcgc cacctctgac ttgagcteg atttttgtga tgctcgteag 1800<br>ggggcggag cctatggaaa aacgcacgca acgcggcctt ttacgggtt ctggcccttt 1860<br>gctggccctt tgctcacatg ttctttctg ctttatecccc tgattctgtg gataaccgtt 1920<br>ttaccgcctt tgagttagt gataaccgtc gccgcagcg aacgaccgag cgcagcgtg 1980<br>cagttagcga ggaagcggaa gagcgc当地 tacgcaaaacc gcctctccc gcgcgttggc 2040 |
| 45 | cgttccatata atgcacgtgg cacyacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgc当地 2100<br>acgcaattaa tgtgagtttgcactcattt accgcacccca ggcttacac tttatgtttc 2160<br>cggtcgat gttgtgttgcgattt gataacaattt tcacacagga aacagctatg 2220  |

50

55

60

65

# ES 2 332 261 T3

|    |  |      |
|----|--|------|
|    | accalgatta cgccaaagcta gtcgacataa atcaatattt gctattggcc attgcatacg       | 2280 |
| 5  | tgttatctat atcataatat gracatttat attggctcat gtccaatatg accgcccattgt      | 2340 |
|    | tgacattgtat tattgacttag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc      | 2400 |
|    | ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gccccctcg tgaccgcaca         | 2460 |
|    | acgacccccc cccattgacg tcaataatga cgtatgtcc catagtaaac ccaataggaa         | 2520 |
|    | ctttccattt acgtcaatgg gtggaggatt tacggtaaac tgcccacttg geagtacate        | 2580 |
|    | aagtgtatca tatgccaatg ccggccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccccc        | 2640 |
| 10 | tggcattatg cccagtatcat gaccttacgg gactttctta cttggcagta catctacgt        | 2700 |
|    | ttatgtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag       | 2760 |
|    | cggtttgact cacggggatt tccaagtctc cascccatgt acgtcaatgg gagtttgtt         | 2820 |
|    | tggcacccaa atcaacggaa ctttccaaaa tgcgtataata accccgcccc gttgacgcaa       | 2880 |
|    | atggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcggtt agtgaaccgt         | 2940 |
| 15 | cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt ttgcacccatcc atagaagaca ccgggaccga      | 3000 |
|    | tccagcctcc gccccccggaa acgggtcatt ggaacgcggaa ttccccgtgc caagagtgac      | 3060 |
|    | gtaaatcccg cctatagact ctataggcac acccctttgg ctcttatgcg tgctatactg        | 3120 |
|    | tttttggctt ggggcctata caccggcgt ccttatgtca taggtatgg tatagtcttag         | 3180 |
|    | cctataggtg tgggttattt accattattt accactcccc tattgggtgac gatacttcc        | 3240 |
| 20 | attactaatac cataacatgg ctctttgcac caactatctc tattggctat atgccaataac      | 3300 |
|    | tctgtccttc agagactgac acggactctg tattttaca ggtggggcgc ccatttatta         | 3360 |
|    | tttacaaattt cacatataca acaacggcgccccgtt ccccggtcc cgcagtttttt attaaacata | 3420 |
|    | gcgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgtccggaa catggctct tctccggtag         | 3480 |
|    | cggggagct tccacatccg agccctggc ccatgectcc agcggctcat ggtcgctcgg          | 3540 |
| 25 | cagtccttg ctcttaacacg tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac        | 3600 |
|    | cagtgtccccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtctt gaaaatgagc tcggagattg        | 3660 |
|    | ggctcgacc gtgacgcaga tggaaagactt aaggcagccg cagaagaaga tgcaggcagc        | 3720 |
|    | tgagttgtt tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcgggtct gttaacgggt         | 3780 |
|    | gagggcgtg tagtctgagc agtactcggtt gtcggccgcg gcccaccag acataatagc         | 3840 |
|    | tgacagacta acagactgtt ccttccatg ggtcttttgc qagtcaccg tccaagcttg          | 3900 |
| 30 | caatcatgga tgcaatgaag agagggtct gctgtgtct gctgtgtgt ggagcagtct           | 3960 |
|    | tcgttccgc tagcacacct caaaatatta ctgattttgt tgcagaatac cacaacacac         | 4020 |
|    | aaatatatac gctaaatgat aagatatttt cgtatacaga atctctagct ggaaaaaagag       | 4080 |
|    | agatggctat cattacttt aagaatggtg caattttca agtagaaagta ccaggttagtc        | 4140 |
|    | aacatataga ttccacaaaaaa aaagcgattt gaaaggatgaa ggataccctg aggattgcat     | 4200 |
| 35 | atcttactga agctaaagtc gaaaagttat gtgtatggaa taataaaacg cctcatgcga        | 4260 |
|    | ttgcccgaat tagtatggca aattaaggat cctcgcaatc cctaggagga ttaggcaagg        | 4320 |
|    | gtttgagctc acgctcttgtt gagggacaga aatacaatca gggcagtat atgaataactc       | 4380 |
|    | catggagaaa cccagatcta cgtatgtca gcctcgactg tgcttcttag ttgccagcca         | 4440 |
|    | tctgtgttt gccccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgcccac tcccactgtc       | 4500 |
| 40 | ctttccataat aaaatggaa aattgcatacg cattgtctga gtaggtgtca ttcttattctg      | 4560 |
|    | gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggatttttgg aagacaatag caggcatgtc      | 4620 |
|    | ggggatgcgg tgggctctat ggcttcttag gcgaaaagaa ccagctgggg ctgcacagct        | 4680 |
|    | cgactctaga attcaactggc cgtcggttta caacgtctgt actggaaaaa ccctggcggt       | 4740 |
|    | acccaactt atgccttgc agcacatccc ctttcgcac gctggcgtaa tagcgaagag           | 4800 |
| 45 | ccccgcacccg atgccttgc ccaacagttt cgacgcgttga atggcgaatg ggcgcctgtat      | 4860 |
|    | cggtattttc tccttacgca tetgtgcggt atttcacacc gcatatggtg cactctcagt        | 4920 |
|    | acaatctgt ctgatgcgc atagttaaacg cagccccgac acccgccaac acccgctgac         | 4980 |
|    | gcgccttgc gggcttgcgt gctcccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc          | 5040 |
|    | gggagctgca tttgtcagag gtttaccccg tcatcaccga aacgcgcga                    | 5089 |

