



19



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: **Ayuvantes de ácidos nucleicos.**

30 Prioridad: **27.11.2000 US 724315**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2010

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

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

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 332 261 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ayudantes 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 inmunohistoquímicos 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

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

Las 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.

Como anteriormente, las 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.

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 μm , 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.

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 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 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 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 de ADP bacteriana; y (c) administrar la composición adyuvante al sujeto, por lo cual al introducir las 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.

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 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.

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 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 introducir las 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 C del péptido de la subunidad codificado por ella.

En los usos y procedimientos de la invención, administrar las composiciones adyuvantes supone transfectar las células del sujeto con una composición adyuvante con polinucleótidos de acuerdo con la presente invención. Los casetes 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.

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.

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 inmunizado, 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.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJV2002 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 pPJV2002.

La figura 2 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJV2003 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 nucleico completa (SEC. ID. N.º: 2) para el plásmido pPJV2003.

La figura 3 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJV2006 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 nucleico completa (SEC. ID. N.º: 3) para el plásmido pPJV2006.

La figura 4 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJV2004 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 pPJV2004.

La figura 5 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJV2005 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 pPJV2005.

La figura 6 es un mapa de sitios de restricción y mapa funcional del plásmido pPJV2007 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

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 pPJV2007.

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 pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/B"); la Formulación n.º 4 que contiene el plásmido pCIA-EnvT ("gp120") combinado con los vectores adyuvantes pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/B"); la Formulación n.º 5 que contiene el plásmido pCIA-EnvT ("gp120") combinado con los vectores adyuvantes pPJV2006 y pPJV2003 ("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- γ 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 pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/B"); la Formulación n.º 4 que contiene el plásmido pCIA-EnvT ("gp120") combinado con los vectores adyuvantes pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/S"); o la Formulación n.º 5 que contiene el plásmido pCIA-EnvT ("gp120") combinado con los vectores adyuvantes pPJV2006 y pPJV2003 ("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- γ 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 pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/B"); la Formulación n.º 4 que contiene el plásmido pCIA-EnvT ("gp120") combinado con los vectores adyuvantes pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/S"); o la Formulación n.º 5 que contiene el plásmido pCIA-EnvT ("gp120") combinado con los vectores adyuvantes pPJV2006 y pPJV2003 ("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 pPJV2002 y pPJV2003 ("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 pPJV2002 y pPJV2003 ("CTA/B").

La figura 12 representa los resultados del ELISA realizado en el Ejemplo 7. El histograma representa las proporciones entre los logaritmos de IgG1: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 pPJV2002 y pPJV2003 CTA/B ("M2 + CT"); o la Formulación n.º 7 que contiene el plásmido pM2-FL combinado con los vectores adyuvantes pPJV2004 y pPJV2005 LTA/B ("M2 + LT").

Las figuras 13A-13D representan los resultados de los ensayos ELISPOT de IFN- γ 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 1×10^5 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

Cloning: A Laboratory Manual (2ª 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, 2ª 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.

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 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 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 antigénicas. 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 epítopos. Para 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 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.

- 65 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

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.

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.

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.

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 vehículos de clonación y expresión, así como vectores víricos. Un “plásmido” es un vector en forma de un elemento genético extracromosómico.

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.

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.

“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 contiguo 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.

“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.

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.

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 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 alineadas dividido entre la longitud de las secuencias más cortas y multiplicado por 100. El algoritmo de homología local 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. Dayhoffed., 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 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 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, 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.nobi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>.

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%, 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; *Nucleic Acid Hybridization* referencia anterior.

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.

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.

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.

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).

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.

Revisión general

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.

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. Las 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 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. sphaerius*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum*, así como las toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriformis* y *C. difficile*, EDIN de *Staphylococcus aureus*, y mutantes de toxina bacteriana que ribosila ADP como por ejemplo GRM197, un mutante no tóxico de la toxina de la difteria (véase, por ejemplo, Bixler *et al.* (1989) Adv. Exp. Med. 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*.

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.

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 LT1) 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 ciclasa 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.

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.

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

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 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^a. Para los linfocitos T, la adición de holotoxinas CT o LT o de subunidades B recombinantes a los linfocitos T estimulados con concanavilina A provoca una reducción en la incorporación de timidina. No se han reseñado efectos de estas moléculas sobre los macrófagos y las células dendríticas. En los cultivos de PBMC, Etx8 estimula un nivel alto de TNF- α 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 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

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. 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.

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 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.

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 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.

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.º 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.º 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.

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 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 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 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.

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 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 tándem u otros motivos repetidos ordenados de otros modos.

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.

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.

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.

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 casete de expresión también pueden incluirse intrones, que contienen sitios donantes y receptores para el ayuste.

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 human o murino (Boshart *et al.* (1985) Cell 41: 521), por ejemplo, los elementos incluidos en la secuencia del intrón A de CMV.

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).

Después de que se haya producido uno o más casetes 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 casetes 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 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 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 vacunas con subunidades purificadas como se ha descrito en el presente documento más adelante.

Antígenos

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 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 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, 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 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, 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, 2ª Edición, W.B. Saunders, Philadelphia, PA. Los ejemplos no 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), 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 90/14436. 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 antigénicos

de los mismos, encontrarán uso en los presentes procedimientos. De forma similar, se conoce la secuencia codificante para el antígeno δ 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 humano (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, rinovirus, etc.); Caliciviridae; Togaviridae (por ejemplo, virus de la rubéola, virus del dengue, etc.); Flaviviridae; Coronaviridae; Reoviridae (por ejemplo, rotavirus, etc.); Bimaviridae; 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_{IIIb}, HIV_{SF2}, HIV_{LAV}, HIV_{LAI}, HIV_{MN}); HIV-1_{CM235}, HIV-1_{US4}; 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, 3ª Edición (W.K. Joklik ed. 1988); Fundamental Virology, 2ª 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 rinovirus (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 espongiiforme ovina, encefalopatía transmisible del visón 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 pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, estreptococos (tipos A y B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Hemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Complilobacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis*, y *Actinomycosis*; patógenos fúngicos que incluyen candidiasis y aspergilosis; patógenos parasitarios que incluyen tenia, trematodo, nemátodos, amebiasis, giardiosis, criptosporidio, esquistosoma, *Pneumocystis carinii*, triclomoniasis 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*, *Strongilus 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 un 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,