50

<210> 3

<211> 5488

55 <212> ADN

<213> Plásmido pPJ2006

60

65

## ES 2 332 261 T3

&lt;400&gt; 3

|   |  |
|---|--|
| 5 | gacgaaaggg cctcgtata cgccatttt tataggtaa tgcgtatgata ataatggtt 60<br>cttagacgtc aqgtggcaact ttccgggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttatttt 120<br>tctaaataca ttcaaataatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180<br>aatattgaaa aaggaaagagt atgagtttc aacatttccg tgcgcctt attcccttt 240<br>ttgcggcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaagatg 300<br>ctgaagatca gtgggtgcg ctagtggtt acatcgact ggatctcaac agcggtaaga 360<br>10 tccltgagag tttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgtat gagcactttt aaagttctgc 420<br>tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480<br>actattctca gaatgacttg gttgagact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540<br>gcatgacagt aagagaattt tgcaatgtg ccataaccat gagtataac actgcggcca 600<br>acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaac cgcttttg cacaacatgg 660<br>15 gggatcatgt aactcgccct gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaactg 720<br>acgagcgtga caccacgtg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780<br>gcgaactact tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gcggataaaag 840<br>ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggtggctg gtttattgtt gataaatctg 900<br>20 gagccggtga gctgtgggtc cgggtatca ttgcagact gggccagat ggtaagccct 960<br>cccgtatcgt agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020<br>agatcgctga gataggtgcc tcactgatta acgattggta actgcagac caagtttact 1080<br>catatatact ttagattgtat taaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140<br>tccttttta taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gtttgcgtt cactgagcgt 1200<br>25 cagacccctg agaaaagatc aaaggatctt cttagatcc ttttttctg cgcgtaatct 1260<br>gctgcttgcg aaaaaaaaaa ccaccgtac cagcggtggg ttgtttgcgg gatcaagagc 1320<br>taccaactct tttccgaag gttaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380<br>ttctagtgtt gccgtatgtt ggccaccact tcaagaactc tgcgtacccg cctacatacc 1440<br>tcgctctgtt aatccgtt ccagtggctg ctgcgtatgg cgataagtgc tgcgttaccc 1500<br>30 gggtggactc aagacgatag ttacccgata aggcgcagcg gtcgggtgc acgggggggt 1560<br>cgtgcacacaca gcccagctt gacgaaacga cttacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620<br>agcattgaga aagccacg cttcccaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg 1680<br>gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggtatctt 1740<br>atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgta tgctcgtcag 1800<br>35 gggggcggag cctatggaaa aacgcacgca acgcggcattt ttacgggtt ctggcctttt 1860<br>gctggcctt tgctcacatg ttctttctg cgttatacccc tgattctgt gataaccgtt 1920<br>ttaccgcctt tgagttagt gataccgctc gccgcagecg aacgaccgag cgcagcgagt 1980<br>cagttagcga ggaagcggaa gagcgcacaa tacgcaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040<br>cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgacty gaaagcgggc agtgcgcga 2100<br>40 acgcaattaa tgttagttt ctcactcatt aggacccca ggcttacac ttatgtttt 2160<br>cggtcgat gttgtgttga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220<br>accatgatta cgccaaagctt gtcgacataa atcaatattt gctattggcc attgcatacg 2280<br>ttgtatctat atcataatat gtacattttt atggctcat gtccaaatatg accgcctatgt 2340<br>tgacattgtat tattgacttag ttatataatg taatcaatta cgggttcatg agttcatagc 2400<br>45 ccataatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaatg gcccgcctcg tgaccgcaca 2460<br>acgacccccc cccattgtacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 2520<br>ctttccattt acgtcaatgg gtggagttt tacggtaaac tgcccttgc gcagtcacatc 2580<br>aagtgtatca tatgccaatg cggccccctt attgacgtca atgacggtaa atggccgcgc 2640<br>tggcattatg cccagtatcat gacccatgg gacccatca cttggcgtatg catctacgtt 2700<br>50 ttagtcatcg ctattaccat ggtgtatggg tttggcgtt acaccaatgg gcgtggatag 2760<br>cggtttgtact cacggggatt tccaaatgtc caccatgg acgtcaatgg gagtttggtt 2820<br>tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgcgtatata accccggcccc gttgacgc当地 2880<br>atgggcggta ggcgtgtacg gtgggagggtc tatataagca gagtcgtttt agtgc当地 2940<br>55 cagatcgctt ggagacgc当地 tccacgtgtt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga 3000<br>tccagcctcc gcccgggaa acgggtgcatt ggaacgc当地 ttcccggtgc caagagtgc当地 3060 |
|---|--|