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 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 epidérmicos pueden obtenerse del polvo de las casas u orgánicos (habitualmente de origen fúngico), de insectos como por ejemplo los ácaros (*dermatophagoides pterosinysis*), 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, cacahuets), marisco (por ejemplo, crustáceos), alérgenos de guisantes, judías y gluten; los alérgenos ambientales habituales incluyen alérgenos de metales (níquel y oro), sustancias químicas (formaldehído, trinitrofenol y trementina), látex, caucho, fibras (algodón o lana), arpillera, tintes capilares, cosméticos, detergentes y perfumes; los alérgenos de medicamentos habituales incluyen alérgenos de anestésicos locales y salicilatos; los alérgenos antibióticos incluyen 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 epítomos principal y críptico del alérgeno Der pi (Hoyne *et al.* (1994) *Immunology* 83190-195), fosfolipasa A2 del veneno de abeja (PLA) (Akdis *et al.* (1996) *J. Clin. Invest.* 98: 1676-1683), alérgeno Bet v 1 del polen de abedul (Bauer *et al.* (1997) *Clin. Exp. Immunol.* 107: 536-541), y el alérgeno herbáceo recombinante multiépitópico 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 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 16/18 y E6/E7 asociados a los cánceres de cuello de útero, el antígeno MUC1-KLH asociado al carcinoma de mama, CEA (antígeno carcinoembrionario) 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 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 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*, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984) y G. Barany y R. B. Merrifield, *The Peptides: 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 obtenerse usando procedimientos de recombinación, como por ejemplo cribando adenotecas 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 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 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, 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.

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 un 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 bicatenario, 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) BioTecniques 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, AAVX7, 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.

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. 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

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, polietilenglicoles (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 derivadas 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.

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 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 implante de células transformadas en un sujeto (por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación 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 para 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 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 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, usando procedimientos conocidos por los expertos en la técnica.

Partículas recubiertas

En una realización, se administran construcciones de polinucleótido que contienen las secuencias codificantes 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 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 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 μm 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 μm , o disponibles en Degussa, South Plainfield, NJ con un intervalo de tamaños de partícula que incluyen 0,95 μm) 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 de oro o tungsteno con ADN plasmídico, 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.

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 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 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 transportadoras nucleares que portan las 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

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 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 movable, 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 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.

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 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.

Composiciones con partículas

De forma alternativa, los polinucleótidos que portan las secuencias que codifican los péptidos de las subunidades 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 antigénicos con uno o más 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, 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, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles (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).

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 μg 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 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.

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 una 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, casetes y similares. En el presente documento se describen los dispositivos de administración de partículas apropiados (por ejemplo, las jeringuillas sin agujas).

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.

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.

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 μm , preferiblemente que varía en el intervalo de aproximadamente 10-70 μm . Las partículas de un tamaño mayor a aproximadamente 250 μm 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^3 preferiblemente entre aproximadamente 0,9 y 1,5 g/cm^3 , 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 μm pueden acelerarse a través de la boquilla a velocidades cercanas a las supersónicas de un flujo de gas impulsor.

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.

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 μm , preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 μm , y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 μm ; y una densidad de

las partículas que varíe en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm³ y una densidad aparente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm³, o superior.

De forma similar, pueden obtenerse partículas de los antígenos seleccionados que tengan un tamaño que varíe en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 250 μ m, preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 150 μ m, y lo más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 μ m; una densidad de las partículas que varíe en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm³, y una densidad aparente preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm³, y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,8 a aproximadamente 1,5 g/cm³.

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.

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, supositorios y técnicas de administración 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 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 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).

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. 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.

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.

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, oral o intramuscular. Otros modos de administración incluyen la administración tópica, oral y pulmonar, supositorios y aplicaciones transdérmicas. El tratamiento con las dosis puede ser una pauta de dosis única o una pauta de dosis múltiples.

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.

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.

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) 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:

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

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

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 terminando en el nucleótido de la posición 886 (N.º 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.

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.º: 9); y

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

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 empezando por el nucleótido de la posición 946 y terminando en el nucleótido de la posición 1257 (N.º 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.

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.º: 7) y el siguiente cebador:

Cebador 5: 5'-CCT GGA TCC TCA AAT TCT ATT ATG TGT ATC-3' (SEC. ID. N.º: 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 digirieron 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.

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.

Después de completar las reacciones PCR, los fragmentos recién sintetizados se digirieron 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.

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.

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

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).

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.

Dado que M2 es traducido a partir de un ARN ajustado, 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 ajuste. 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:

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

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

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.

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 conocidos 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 desnaturalizar 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.

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 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 pPJV2002, pPJV2003, y/o pPJV2006). 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 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 CaCl₂ 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 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 pPJV2002 y pPJV2003 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 pPJV2002 y pPJV2003 todos coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg cada uno de pPJV2002 y pPJV2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

45 Formulación n.º 4: vector de ADN pM2-FL, vectores de ADN pPJV2006 y pPJV2003 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 pPJV2006 y pPJV2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 5: vector de ADN pM2-FL y pPJV2002 coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg de ADN de pPJV2002 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho; y

50 Formulación n.º 6: vector de ADN pM2-FL y pPJV2003 coprecipitados sobre un único lote de oro (2 µg ADN de pM2-FL por mg de oro, y 1 µg de ADN de pPJV2003 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 tándem 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 SLLTEVETPIRNEWECR (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 μ 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 μ 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 H₂SO₄ 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.

TABLA 1

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	
	218.700	
2	72.900	186.934
	72.900	
	218.700	
	218.700	
	218.700	
	656.100	

ES 2 332 261 T3

3	24.300	186.934
	72.900	
	72.900	
	218.700	
	656.100	
	656.100	
	656.100	
4	24.300	350.211
	218.700	
	656.100	
	656.100	
	656.100	
	656.100	
	656.100	
	656.100	
5	---- *	262.645
	72.900	
	218.700	
	218.700	
	218.700	
	656.100	
	656.100	
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.º 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.º 1) solo.

Ejemplo 4

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 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 pPJV7077 (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 (pPJV2002 y pPJV2003, 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 pPJV2002 y pPJV2003 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 pPJV2002 y pPJV2003) 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 inmunizaron 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.

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 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 H₂SO₄ 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.

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 epítipo 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 IPQSLDSWWTSL (SEC. ID. N.º: 20).

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 1x10⁶ células por pocillo. Para los pocillos a los que se añadieron menos de 1 x 10⁶ células de los animales inmunizados, se usaron las células de los animales no expuestos para llevar el total a 1 x 10⁶. 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. Después 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 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- γ , 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- γ . Se recubrieron placas de alta unión (Costar) con 100 μ l de 0,5 μ g/ml de anticuerpo contra IFN- γ de ratón (Pharmingen) en tampón de bicarbonato pH 9,6. Las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente 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 μ g/ml de anticuerpo de rata contra IFN- γ de ratón en PBS, Pharmingen) a las 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 con H₂SO₄ 1 N. La densidad óptica se leyó a 450 nm.

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

TABLA 2

Formulación	Titulaciones individuales	Titulaciones medias
pWRG7128	40.000	55.000
	84.000	
	41.000	
	54.000	
pWRG7128, pPJV2002 y pPJV2003	28.000	23.000
	14.000	
	27.000	
	23.000	

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 (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.

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- γ específico de CD8 se incluyen a continuación en la Tabla 3.

TABLA 3

ELISA para IFN-γ			
Formulación	Número de células/pocillo		
pWRG7128	1,0x10 ⁶	0,5x10 ⁶	0,1 x10 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
(Media)	1,05	0,242	0,01
pWRG7128, pPJV2002 y 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
(Media)	2,23	1,76	0,404

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 x 10⁶) 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

ELISPOT para IFN-γ	
Formulación	Número de células positivas/1 x 10⁶ células
pWRG7128	510
	410
	530
	590
(Media)	510
pWRG7128, pPJV2002 y pPJV2003	1.480
	2.300
	2.500
	3.500
(Media)	2.445

ES 2 332 261 T3

En este ensayo de ELISPOT para IFN- γ , los números son la media de pocillos duplicados y corresponden al número de células positivas por cada 1×10^6 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.

Ejemplo 5

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

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 citomegalovirus 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-BgnI 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 un fragmento KpnI-XhoI de 2565 pb de LAV-1_{BRU} (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).

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 aminoácidos aguas abajo del sitio de procesamiento de gp120/gp41.

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_{BRU} (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 ajuste en 5', el primer exón del gen rev, y el segundo exón del gen *rev*, respectivamente.

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.

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 control vacío (pWRG7054 sin el inserto de gp120), 2,5 μ 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 μ g de cada uno de ADN de pWRG7054 y ADN de pCIA-EnvT por mg de oro, y 0,125 μ g de pC-rev por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 3: Vector de control vacío (pWRG7054), vectores de ADN con CTA (pPJV2002) y CTB (pPJV2003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,25 μ g de ADN de pWRG7054 por mg de oro, y 1 μ g cada uno de ADN de pPJV2002 y pPJV2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho;

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 (pPJV2002) y CTB (pPJV2003) todos coprecipitados sobre un único lote de oro (1,25 μ g de ADN de pCIA-EnvT por mg de oro, 0,125 μ g de ADN de pC-rev por mg de oro, y 1 μ g cada uno de ADN de pPJV2002 y pPJV2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho; y

Formulación n.º 5: vector de ADN de gp120 (pCIA-EnvT), vector de ADN de rev de HIV-1 (pC-rev), vectores de ADN de CTA-KDEL (pPJV2006) y CTB (pPJV2003) 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 pPJV2006 y pPJV2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho.

Los vectores plasmídicos pWRG7054, pCIA-EnvT, pC-rev, pPJV2002, pPJV2003 y pPJV2006 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.

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 tándem a la epidermis abdominal (un cartucho por administración) usando un dispositivo de administración de partículas Powder Ject® XR-1 (PowderJect Vaccines Inc., Madison, WI).

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.

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.º 4 que contenía los vectores pPJV2002 y pPJV2003, o la Formulación n.º 5 que contenía los vectores pPJV2006 y pPJV2003) combinados con el vector gp120 comparado con el grupo que recibió el vector gp120 sin adyuvante (Formulación n.º 2, pCIA-EnvT).

Tras recoger las muestras de suero posteriores al refuerzo, se sacrificaron los animales y se extrajeron los bazo de cada ratón. Los esplenocitos se aislaron aplastando los bazo, 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 x10⁷ 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-γ 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 x10⁶ 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.º: 21). Después de una incubación de 24 horas a 37°C en CO₂ 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 estreptavidina-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.

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.º 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.º 4 que contenía los vectores pPJV2002 y pPJV2003, y la Formulación n.º 5 que contenía los vectores pPJV2006 y pPJV2003) presentaron niveles de IFN-γ significativamente mayores 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 = 0,0068, 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.

Además de un aumento en el nivel de producción de IFN- γ , también aumentó notablemente el número de esplenocitos específicos del péptido gp120 de HIV que producían IFN- γ , según se determinó mediante un procedimiento ELISPOT. En el ensayo ELISPOT, se recubrieron placas de nitrocelulosa (Millipore) con un anticuerpo de captura de IFN- γ , se lavaron y se bloquearon como se describe anteriormente para el ELISA *in situ* para IFN- γ de linfocitos T cooperadores. Los esplenocitos se añadieron a pocillos previamente recubiertos con un número de células inicial de 1×10^6 células/pocillo, y se estimularon en medio solo (control negativo) o en medio que contenía $1 \mu\text{g/ml}$ de un péptido que contenía el epítipo de CTL para gp120 de HIV inmunodominante y que tiene la siguiente secuencia: RGPCRAFFV-TI (SEC. ID. N.º: 22). Las placas se incubaron durante 24 horas a 37°C en CO_2 al 5%, se lavaron 2 veces con agua DI, 3 veces con PBS, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con $50 \mu\text{l}$ por pocillo de $1 \mu\text{g/ml}$ de mAb de detección contra IFN- γ de ratón (Pharmingen). Las placas después se lavaron 5 veces y se incubaron durante 1 hora con $50 \mu\text{l}$ por pocillo de una dilución 1:1000 de solución de estreptavidina 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- γ 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 pPJV2002 y pPJV2003, y la Formulación n.º 5 que contenía los vectores pPJV2006 y pPJV2003) presentaron un número significativamente mayor de células que producían IFN- γ 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- γ 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.

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

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 clon 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 pPJV7077 (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 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.

Los casetes de expresión que contenían: (a) el promotor/potenciador del CMV, la región 5' no traducida del 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 SalI, 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.

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 NcoI, 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.

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.

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 la región bGHpA. Estos fragmentos después se ligaron para proporcionar la construcción del plásmido pPJV7193 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.

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

Formulación n.º 2: El vector HBcAg/HBsAg (pWRG7193), los vectores de ADN con CTA-KDEL (pPJV2006) y CTB (pPJV2003) 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 pPJV2006 y pPJV2003 por mg de oro), 0,5 mg de oro por cartucho.