60

65

# ES 2 332 261 T3

|    |  |      |
|----|--|------|
|    | gtaagtacgg cctatacgact ctataaggcac accccctttgg ctcttatgca tgctatactg | 3120 |
|    | tttttggctt ggggcctata caccggcgt ccttatgcta taggtgtatgg tatagtcttag   | 3180 |
| 5  | cctatacggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattgggtac gatacttcc    | 3240 |
|    | attactaatc cataacatgg ctcttgcca caactatctc tattggctat atgccaatac     | 3300 |
|    | tctgtcccttc agagactgac acggactctg tattttaca ggatggggtc ccatttatta    | 3360 |
| 10 | tttacaaatt cacatataca acaacgcccgt ccccccgtgcc cgcatgtttt attaaacata  | 3420 |
|    | gcgtgggatc tccacacgaa tctcgggtac gtgtccggaa catgggtct tctccggtag     | 3480 |
|    | cgccggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgctcgg    | 3540 |
| 15 | cagctcccttg ctcttaacag tggaggccag actttaggcac agcacaatgc ccaccacac   | 3600 |
|    | cagtgtgccc cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgago tcggagattg    | 3660 |
|    | ggctccgacc gtgacgcaga tggaaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc   | 3720 |
|    | tgagtttgtt tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcgggtct gttAACGGTG    | 3780 |
| 20 | gagggcagtg tagtctgacg agtactcggt gctgccgcgc gggccaccag acataatagc    | 3840 |
|    | tgacagacta acagactgtt ccttccatg ggtcttttct gcagtcaccc tccaagcttg     | 3900 |
|    | caatcatgga tgcataatgaa agagggtctt gctgtgtgt gctgtgtgt ggagcagtct     | 3960 |
|    | tcgttccggc tagcaatgat gataagttat atcgggcaga ttctagacct cctgtatgaaa   | 4020 |
| 25 | taaagcagtc aggtggtctt atgccaagag gacagagtgta gtacttgac cgaggtactc    | 4080 |
|    | aaatgaatat caacatccat gatcatgaa gaggaactca gacgggattt gttaggcacg     | 4140 |
|    | atgatggata tggttccacc tcaattatgt tgagaagatgc ccacttagtg ggtcaaacta   | 4200 |
|    | tattgtctgg tcattctact tattatataat atgttatagc cactgcaccc aacatgttta   | 4260 |
|    | acgttaatga tgcataatggg gcatacagtc ctcatccaga tgaacaagaa gtttctgctt   | 4320 |
| 30 | taggtggat tccatactcc caaatatatg gatggatcg agttcatttt ggggtgtttt      | 4380 |
|    | atgaacaatt acatcgtaat agggctaca gagatagata ttacagtaac ttagatattt     | 4440 |
|    | ctccacgcgc agatggttat ggattggcag gtttccctcc ggagcataga gcttggaggg    | 4500 |
|    | aagagccgtg gattcatcat gcaccgcgg gttgtggaa tgctccaaga tcatcgatga      | 4560 |
|    | gtaatacttg cgataaaaaa acccaaagtcc taggtgtaaa attccttgac gaataccaaat  | 4620 |
| 35 | ctaaagttaa aagacaaaata ttttcaggct atcaatctga tattgatatac cataatagaa  | 4680 |
|    | tttgaggatc ctgcataatcc cttaggaggat taggcaaggg cttgagctca cgctcttg    | 4740 |
|    | agggacagaaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac   | 4800 |
|    | gtatgatcag cctcgactgt gccttctgt tgccagccat ctgttggttt cccctcccc      | 4860 |
| 40 | gtgccttcct tgaccctggaa aggtggccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa  | 4920 |
|    | attgcatacgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggtt ggggcaggac   | 4980 |
|    | agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgtcg gggatgcgtt gggctctatg    | 5040 |
|    | gccttcgagg cggaaaagaac cagctggggc tcgacagctc gactctagaa ttcaactggcc  | 5100 |
| 45 | gtcgtttac aacgtcgatca ctggaaaac cctggcgatcc cccaaactaa tgccttgca     | 5160 |
|    | gcacatcccc ctttcgcccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tgccttc      | 5220 |
|    | caacagtgc gcagcctgaa tggcataatgg cgcctgtatgc ggtattttct cttacgcat    | 5280 |
|    | ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgtc tgcgtccgc      | 5340 |
| 50 | tagttaaagcc agccccgaca cccgccaaca cccgctgacg cgcctgtacgg ggcttgcgt   | 5400 |
|    | ctcccgccat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat tgcgtcagagg   | 5460 |
|    | ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcga                                       | 5488 |
| 55 | <210> 4  |      |
|    | <211> 5500   |      |
|    | <212> ADN  |      |
| 50 | <213> Plásmido pPJ2004   |      |
|    | <400> 4  |      |
| 60 | gacgaaaggg cctcgtata cgccatatttt tataaggtaa tgcataatgata ataatggttt  | 60   |
|    | cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tttttatattt   | 120  |
|    | tctaaataca ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata accctgataa atgcttcaat     | 180  |
|    | aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgcgcgcctt attccctttt    | 240  |