El plásmido pWRG7193 o solo o con los vectores adyuvantes pPJV2006 y pPJV2003 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 tándem 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 de los vectores adyuvantes pPJV2006 y pPJV2003. 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).

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. Después 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 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 N₂SO₄. Las placas se leyeron a 450 nm. Las figuras 10 y 11 muestran la media geométrica de los valores de absorbancia a las 6 y 8 semanas, respectivamente, para cada uno de 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 pPJV2006 y pPJV2003.

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, demostrando la capacidad de los presentes plásmidos adyuvantes (pPJV2006 y pPJV2003) 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

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 pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004, pPJV2005, pPJV2006 y pPJV2007 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 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.

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 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.

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;

Formulación n.º 2: vector de ADN pM2-FL combinado con los vectores de ADN de CTA y CTB (pPJV2002 y pPJV2003) 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 3: vector de ADN pM2-FL combinado con los vectores de ADN de CTA-KDEL y CTB (pPJV2006 y pPJV2003) 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;

Formulación n.º 4: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de CTA-KDEL (pPJV2006) 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 pPJV2006, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 5: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de CTA (pPJV2002) 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 pPJV2002, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 6: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de CTA (pPJV2003) 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 pPJV2003, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 7: vector de ADN de pM2-FL combinado con los vectores de ADN de LTA y LTB (pPJV2004 y pPJV2005) 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 (pPJV2007 y pPJV2005) 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;

Formulación n.º 9: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de LTA-RDEL (pPJV2007) 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 pPJV2007, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho;

Formulación n.º 10: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de LTA (pPJV2004) 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 pPJV2004, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho; y

Formulación n.º 11: vector de ADN pM2-FL combinado con el vector de ADN de LTB (pPJV2005) 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 pPJV2005, 1,0 µg de pWRG7054, 0,1 µg de pM2-FL), 0,5 mg de oro por cartucho.

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 dos administraciones en tándem 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.

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.

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 continuación en la Tabla 5.

TABLA 5

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 mas 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.

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

(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).

Ejemplo 8

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

Las construcciones de los vectores que contenían las subunidades de las toxinas CTA, CTB, LT A y LTB (pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004, y pPJV2005, 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.

Las condiciones de PCR estándar que se usaron para la construcción/modificación de los vectores fueron las siguientes: 1x tampón nuclear de PCR con MgCl₂ 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.

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 SphI y PstI localizados inmediatamente aguas arriba del promotor del CMV insertado.

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 NheI y BamHI para generar un fragmento de inserción, que después se modificó para que incluyera un sitio BglII aguas abajo y se insertó en un vector de clonación. El vector de clonación se cortó con PstI y EcoRI para generar un fragmento de inserción con el antígeno nuclear; el plásmido pWRG7128 modificado se cortó con PstI y MfeI para generar un fragmento de vector, y el fragmento de inserción del antígeno nuclear se ligó en el fragmento de vector, produciendo la construcción de plásmido dual con los antígenos superficial y nuclear.

Las construcciones de vectores que contenían las subunidades de la toxina CTA, CTB, LTA y LTB (pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004, y pPJV2005, 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.

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 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 en ratones con adyuvante de vacuna de ADN:

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 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5 µg de vector plasmídico de ADN pPJV2002 (CTA), 0,5 µg de vector plasmídico de ADN pPJV2003 (CTB);

Formulación n.º 3: (“CT sin TPA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5 µg de vector plasmídico de ADN de CTA sin TPA, 0,5 µg de vector plasmídico de ADN con CTB sin TPA;

Formulación n.º 4: (“CTA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN de pPJV2002 (CTA);

Formulación n.º 5: (“CTA sin TPA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN de CTA sin TPA;

Formulación n.º 6: (“CTB”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN de pPJV2003 (CTB);

Formulación n.º 7: (“CTB sin TPA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN de CTB sin TPA;

Formulación n.º 8: (“LT”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5 µg de vector plasmídico de ADN de pPJV2004 (LTA), 0,5 µg de vector plasmídico de ADN de pPJV2005 (LTB);

Formulación n.º 9: (“LT sin TPA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 0,5 µg de vector plasmídico de ADN de LTA sin TPA, 0,5 µg de vector plasmídico de ADN de LTB sin TPA;

Formulación n.º 10: (“LTA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN pPJV2004 (LTA); Formulación n.º 11: (“LTA sin TPA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN de LTA sin TPA;

Formulación n.º 12: (“LTB”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN pPJV2005 (LTB); y

Formulación n.º 13: (“LTS sin TPA”) 1 µg de vector plasmídico de ADN dual con antígenos superficial y nuclear, 1 µg de vector plasmídico de ADN de LTS sin TPA.

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 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-γ 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 epítipo de linfocito T (o bien del antígeno superficial o del nuclear) en ratones. El péptido se disolvió en DMSO (10 mg/ml) y se diluyó a 10 µg/ml en cultivo.

Para los ensayos ELISPOT, se recubrieron placas de filtración con membrana Millipore Multiscreen con 50 µl del antisuero apropiado (15 µg/ml de antisuero contra IFN-γ 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 1x10⁶ células por pocillo. Para los pocillos a los que se añadieron menos de 1 x 10⁶ células de los animales inmunizados, se usaron las células de los animales no expuestos para llevar el total a 1 x 10⁶. 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. Después se realizaron 3 lavados con PBS. Se añadió un anticuerpo monoclonal biotinilado contra IFN-γ o contra IL-4 (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 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.

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-γ 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- γ 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.º 8 y n.º 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 CT y LT que carecen de las secuencias de señalización (Formulaciones n.º 3 y n.º 9, respectivamente) mostraron un efecto adyuvante más débil, que se observa particularmente en los datos ELISPOT de IFN- γ 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.

Finalmente, la diferencia claramente observable del efecto adyuvante entre los segregados (Formulaciones n.º 2 y n.º 8) y los no segregados (Formulaciones n.º 3 y n.º 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- γ específicas del antígeno superficial.

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.º 1 (sin adyuvante); Formulación n.º 2 (CT); Formulación n.º 4 (CTA); Formulación n.º 5 (CTA sin TPA); Formulación n.º 6 (CTB); Formulación n.º 7 (CTB sin TPA); Formulación n.º 8 (LT); Formulación n.º 10 (LTA); Formulación n.º 11 (LTA sin TPA); Formulación n.º 12 (LTB); y Formulación n.º 13 (LTB sin TPA). Todos los animales se sacrificaron dos semanas después de la segunda inmunización, y se recolectaron los bazos para usarlos en los ensayos ELISPOT de IFN- γ e IL-4 que se describen en el presente documento anteriormente.

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.º 10-13) sí mostraron efecto adyuvante en la respuesta de IFN- γ e IL-4 al antígeno superficial (sAg) que se vio influenciada por la presencia/ausencia de la secuencia de señalización de la secreción.

Ejemplo 9

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

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.

Con respecto a la construcción del plásmido antigénico 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 MgCl₂ 1,5 mM (promega Corp., Madison, WI); 0,400 μ M de cada cebador; 200 μ M de cada dNTP (USB Inc., Cleveland, OH); 2,5 μ g de polimerasa Taq (Promega Corp., Madison, WI); 1,0 ng de ADN plantilla; agua hasta 100 μ 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.

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 envuelta 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 vírico, 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 Relds Virology, 3ª 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.

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., Madison, WI).

Se combinaron las construcciones de los vectores plasmídicos adyuvantes que contenían las subunidades de las toxinas CTA, CTB, LTA y LTB (pPJV2002, pPJV2003, pPJV2004, y pPJV2005, respectivamente) para proporcionar los adyuvantes CTA/CTB (pPJV2002 + pPJV2003) y LTA/LTB (pPJV2004 + pPJV2005). 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:

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 pPJV2002 (CTA), 50 ng de pPJV2003 (CTB);

Formulación n.º 3: ("CT bajo") 500 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 250 ng de pPJV2002 (CTA), 250 ng de pPJV2003 (CTB);

Formulación n.º 4: ("LT alto") 900 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 50 ng de pPJV2004 (LTA), 50 ng de pPJV2005 (LTB); y

Formulación n.º 5: ("LT bajo") 500 ng de vector plasmídico de ADN con el antígeno ICP27, 250 ng de pPJV2004 (LTA), 250 ng de pPJV2005 (LTB).

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).

Dos semanas después de la segunda inmunización, todos los ratones que quedaban (grupo B1) se expusieron a 1×10^6 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

1. Una composición adyuvante que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico; (ii) una segunda
5 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 exotosina 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
10 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.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la región codificante de la subunidad A truncada
15 ha sido modificada genéticamente además para eliminar un motivo KDEL o RDEL del extremo C del péptido de la
subunidad codificado por ella.
3. Una composición adyuvante que comprende: (i) una primera secuencia de ácido nucleico; (ii) una segunda
20 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 exotosina 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
25 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.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la región codificante de la subunidad A modi-
30 ficada 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.
5. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la exotoxina de
35 ribosilación de ADP bacteriana es una enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*.
6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que además comprende un
antígeno de interés.
7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además comprende una
40 tercera secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno de interés.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en la que el antígeno es de un patógeno bacteriano, un
45 patógeno vírico, un patógeno parasitario, un alérgeno o un antígeno específico de tumor.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el antígeno es de un virus, un virus
Herpes simplex (HSV), virus de la hepatitis, o papillomavirus.
10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende
50 un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la compo-
sición con partículas es adecuada para la administración transdérmica mediante un dispositivo de administración de
55 partículas.
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 .
13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la partícula
60 transportadora nuclear comprende un metal.
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el metal es oro.
15. Una composición adyuvante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para usar para poten-
65 ciar 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.

5 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.

10 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.

15 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 virus de la gripe, un virus Herpes simple (HSV), virus de la hepatitis, o papillomavirus.

20 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.

25 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.

30 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.

35 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.

40 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.

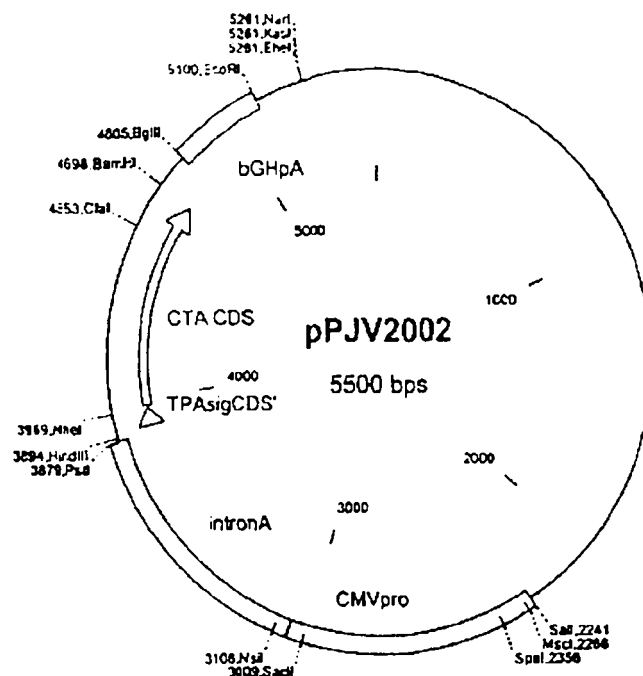
45

50

55

60

65



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,	SpeI	2356,	SacII	3009,
NsiI	3105,	PstI	3879,	HindIII	3894,	NheI	3969,
ClaI	4553,	BamHI	4698,	BglII	4805,	EcoRI	5100.

Figura 1-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTACACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCCT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTGTC ACCCAGAAAC GCTGOTGAAA GTAAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACCTACTTCT GACAACGATC GGAGCACC GAAGAGCTAAC CGCTTTTGTG CACAACATGG
661 GGGCATCATGT AACTCGCCTT GATCCTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGAC ATACCAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAAC TG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCGGAGCC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCGGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGCATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACGTGATTA AGCATTCGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAGACTTC ATTTTAAATT TAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 CCTTTTGTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACCTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTG GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CTTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTTCGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGTTT
1561 CGTGACACCA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTTGAG AAGCGCCACG CTTCCTGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAACG
1681 GCAGGCTCGG AACACGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTCTG CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGCGGCGGAG CCTATGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCTTTT
1861 GCTGGCTTTT TGCTACATG TTTCTTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCTTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGCG
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACCTATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATGCCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCTATAG
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG CGAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCTCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCAATG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGT TT
2821 TGGCACCAA ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTGTRATA ACCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGTCT TATATAAGCA GAGCTCGTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCATTA CACCCCGCT CCTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAATATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAAT CACATATACA ACAACCGCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGTAC GTGTTCGGT CATCGCTCT TCTCCGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