# ES 2 332 261 T3

|    |             |              |             |              |             |              |      |
|----|-------------|--------------|-------------|--------------|-------------|--------------|------|
|    | ttgcggccat  | ttgccttct    | gttttgctc   | acccaqaaac   | gctggtaaaa  | gtaaaagatg   | 300  |
|    | ctgaagatca  | gttgggtgca   | cgagtgggtt  | acatcgaaact  | ggatctcaac  | agcggtaaga   | 360  |
| 5  | tcccttagag  | tttcgcggcc   | gaagaacgtt  | ttccaaatgtat | gagcaccttt  | aaagttctgc   | 420  |
|    | tatgtggcgc  | ggtattatcc   | cgtattgacg  | ccgggcaaga   | gcaactcggt  | cgccgcatac   | 480  |
|    | actattctca  | gaatgacttg   | gtttagtact  | caccagtac    | agaaaaagcat | ctacggatg    | 540  |
|    | gcatgacagt  | aagagaatta   | tgcaigctg   | ccataaccat   | gagtgataac  | actgcccgc    | 600  |
| 10 | acttactct   | yacaacgatc   | ggaggaccga  | aggagcta     | cgctttttg   | cacaacatgg   | 660  |
|    | gggatcatgt  | aactcgccct   | gatcggtggg  | aaccggagct   | gaatgaaagcc | ataccaaaccg  | 720  |
|    | acgagcgtga  | caccacgatg   | cctgtagcaa  | tggcaacaac   | gttgcgc     | ctattaactg   | 780  |
|    | gcgaactact  | tactctagct   | tcccgcaac   | aattaataga   | ctggatggag  | gcccataaag   | 840  |
|    | ttgcaggacc  | acttctgcgc   | tcggccuttc  | cggtggcgt    | gttatgtct   | gataaatctg   | 900  |
| 15 | gagccgggtg  | gcgtgggtct   | cgcggtatca  | ttgcagcact   | ggggccagat  | gtaagccct    | 960  |
|    | cccgatcgt   | agttatctac   | acgacgggga  | gtcaggcaac   | tatggatgaa  | cgaaaatagac  | 1020 |
|    | agatcgctga  | gataggtgcc   | tcactgatta  | agcattggta   | actgtcagac  | caagtttact   | 1080 |
|    | catatatact  | ttagattgtat  | ttaaaacttc  | atrrrtaatt   | taaaaggatc  | tagtgaaga    | 1140 |
|    | tccttttga   | taatctcatg   | acccaaatcc  | tttaacgtga   | gttttcttc   | cactgagcgt   | 1200 |
|    | cagaccgcgt  | agaaaagatc   | aaaggatctt  | tttggatcc    | ttttttctg   | cgcgttaatct  | 1260 |
| 20 | gctgttgtca  | aacaaaaaaaaa | ccacgctac   | cagcgggtgt   | ttttttccg   | gatcaagagc   | 1320 |
|    | taccaactt   | tttccgaag    | gttactggct  | tcagcagac    | gcagatcca   | aataactgtcc  | 1380 |
|    | ttcttagtga  | gcccgtgtt    | ggccaccaact | tcaagaactc   | tgttagcaccg | cc tacataacc | 1440 |
|    | tgcgtctgt   | aatctgttta   | ccagtggctg  | ctgcccgtgg   | cgataa      | gtcg         | 1500 |
|    | ggttggactc  | aagacgatag   | ttaccggata  | aggcgcagcg   | gtcgggctga  | acggggggtt   | 1560 |
| 25 | cgtgcacaca  | gcccagctt    | gagcgaacga  | cctacacccga  | actgagatac  | ctacagcgtg   | 1620 |
|    | agcattgaga  | aagcgccacg   | cttcccgaaag | ggagaaaaggc  | ggacaggtat  | ccggtaagcg   | 1680 |
|    | gcagggtcgg  | aacaggagag   | cgcacgaggg  | agcttccagg   | gggaaacgc   | tgttatctt    | 1740 |
|    | atagtccgt   | cgggtttcgc   | cacctctgac  | tttggatcg    | attttgcgt   | tgctcgtag    | 1800 |
|    | ggggggcgag  | cctatggaaa   | aacgcacgca  | acgcggccctt  | tttacgttc   | ctggcccttt   | 1860 |
| 30 | gctggccctt  | tgctcacatg   | ttctttctg   | cgttatcccc   | tgatttgcgt  | gataaccgt    | 1920 |
|    | ttaccgcctt  | tgagttagct   | gataaccgtc  | gcccgcacgg   | aacgaccgag  | cgcagcgt     | 1980 |
|    | cagttagcga  | ggaagcgaa    | gagcgc      | tttttttttt   | tttttttttt  | tttttttttt   | 2040 |
|    | cgattcatta  | atgcagctgg   | cacgacaggt  | ttcccgactg   | gaaagcgggc  | agttagcgt    | 2100 |
|    | acgcaatata  | tgttagtt     | ctcactcatt  | aggcacc      | ggcttacac   | tttatgtt     | 2160 |
| 35 | eggctcgat   | gttgtgtgg    | atttgtgacg  | gataacaatt   | tcacacagg   | aacagctatg   | 2220 |
|    | accatgatta  | cgccaagcta   | gtcgacataa  | atcaatattt   | gttattggcc  | attgcatac    | 2280 |
|    | ttgttatctat | atcataatat   | gtacattt    | attggctcat   | gttcaatat   | accgcctat    | 2340 |
|    | tgacactgtat | tatgtactag   | tttataatag  | taatcaatta   | cggttgcatt  | agttcatag    | 2400 |
|    | ccatataatgg | agtccgcgt    | tacataactt  | acggttaat    | gttccgcct   | tgaccgc      | 2460 |
| 40 | acgacccccc  | cccattgacg   | tcaataatga  | cgtatgttcc   | catagtaac   | coaatagg     | 2520 |
|    | cttccattt   | acgtcaatgg   | gtggagat    | tacggtaaa    | tgccca      | tgccat       | 2580 |
|    | aagtgtatca  | tatgccaatg   | ccggccccct  | attgacgtca   | atgacggtaa  | atggccgc     | 2640 |
|    | ttggcattatg | cccagtacat   | gaccttacgg  | gacttctt     | tttggc      | catctacgt    | 2700 |
|    | tttagtcatcg | ctattaccat   | ggtgtatcg   | tttggc       | acaccaatgg  | ggtggatag    | 2760 |
| 45 | cggtttgtact | cacggggatt   | tccaa       | gttcaatgg    | acgtcaatgg  | gagtttgc     | 2820 |
|    | tggcaccaaa  | atcaacggga   | ctttccaaaa  | tgtcgtaata   | accccgcccc  | gttgacgca    | 2880 |
|    | atgggcgtt   | ggcgtgtacg   | gtgggagg    | ttatataagca  | gagctcg     | ttt          | 2940 |
|    | cagatcgct   | ggagacgcca   | tccacytgt   | tttgcac      | atagaagaca  | ccgggaccga   | 3000 |
|    | tccagccctt  | gcccgggg     | acgggtcatt  | gaaacgcgg    | ttcccg      | caagagt      | 3060 |
|    | gtaaatcg    | cctatagact   | ctatagc     | acccttttgg   | cttta       | tatctact     | 3120 |
| 50 | tttttgcctt  | ggggcctata   | caccccgct   | tttgc        | tttgc       | tatagtt      | 3180 |
|    | cctataggt   | tgggttattt   | accattattt  | accactcccc   | tattgg      | tgac         | 3240 |
|    | attacta     | cataacatgg   | cttttgcc    | caactatctc   | tattgg      | ctat         | 3300 |
|    | tctgtcc     | agagactgac   | acggactctg  | tat          | tttaca      | ggatgggtc    | 3360 |

55

60

65

# ES 2 332 261 T3

|    |  |
|----|--|
|    | tttacaaaatt cacatataca acaaagccgt cccccgtgcc cgcaagtttt attaaacata 3420  |
| 5  | gcgtgggatc tccacgcgaa tctcggtac gtgttcggga catgggtct ctcccgtag 3480      |
|    | cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtegcctgg 3540   |
|    | cagctccttg ctcttaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac 3600   |
|    | cagtgtcccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg 3660   |
|    | ggctcgcacc gtgacgcaga tggaaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcagggcage 3720 |
|    | tgagtttgtt gattctgata agagtccag agtactcccgtt ttgcgggtct gttAACGGTG 3780  |
| 10 | gagggcagtg tagtctgagc agtactcgts gctggcgcgc ggcgcaccag acataatagc 3840   |
|    | tgacagacta acagactgtt ccttccatg ggtttttct gcagtcaccc tccaagcttg 3900     |
|    | caatcatgga tgcaatgaag agagggtctt gctgtgtgt gctgtgtgt ggagcagtct 3960     |
|    | tcgttccggc tagcaatggc gacaaattat accgtgcgtga ctctagaccc ccagatgaaa 4020  |
|    | taaaacgttc cggaggtctt atgcccagag ggcataatga gtacttcgtat agaggaactc 4080  |
| 15 | aaatgaatat taatctttat gatcacgcga gaggaaacaca aaccggcttt gtcagatatg 4140  |
|    | atgacggata tggttccact tctcttagtt tgagaagtgc tcacttagca ggacagtttta 4200  |
|    | tattatcagg atattccact tactatataat atgttatacg gacagcacca aatatgttta 4260  |
|    | atgttaatga tggatttaggc gtatacagcc ttcaccata tgaacaggag gtttctgcgt 4320   |
|    | taggtggaat accatattct cagatataatg gatggtatcg tggtaatttt ggtgtgattg 4380  |
| 20 | atgaacgatt acatcgtaac agggaaatata gagaccggta ttacagaaat ctgaatatacg 4440 |
|    | ctccggcaga ggatggttac agattagcag gttttccacc ggatcaccaa gctlggagag 4500   |
|    | aagaaccctg gattcatcat gcaccacaaag gttgtggaaa ttcatcaaga acaattacag 4560  |
|    | gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatataat 4620    |
|    | caaaaagttaa gaggcagata tttcagact atcagtcaga ggttgacata tataacagaa 4680   |
| 25 | ttcgggatga attatgagga tcctcgcaat cccttaggagg attaggcaag ggcttgagct 4740  |
|    | cacgctcttg tgagggacag aaatacaatc aggggcagta tatgaataact ccatggagaa 4800  |
|    | acccagatct acgtatgtatc agcttcgact gtgccttcta gttgcacccat atctgtgtt 4860  |
|    | tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcga ctcccaactgt ctttctaa 4920    |
|    | taaaatgagg aaattgcatac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg 4980  |
| 30 | gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgcg 5040   |
|    | gtgggctcta tggcttctga ggcggaaaga accagctgg gctcgacacg tcgactctag 5100    |
|    | aattcactgg ccgtcggtt acaacgtcgt gactggaaa accctggcggt tacccaactt 5160    |
|    | aatcgcccttgc cagcacatcc cccttcgccc agctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc 5220 |
|    | gatcgccctt cccaaacagtt ggcagccctg aatggcgaat ggcgcctgtat gcggtatttt 5280 |
| 35 | ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcataatggt gcaacttcag tacaatctgc 5340  |
|    | tctgtatggc catagttaaag ccagccccga caccggccaa caccggctga cgcccccgtga 5400 |
|    | cgggcttgc tgcctccggc atccgcattac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 5460   |
|    | atqtqtcaga ggttttaccg gtcatacccg aaacgcgcga 5500                         |
| 40 | <210> 5  |
|    | <211> 5089   |
|    | <212> ADN  |
| 45 | <213> Plásmido pPJ2005   |
|    | <400> 5  |
| 50 | gacgaaaaggc cctcggtata cgccattttt tataaggtaa tgtcatgata ataatggttt 60    |
|    | cttagacgtc aggtggcaact tttcgggaa atgtgcgcgg aacccttattt tggtaattttt 120  |
|    | tctaaataca ttcaaataatg tattccgtca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180   |
|    | aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacattccg tgcgcctt attccctttt 240       |
| 55 | ttgcggcatt ttgccttctt gttttgtctt acccagaaac gctgggtggaa gtaaaagatg 300   |
|    | ctgaagatca gttgggtgtca cgagtgggtt acatcgaaact ggtatctcaac agcggtaaga 360 |
|    | tccttgagag ttttcgccttcc gaagaacgtt ttccaaatgtat ggcactttt aaagtctgc 420  |
|    | tatgtggcgc ggtattatcc cgatttgacg ccggggcaaga gcaactcggt cgccgcatac 480   |
|    | actattctca gaatgacttg gttgagttt caccgtcac agaaaagatc ttacggatg 540       |
| 60 | gcatgacagt aagagaatata tgcgtgtctg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600   |

# ES 2 332 261 T3

|    |  |
|----|--|
|    | acttacttct gacaacgatac ggaggaccga aggagactaac cgcttttttgcacaacatgg 660     |
| 5  | gggatcatgt aactcgccctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaactg 720    |
|    | acgagcgtga caccacgatg cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgc当地 ctattaaactg 780     |
|    | gcgaactact tactctagct tcccgccaaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840     |
|    | ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggtggctg gtttatgtct gataaatctg 900       |
|    | gagccgggtga gcgtgggtct cgccgtatca tggcagcact gggccagat ggtaagccct 960      |
| 10 | cccgtatcg agttalctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cggaaatagac 1020     |
|    | agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080     |
|    | cataataact ttagattgtat taaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140     |
|    | tccttttga taatctcatg accaaaaatcc ctaacgtga gttttcgctc cactgagcgt 1200      |
|    | cagacccctg agaaaaagatc aaaggatett ctgagatcc ttttttctg cgcttaatct 1260      |
|    | gtctgtcga aacaaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgg tttttcgctg gatcaagagc 1320      |
| 15 | taccaactct tttccgaag gtaactggct tggcagcagc gcagatacca aataactgtcc 1380     |
|    | ttcttagtgta gccgttagtta ggcaccact tcaagaactc tggcacccg cttacatacc 1440     |
|    | tcgtctgtct aatccgttta ccagtggctg ctggcagtg cgataagtgc tggcttaccg 1500      |
|    | ggttggactc aagacgatac ttaccggata aggccgcgg gtcgggctga acgggggggt 1560      |
|    | cgtgcacaca gcccagctt gggcgaacga cttacacccga actgagatac ctacagcgtg 1620     |
| 20 | agcattgaga aagcgccacg cttcccaag ggagaaaggc ggacaggtat cggtaagcg 1680       |
|    | gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agttccagg gggaaacgcg tggtatctt 1740       |
|    | atagtcctgt cgggtttcgc cactctgac ttgagcgctg atttttgta tgctcgctcg 1800       |
|    | ggggggggag cctatggaaa aacggccagca acggccgtt tttacggctc ctggcccttt 1860     |
|    | gtctggcttt tgctcacatg ttctttctg ctttatcccc ttgattctgt gataaccgt 1920       |
| 25 | ttacecgctt tgagtggct gataccgctc gccgcggcgg aacgaccggc cgcagcgagt 1980      |
|    | cagtggcga ggaageggaa gagcgc当地 tacgcaaaac gcctctcccc gcgcgttggc 2040        |
|    | cgattcatta atgcagctgg caccggactt gggggggc agtgagcgca 2100                  |
|    | acgcaattaa tggatgttag ctcactcatt aggcacccca ggctttacac ttatgtttc 2160      |
|    | cggctctat gttgtgtggc attgtgagcg gataacaatt tccacacggg aacagctatg 2220      |
| 30 | accatgatta cgc当地 agcttgcataa atcaatattt gctattggcc attgcatacg 2280         |
|    | ttgtatctat atcataatat gtacattttt attggtctat gtccaaatatg accggccatgt 2340   |
|    | tgacattgt tattgtactg ttattaaatg taatcaatgg cggggcttattt agttcatagc 2400    |
|    | ccatatatgg agtccgcgt tacataactt acggtaatgg gcccgc当地 tgaccgccc 2460         |
|    | acgacccccc cccattgacg tcaataatgg cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 2520     |
| 35 | ctttccattt acgtcaatgg gtggaggatt tacggtaaac tgccacttg gcagtgacatc 2580     |
|    | aagtgtatca tatgccaatgt cgggccccctt attgacgtca atgacggtaa atggccggcc 2640   |
|    | tggcattatq cccagttacat gaccttacgg gactttctt cttggcagta catctacgt 2700      |
|    | tttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg tttggcagt acaccaatgg gcggtggatag 2760    |
|    | cggtttact cacggggatt tccaagtctc cacccttacgg acgtcaatgg gagtttggtt 2820     |
| 40 | tggcaccaaa atcaacgggaa ctttccaaaa ttgtgttaata acccggcccc gttgacgcaa 2880   |
|    | atggggcgta ggcgtgtacg gtggagggtc tatataagca gagetcgttt agtgaaccgt 2940     |
|    | cagatcgccct ggagacgcca tccacgttgc tttgacccttcc atagaagaca cccggaccga 3000  |
|    | tccagccctt cggggccggga acgggtgcatt gggacgggaa ttccggctc caagagtgac 3060    |
|    | gtaagtacgg cctatagact ctataggcactt acccccttgg ctctttagtca tgctataactg 3120 |
| 45 | tttttggctt gggccctata cacccttgcctt ctttatgtca taggtgtatgg tatagcttag 3180  |
|    | cctataggtt tgggttattt accattattt accactcccc tattggtgac gataacttcc 3240     |
|    | attactaattt cataacatgg ctctttggca caactatctc tattggctat atgccaatac 3300    |
|    | tctgtccctt agagacttgc acggactctg tatttttaca ggtatgggtc ccatttatta 3360     |
|    | tttacaaattt cacatataca acaacggctt ccccccgttcc cgcagtttli attaaacata 3420   |
| 50 | gggtgggatc tccacgc当地 tctcggttac gtgttccggaa catgggtct tctccggtag 3480      |
|    | ggggggagct tccacatccg agccctggtc ccatggctcc acgggtctcat ggctcgctcg 3540    |
|    | cagtccttgc ctccataacag tggaggccag acttaggcac acgacaatgc ccaccaccac 3600    |
|    | cagtgtgccc cacaaggccg tggcggttac gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattt 3660     |
|    | ggctcgccacc gtgacgc当地 tggaaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc 3720    |