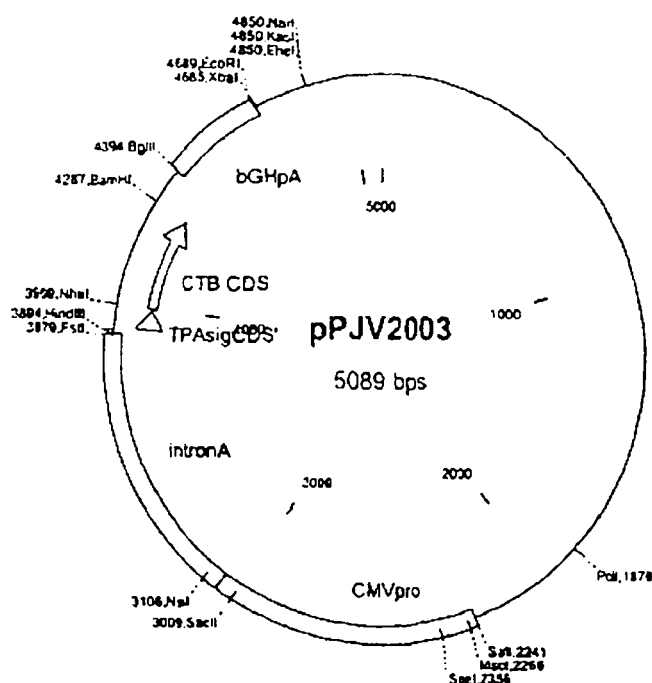
FIGURA 1-2

```

3661 GGCTCGCACC GTGAGGCAGA TGGAGACTTT AAGGCACCGG CAGAAGAAGA TCGAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA
4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC
4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG
4141 ATGATGGATA TGTTCACACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACTTAGTG GGTCAAACTA
4201 TATTGTCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA
4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCTGCTT
4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG
4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAGTAAC TTAGATATTG
4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GTTCCCTCC GGAGCATAGA GCTTGGAGGG
4501 AAGAGCCGTG GATTCATCAT GCACCCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4561 GTAATACTTG CGATGAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAA ATTCTTGAC GAATACCAAT
4621 CTAAGTTAA AAGACAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA
4681 TTAAGGATGA ATTATGAGGA TCCTCGCAAT CCCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT
4741 CACGCTCTTG TGAGGGACAG AAATACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA
4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT
4861 TGCCCTCCC CCGTGCCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCCTGT CTTTCTCTAA
4921 TAAAAAGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGTGGG
4981 GTGGGCGAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG
5041 CTGGGCTCTA TGGCTTCTGA GCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG
5101 AATTCACCTG CCGTGTGTTT ACAACGTCGT GACTGGGAAA ACCCTGGGCT TACCCAACCT
5161 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCTTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC
5221 GATCGCCCTT CCGAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GCGGCTGAT GCGGTATTTT
5281 CTCCTTACGC ATCTGTGCGG TATTTACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC
5341 TCTGATGCCG CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CCGCCCTGA
5401 CGGGCTTGTC TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CGGGAGCTGC
5461 ATGTGTCAGA GGTTCACACC GTCATCACCG AAACGCGCGA

```

FIGURA 1-3



Molécula: pPJV2003, 5089 pb, ADN circular

Nombre del archivo: pPJV2003.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
REGIÓN	2242	3060	CMVpro	
REGIÓN	3061	3884	Intrón A	
GEN	3906	3696	TPAsigCDS'	
GEN	3975	4286	CDS CTB	
REGION	4394	4690	bGHpA	

Enzimas (16 sitios)

PciI	1876,	SacII	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 CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61 CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCCGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCCTTCT GTTTTTTGCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCITGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAAGCTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCCTGC
421 TATGTGCGCG GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATICTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCACTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGGCGAAA CTATTAACTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG CGCGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGCGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACGTATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAGACTTC ATTTTAAATT TAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTCCGAGG GTAAGTGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGCTTTACCG
1501 GOTTGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACGGGGGTTT
1561 GGTGCACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCGCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTGG ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCTCG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGCGTTGCG
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCAT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCAATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CPTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATCA TATGCCAAGT CCGGCCCTCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACCG GACTTTCTTA CMTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTC
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GGCGGTGACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCACAGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGACCGTA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CQTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGGCTT GGGGCCATA CACCCCGCTC CCTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTC ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACCTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGCTCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACCA GGATGGGGTC CCATTATTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGGTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

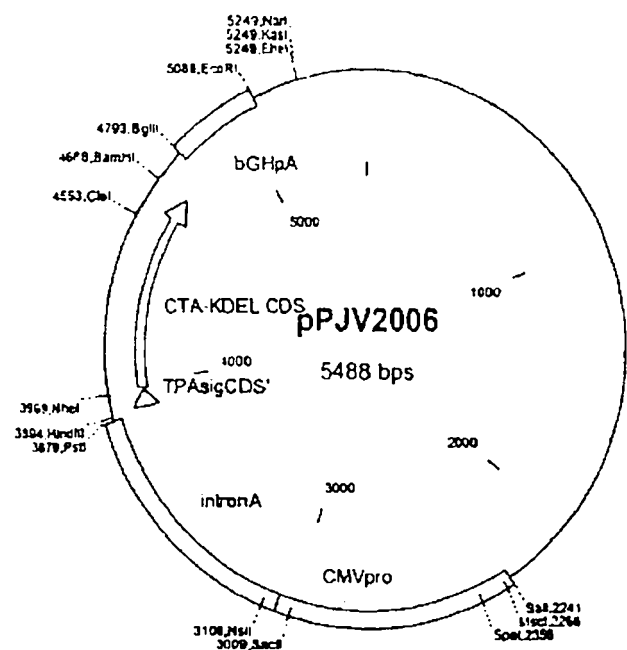
FIGURA 2-2

```

3661 GGCTCGCACC GTCGCGCAGA TGGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAGAGAGT TCGAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GCAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCACACCT CAAAATATTA CTGATTGTG TGCAGAATAC CACACACAC
4021 AAATATATAC GCTAAATGAT AAGATATTTT CGTATACAGA ATCTCTAGCT GGAAAAAGAG
4081 AGATGGCTAT CATTACTTTT AAGAATGGTG CAATTTTTC AGTAGAAGTA CCAGGTAGTC
4141 AACATATAGA TTCACAAAAA AAAGCGATTG AAAGGATGAA GGATACCTTG AGGATTGCAT
4201 ATCTTACTGA AGCTAAAGTC GAAAAGTTAT GTGTATGGAA TAATAAAACG CCTCATGCGA
4261 TTGCCGCAAT TAGTATGGCA AATTAAGGAT CCTCGCAATC CCTAGGAGGA TTAGGCAAGG
4321 GCTTGAGCTC ACGCTCTTGT GAOGGACAGA AATACAATCA GGGGCAGTAT ATGAATACTC
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
4441 TCTGTTGTTT GCCCCCTCCC CGTGCCCTTC TTGACCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTC
4501 CTTTCCTAAT AAAATGAGGA AATGTCATCG CATTGCTGTA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGACAGCT
4681 CGACTCTAGA ATTCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CCTTTCGCCA GCTCGCGTAA TAGCGAAGAG
4801 GCGCGCACCG ATCGCCTTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG
4861 CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACCC GCATATGGTG CACTCTCAGT
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
5041 GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGA

```

FIGURA 2-3



Molécula: pPJV2006, 5488 pb, ADN circular
Nombre del archivo: pPJV2006 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-KEDL	
REGION	4793	5089	bGHpA	

Enzimas (15 sitios)

SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356,	SacII	3009,
NsiI	3105,	PstI	3879,	HindIII	3894,	NheI	3969,
ClaI	4553,	BamHI	4698,	BglII	4796,	EcoRI	5088.

Figura 3-1


```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCG TGTCGCCCTT ATTCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCACTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGGCAAA CTATTAACTG
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGCAAC AATTAATAGA CTGGATGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTOTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGAATC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACCGGGGGTT
1561 CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTTGAG AAGCGCCACG CTTCCGGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGTAAGCG
1681 GCAGGGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGT CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTCTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCCCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACCTCAT AGGCACCCCA GGCCTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA TCTGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAAATG TAATCAATTA CGGGGTCAAT AGTTCAATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGTATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTTAT CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG CCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATGG ACGTCAATGG GAGTTTGTIT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAAAT ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCCTATA CACCCCGCT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTATTAT
3361 TTTACAAAT CACATATACA ACRAACCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGCTAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

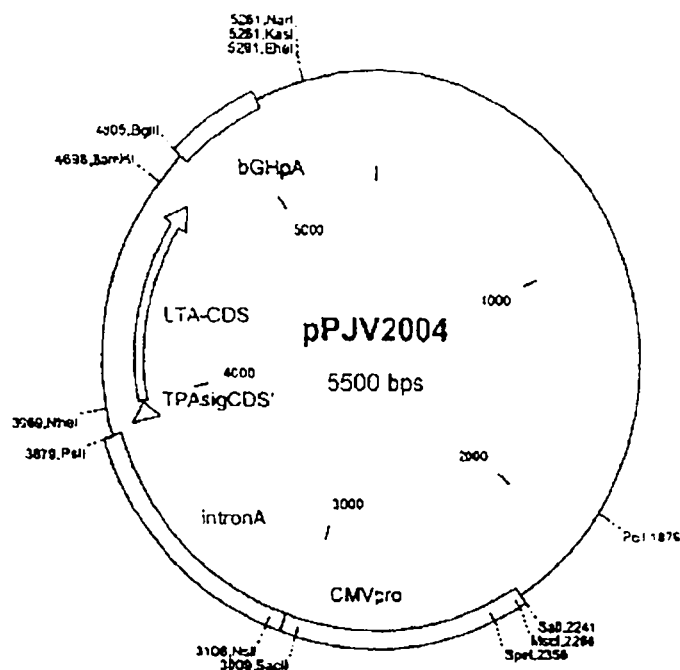
FIGURA 3-2

```

3661 CGCTCGCACC GTG   AGA TCGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAA _ _ G   GCAGGAGGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCCCG TTGCGGTGC _ TTACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATACC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGAT GATAAGTTAT ATCGGGCAGA TTCTAGACCT CCTGATGAAA
4021 TAAAGCAGTC AGGTGGTCTT ATGCCAAGAG GACAGAGTGA GTACTTTGAC CGAGGTACTC
4081 AAATGAATAT CAACCTTTAT GATCATGCAA GAGGAACTCA GACGGGATTT GTTAGGCACG
4141 ATGATGGATA TGTTTCCACC TCAATTAGTT TGAGAAGTGC CCACTTAGTG GGTCAAACCTA
4201 TATTGTCTGG TCATTCTACT TATTATATAT ATGTTATAGC CACTGCACCC AACATGTTTA
4261 ACGTTAATGA TGTATTAGGG GCATACAGTC CTCATCCAGA TGAACAAGAA GTTTCGTCTT
4321 TAGGTGGGAT TCCATACTCC CAAATATATG GATGGTATCG AGTTCATTTT GGGGTGCTTG
4381 ATGAACAATT ACATCGTAAT AGGGGCTACA GAGATAGATA TTACAATAAC TTAGATATTG
4441 CTCCAGCAGC AGATGGTTAT GGATTGGCAG GTTCCCTCC GAGCATAGA CCTTGGACCG
4501 AAGAGCCGTG GATTTCATCAT GCACCGCCGG GTTGTGGGAA TGCTCCAAGA TCATCGATGA
4561 GTAATACTTG CGATGAAAAA ACCCAAAGTC TAGGTGTAAG ATTCTTGAC GAATACCAAT
4621 CTAAAGTTAA AAGACAAATA TTTTCAGGCT ATCAATCTGA TATTGATACA CATAATAGAA
4681 TTTGAGGATC CTCGCAATCC CTAGGAGGAT TAGGCAAGGG CTGAGCTCA CGCTCTGTG
4741 AGGGACAGAA ATACAATCAG GGGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAAC CCAGATCTAC
4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCCC
4861 GTGCCTTCCT TGACCCCTGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCCTAATA AAATGAGGAA
4921 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCTAT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
5041 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCGACAGCTC GACTCTAGAA TTCACTGGCC
5101 GTCGTTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAC CCGGCGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
5161 GCACATCCCC CTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCCGCACCGA TCGCCCTTCC
5221 CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCTGATGC GGTATTTTCT CCTTACGCAT
5281 CTGTGCGGTA TTTACACCCG CATATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA
5341 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCGCCAACA CCGCTGACG CGCCCTGACG GGCTTGTCTG
5401 CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTGAGAGG
5461 TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGA

```

FIGURA 3-3



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)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	NheI	3969
BamHI	4698,	BglII	4805,	EhoI	5261,	KasI	5261

Figura 4-1

ES 2 332 261 T3