55

60

65

# ES 2 332 261 T3

tgayttgtt gattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcgggtgtc gttaaacggtg 3780  
 gagggcagtg tagtctgagc agtactcggt gctggcgcc gcccaccagg acataatagc 3840  
 5 tgacagacta acagactgtt ccttccatg ggicttttct gcagtsaccg tccaagcttg 3900  
 caatcatgga tgcaat.gaaag agagggtct gctgtgtgt gctgtgtgt ggagcagtct 3960  
 tcgttccggc tagcgctccc cagtcataa cagaactatg ttccgaatat cgcaacacac 4020  
 aaatatatac gataaatgac aagataactat catatacgg atcgatggca ggcaaaagag 4080  
 aaatggttat cattacattt aagagcggcg caacattca ggtcgaagtc cccggcagtc 4140  
 aacatataga ctccccaaaaaa aaagccattt aaggatgaa ggacacatta agaatcacat 4200  
 10 atctgaccga gacaaaattt gataaattat gtgtatggaa taataaaaacc cccaaatcaa 4260  
 ttgcggcaat cagttatggaa aacttagggat cctcgcaatc ccttagggaga ttaggcaagg 4320  
 gcttgagctc acgtcttgtt gaggacaga aatacaatca yyggcagttt atgaatactc 4380  
 catggagaaa cccagatcta cqtatgtca gcctcgactg tgccctctag ttgcgcgca 4440  
 tctgttgtt gccccctcccc cgtgccttcc ttgaccrctgg aaggtgccac tcccactgtc 4500  
 15 ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg 4560  
 gggggggggg tggggcagga cagcaagggg gaggatggg aagacaatag caggcatgtc 4620  
 ggggatgcgg tgggcttat ggcttctgag gggaaagaa ccagctgggg ctgcacagct 4680  
 cgactctaga attcaactggc cgtcggttta caacgtcggt actggggaaaa ccctggcggt 4740  
 20 acccaactta atcgcccttgc agcataatccc ccttcgccttgc gctggcgtaa tagcgaagag 4800  
 gcccgcacccg atcgcccttc ccaacagttt cgcacgtca atggcaatg ggcgcgtatg 4860  
 cggatatttc ttcttacgca tctgtgcggg atttcacacc gcatatggt cactctcagt 4920  
 acaatctgtt ctgatggcgc atagtttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac 4980  
 gcccgcgtac gggcttgct gctcccgca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 5040  
 gggagctgca tgtgtcagag gtttccaccg tcatcaccga aacgcgcga 5089

25

<210> 6

<211> 5488

30 <212> ADN

<213> Plásmido pPJ2007

<400> 6

35

gacgaaaggg cctcggtata cgccatatttt tataggttaa tgcgtatgata ataatggttt 60  
 cttagacgtc aggtggcaact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctattt tgtttatttt 120  
 40 cctaaataca ttcaaatatgtt tattcgctca tgagacaata accctgataa atgcttcataat 180  
 aatattgaaa aaggaagagt atgagtattt aacatcccgt tgcgtccctt attccctttt 240  
 ttgcggcatt ttgccttcc tttttgtctt accccagaaac gctgggtgaaa gtaaaagatg 300  
 ctgaaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaaact ggatctcaac agcggttaaga 360  
 tccttgagag ttttcgccttcc gaaacgtt ttccaaatgtt gggactttt aaagttctgc 420  
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtatttgacg cggggcaaga gcaactcggt cgccgcataac 480  
 45 actattctca gaatgactt gttgagttact caccagtcaac agaaaagcat cttacggatg 540  
 gcatgacagt aagagaattt tgcgtgtctt ccataaccat gaggataaac actgcggcca 600  
 acttacttctt gacaacgatc ggaggacca aggagctaac cgcgtttttt cacaacatgg 660  
 gggatcatgt aactcgctt gatgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg 720  
 50 acgagcgtga caccacgtatc cctgttagcaa tggcaacaac gttgcgcataa ctattaactg 780  
 gcgaactact tactctagct tcccgcaac aattaataga ctggatggag gggataaaag 840  
 ttgcaggacc acttctgcgc tggcccttc cggctggctt gtttattgtt gataaatctg 900  
 gagccgggtga gcggtggctt cgcgtatca ttgcagact gggccagat ggttaagccct 960  
 cccgtatctgt agttatctac acgacggggta gtcaggcaac tatggatgaa cggaaatagac 1020  
 55 agatcggtga gatagggtcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080  
 catatatact ttagattgtt taaaacttcc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140  
 tccttttgc taatctcatg accaaaatcc cttAACGTGA gtttctgtt cactgagcgt 1200  
 cagaccccgatc agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc ttttttctg cgcgtatct 1260  
 gctgcttgca aaaaaaaaaa ccaccgctac cagcggtggt ttgtttgcgg gatcaagagc 1320  
 taccaactct tttccgaa gtaactggct tcaagcagacca aatactgtcc 1380

60

65

# ES 2 332 261 T3

|    |              |             |             |             |             |             |      |
|----|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
|    | ttcttagtgta  | gccgtagttt  | ggccaccact  | tcaagaactc  | tgttagcaccg | cctacataacc | 1440 |
|    | tcgcctctgt   | aatccctgtt  | ccagtggctg  | ctgcccagtgg | cgataagtcg  | tgtcttaccg  | 1500 |
| 5  | ggttggactc   | aagacgatag  | ttaccggata  | aggcgcagcg  | gtcgggctga  | acggggggtt  | 1560 |
|    | cgtgcacaca   | gccccagcttg | gagcgaacga  | cctacaccga  | actgagatac  | ctacagcgtg  | 1620 |
|    | agcattyaga   | aagcgccacg  | cttccccaag  | ggagaaaaggc | ggacaggat   | ccggtaagcgc | 1680 |
|    | gcagggctcg   | aacaggagag  | cgcacgaggg  | agcttccagg  | gggaaacgcc  | tgttatctt   | 1740 |
| 10 | atagtcctgt   | cggtttcgc   | cacctctgac  | ttgagcgtcg  | atttttgta   | tgcctgtcag  | 1800 |
|    | ggggggcggag  | cctatggaaa  | aacgccagca  | acgcggcctt  | tttacgttc   | ctggcccttt  | 1860 |
|    | gctggccctt   | tgctcacatg  | ttctttcty   | cgthtctccc  | lgallctyig  | galAACCTTA  | 1920 |
|    | ttaccgcctt   | tgagttagct  | gataccgctc  | gccgcagccg  | aacgaccgag  | cgcagcgcgt  | 1980 |
|    | cagttagcga   | ggaagcggaa  | gagcgcctaa  | tacgcaaacc  | geetctcccc  | gcccgttggc  | 2040 |
| 15 | cgattcatta   | atgcagctgg  | cacgacaggt  | ttcccgaactg | gaaaggggc   | agttagcgcga | 2100 |
|    | acgcaat-taa  | tgtgagttag  | cctacttatt  | aggcaccctt  | ggctttacac  | tttatgtttc  | 2160 |
|    | cggtctgtat   | gttgtgtgg   | attgtgagcg  | gataacaatt  | tecacayga   | aacagctatg  | 2220 |
|    | accatgatta   | cgccaageta  | gtcgacataa  | ataatattt   | gtctattggc  | attgcatacg  | 2280 |
|    | ttgtatccat   | atcataatat  | gtacattat   | attggctca   | gtccaaatag  | accgcattgt  | 2340 |
|    | tgacattgtat  | tattgacttag | ttattaaatag | taatcaattt  | cggggctatt  | atttcatacg  | 2400 |
| 20 | ccatataatgg  | agtccgcgt   | tacataactt  | acggtttatg  | gcccgcctg   | tgaccgcctt  | 2460 |
|    | acgacccccc   | cccattgacg  | tcaataatga  | cgtatgttcc  | catagtaacg  | ccaataggga  | 2520 |
|    | ctttccattt   | acgtcaatgg  | gtggagatt   | tacggtaaaac | tgcccactt   | gcagtacatc  | 2580 |
|    | aagtgtatca   | tatgccaatg  | ccggccccct  | attgacgtca  | atgacgtta   | atggccgcct  | 2640 |
| 25 | tggcattatg   | cccagtacat  | gaccttacgg  | gactttctt   | cttggcagta  | catctacgtt  | 2700 |
|    | tttagtcatcg  | ctattaccat  | ggtgatgccc  | tttggcagt   | acaccaatgg  | gcgtggataag | 2760 |
|    | cggtttgcact  | cacggggatt  | tccaaatctc  | cacccattt   | acgtcaatgg  | gagtttggtt  | 2820 |
|    | tggcacaaaa   | atcaacggga  | ctttccaaaa  | tgtcgaaata  | accccgcccc  | gttgacgcac  | 2880 |
|    | atggggcggt   | ggcggttacg  | gtgggaggtc  | tatataagca  | gagctgttt   | agtgaaccgt  | 2940 |
| 30 | cagatcgct    | ggagacgcca  | tccacgtgt   | tttgacccctt | atagaagaca  | ccgggaccga  | 3000 |
|    | tccagcccttcc | gcggccggga  | acggtgattt  | ggaacgcgg   | ttcccccgtc  | caagagtgtac | 3060 |
|    | gtaagtacccg  | cctatagact  | ctataggcac  | acccctttgg  | ctcttatgca  | tgtataactg  | 3120 |
|    | tttttggctt   | ggggcctata  | caccccccgt  | cettatgtca  | taggtgtatgg | tatagcttag  | 3180 |
|    | cctataaggtt  | tgggttattt  | accattattt  | accactcccc  | tattgggtac  | gatactttcc  | 3240 |
| 35 | attactaate   | cataacatgg  | ctttttgtca  | caactatctc  | tattggctat  | atgccaataac | 3300 |
|    | tctgtccctt   | agagactgtac | acggactctg  | tatttttaca  | ggatggggtc  | ccatttattt  | 3360 |
|    | tttacaaaatt  | cacatataca  | acaacggcgt  | ccccccgttcc | cgcagttttt  | attaaacata  | 3420 |
|    | gcgtgggatc   | tccacgcgaa  | tctcgggtac  | gtgttccgg   | catgggtctt  | tctccggtag  | 3480 |
| 40 | cggeggagat   | tccacatccg  | agccctggtc  | ccatgcctcc  | agcggctcat  | ggtcgcgtcg  | 3540 |
|    | cagctccctt   | ctccataacag | tggaggccag  | acttaggcac  | agcacaatgc  | ccaccaccac  | 3600 |
|    | cagtgtgtcc   | cacaaggccg  | tggcggtagg  | gtatgtgtct  | gaaaatgagc  | tccggagattt | 3660 |
|    | ggctcgcacc   | gtgacgcaga  | tggaaagactt | aaggcagcgg  | cagaagaaga  | tgcaggcagc  | 3720 |
| 45 | tgagttgttg   | tattctgtata | agagtcaagag | gtaaactcccc | tttgcgtgt   | gttaacacgtt | 3780 |
|    | gagggcagt    | tagtctgagc  | agtaactcggt | gtccgcgcgc  | gcccacccag  | acataaatagc | 3840 |
|    | tgacagacta   | acagactgtt  | cctttccatg  | ggtctttttt  | gcagtcaccg  | tccaaagctt  | 3900 |
| 50 | caatcatgga   | tgaatgaag   | agagggtctt  | gctgtgtgt   | gctgtgtgt   | ggagcagtct  | 3960 |
|    | tctttccggc   | tagcaatggc  | gacaaattat  | accgtgtca   | ctctagaccc  | ccagatgaaa  | 4020 |
|    | taaaacgttc   | cggagggttt  | atgcccagat  | ggataatga   | gtacttcgt   | agaggaactc  | 4080 |
|    | aaatgaatat   | taatttttat  | gatcacgcga  | gaggaacaca  | aaccggctt   | gtcagatata  | 4140 |
|    | atgacggata   | tgtttccact  | tctcttagtt  | tgagaagtgc  | tcactttagca | ggacagtcta  | 4200 |
|    | tattatcagg   | atattccact  | tactatata   | atgttatagc  | gacagcacca  | aatatgttta  | 4260 |
|    | atgttaatga   | tgtttagggc  | gtatacagcc  | ctcacccata  | tgaacaggag  | gtttccgcgt  | 4320 |
|    | taggtggaaat  | accatattct  | cagatata    | gatggatcg   | tgttaatttt  | ggtgtgattt  | 4380 |
|    | atgaacgatt   | acatcgtaac  | aggaaata    | gagaccggta  | ttacagaaat  | ctgaatata   | 4440 |
|    | ctccggcaga   | ggatggttac  | agattagcag  | gttcccacc   | ggatcaccaa  | gttggagag   | 4500 |

55

60

65

# ES 2 332 261 T3

|    |  |      |
|----|--|------|
|    | aagaaccctg gattcatcat gcaccacaag qttgtggaaa ttcatcaaga acaattacag  | 4560 |
| 5  | gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaaat atatctcagg aaatatcaat | 4620 |
|    | caaaagttaa gaggcgata ttttcagact atcagtcaga gtttgacata tataacagaa   | 4680 |
|    | ttttaggatc ctcgcaatcc cttaggaggat taggcaaggg cttagactca cgctcttgt  | 4740 |
|    | agggacagaa atacaatccag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac | 4800 |
|    | gtatgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat ctgttgcggc cccctcccc   | 4860 |
|    | gtgccttcct tgacccttggg aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aatgagggaa | 4920 |
| 10 | attgcategc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtgggtt ggggcaggac  | 4980 |
|    | agcaaggggg aggattgggaa agacaatagc aggcatgtc gggatgcgggt gggctctatg | 5040 |
|    | gctactgagg cggaaaagaac cagctggggc tcgacagtc gactctagaa ttcaetggac  | 5100 |
|    | gtcggtttac aacgtcgtga ctggaaaaac cctggcggtt cccaaactaa tgccttgca   | 5160 |
|    | geacatecccc ctttcgcag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tgccttcc    | 5220 |
|    | caacagtgc gcagcgtgaa tggcaatgg cgcctgtatgc ggtatccctt cctiacgtat   | 5280 |
| 15 | ctgtgcggta tttcacaccc catatggtgc actctcgtatc caatctgtc tgaatgcgc   | 5340 |
|    | tagtttaagcc agccccgaca cccccaaca cccgtgtacg cgcctgtacg ggcttgcgt   | 5400 |
|    | ctcccccgtt ccgttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgtat gtgtcagagg   | 5460 |
|    | ttttcacccgtt catcacccgaa acgcgcga                                  | 5488 |
| 20 | <210> 7  |      |
|    | <211> 30   |      |
|    | <212> ADN  |      |
| 25 | <213> Secuencia artificial   |      |
|    | <220>  |      |
|    | <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  |      |
| 30 | <400> 7  |      |
|    | ggagctagca atgatgataa gtttatatcg 30                                |      |
| 35 | <210> 8  |      |
|    | <211> 30   |      |
|    | <212> ADN  |      |
|    | <213> Secuencia artificial   |      |
| 40 | <220>  |      |
|    | <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  |      |
| 45 | <400> 8  |      |
|    | cctggatcct cataattcat cottaattct 30                                |      |
|    | <210> 9  |      |
| 50 | <211> 30   |      |
|    | <212> ADN  |      |
|    | <213> Secuencia artificial   |      |
| 55 | <220>  |      |
|    | <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  |      |
| 60 | <400> 9  |      |
|    | ggagctagca cacctaaaaa tattactgtat 30                               |      |
|    | <210> 10   |      |
| 65 | <211> 30   |      |
|    | <212> ADN  |      |
|    | <213> Secuencia artificial   |      |

# ES 2 332 261 T3

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

5    <400> 10  
          cctggatcct taatttgcct tactaaatgc        30  
  
<210> 11  
10    <211> 30  
    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
15    <220>  
    <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  
  
    <400> 11  
20       cctggatcct ccaatttttat tatgtgtatc        30  
  
    <210> 12  
    <211> 30  
25    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
    <220>  
30    <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  
  
    <400> 12  
35       ggagcttagca atggcgacaa attataccgt        30  
  
    <210> 13  
    <211> 30  
40    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
    <220>  
45    <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  
  
    <400> 13  
50       cctggatcct cataattcat cccgaattct        30  
  
    <210> 14  
    <211> 30  
55    <212> ADN  
    <213> Secuencia artificial  
  
    <220>  
60    <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética  
  
    <400> 14  
65       ggagcttagcg ctccccagtc tattacagaa        30  
  
    <210> 15  
    <211> 30  
    <212> ADN

# ES 2 332 261 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 15

cctggatccc tagtttcca tactgattgc 30

10 <210> 16

<211> 30

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

20 <400> 16

cctggatcct ccaaattctgt tatataatgtc 30

25 <210> 17

<211> 65

<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

35 <400> 17

cccaagcttc caccatgagc cttctaaccg aggtcgaaac accttatcaga aacgaatggg 60  
agtgc 65

40 <210> 18

<211> 28

<212> ADN

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

50 <400> 18

ccccggatcct tactccagct ctatgctg 28

55 <210> 19

<211> 17

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

65

ES 2 332 261 T3

<400> 19

5            Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Ile Arg Asn Glu Trp Glu Cys  
      1                            5                                    10                            15  
      Arg

<210> 20

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 20

20            Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu  
      1                            5                                    10

<210> 21

25 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 21

35            Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Ile Thr Gly Lys  
      1                            5                                    10                            15

40 <210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

50 <400> 22

Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile  
      1                            5                                    10

55

60

65