```

1   GACGAAAGGG CCTGGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTAA TGTCATGATA ATANTGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTIT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCGG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTGCTC ACCCAGAAAC CCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCTTGAGAG TTTCGCCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACITTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGAAG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTFTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGGCGCAA CTATTAACGT
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAAATAGA CTGGATGGAG GCGGATAAAG
841 TTGCAAGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATTGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTGAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACGTGATTA AGCATTGCTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTTAACGTGA GTTTTCGTTT CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 CCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCGCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCC GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACCTGGT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGTGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCGGGCTGA ACCGGGGGTT
1561 CGTGACACACA GCCCAGCTTG GACGACACCA ACTGACATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCGGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGGTCGGG AACAGGAGAG CGCACGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGTG CGGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGTA TGCTCGTCAG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAACC GCCTCTCCCC GCGCGTTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGCG AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACATTT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCGACATAA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCAATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAATAT GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACCACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTEACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCCGC
2641 TGOCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGAAT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTFT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTCGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGCGGTA GGCGGTGACG CTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCAGCTGTG TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCGGA TTCCCGGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGGCTT GGGCCCTATA CACCCCGCTC CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCCCTT AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGTGAC GTGTTCCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCCTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGTCCTTTG CTCCTAACAG TGGAGGCGAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACAC
3601 CAGTGTGCCG CACRAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

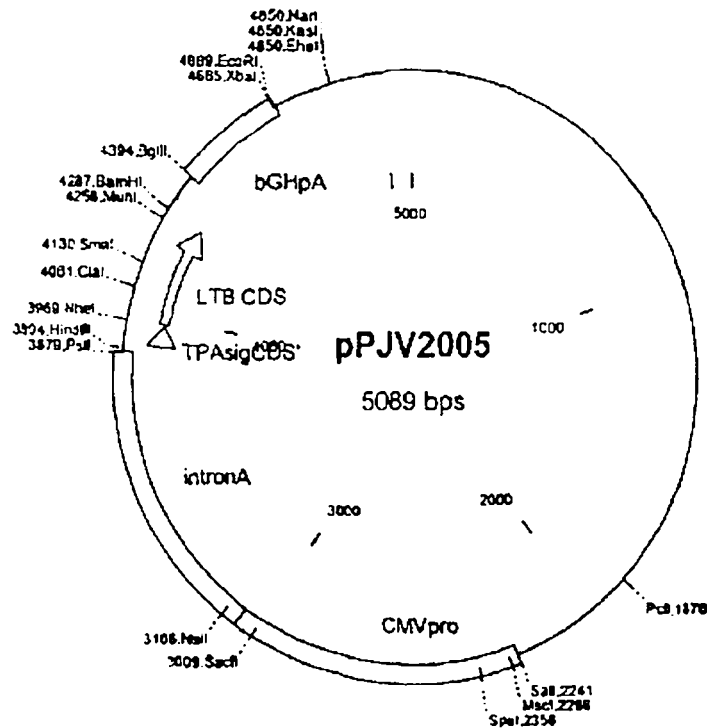
FIGURA 4-2

```

3661 GGCTCGGACC GTGACGCAGA TGGAACACTT AACGCAGCGG CAGARGAAGA TGCAGCCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGGC GACAAATTAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA
4021 TAAAACGTTT CGGAGGTCTT ATGCCCAGAG GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACTC
4081 AAATGAATAT TAATCTTTAT GATCACGCGA GAGGAACACA AACC GGCTTT GTCAGATATG
4141 ATGACGGATA TGTTTCCACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA
4201 TATTATCAGG ATATTCCACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGCACCA AATATGTTTA
4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACAGGAG GTTTCGTGCT
4321 TAGGTGGAAT ACCATATTCT CAGATATATG GATGGTATCG TGTAAATTTT GGTGTGATTG
4381 ATGAACGATT ACATCGTAAC AGGGAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG
4441 CTCCGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTTCACCAC GGATCACCAA GCTTGGAGAG
4501 AAGAACCTTG GATTCATCAT GCACCACAAG GTTGTGGAAT TTCATCAAGA ACAATTACAG
4561 GTGATACTTG TAATGAGGAG ACCCAGAATC TGAGCACAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT
4621 CAAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GGTGACATA TATAACAGAA
4681 TTCGGGATGA ATTATGAGGA TCCTCGCAAT CCTAGGAGG ATTAGGCAAG GGCTTGAGCT
4741 CACGCTCTTG TGAGGGACAG AAAIACAATC AGGGGCAGTA TATGAATACT CCATGGAGAA
4801 ACCCAGATCT ACGTATGATC AGCCTCGACT GTGCCTTCTA GTTGCCAGCC ATCTGTTGTT
4861 TGCCCTCCC CCGTGCTTC CTTGACCCTG GAAGGTGCCA CTCCCACTGT CCTTTCCTAA
4921 TAAAATGAGG AAATTGCATC GCATTGTCTG AGTAGGTGTC ATTCTATTCT GGGGGGTGGG
4981 GTGGGGCAGG ACAGCAAGGG GGAGGATTGG GAAGACAATA GCAGGCATGC TGGGGATGCG
5041 GTGGGCTCTA TGCTTCTGA GGCGGAAAGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC TCGACTCTAG
5101 AATTCACCTG CCGTCGTTTT ACAACGTCTG GACTGGGAAA ACCCTGGCGT TACCCAACCT
5161 AATCGCCTTG CAGCACATCC CCTTTTCGCC AGCTGGCGTA ATAGCGAAGA GGCCCGCACC
5221 GATCGCCCTT CCAACAGTT GCGCAGCCTG AATGGCGAAT GGCGCCTGAT GCGGTATTTT
5281 CTCTTAAGC ATCTGTGCGG TATTTACAC CGCATATGGT GCACTCTCAG TACAATCTGC
5341 TCTGATGCC CATAGTTAAG CCAGCCCCGA CACCCGCCAA CACCCGCTGA CGCGCCTGA
5401 CCGGCTTGTG TGCTCCCGGC ATCCGCTTAC AGACAAGCTG TGACCGTCTC CCGGAGCTGC
5461 ATGTGTCAGA GGTMTTCACC GTCATCACCG AAACGCGCGA

```

FIGURA 4-3



Molécula: pPJV2005. 5089 pb, ADN circular
Nombre del archivo: pPJV2005 cm5.
Descripción: Ligado del frag Nhe Bam de LTB 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	4286	CDS LTB	
REGION	4394	4690	bGHpA	

Enzimas (19 sitios)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	HindIII	3894
NheI	3969,	ClaI	4061,	SmaI	4130,	MunI	4258

Figura 5-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAAIGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAAATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCTTCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTGGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAAG
361 TCCTTGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCAATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGTCT CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAAACGATC GGAGGACCGA AGGAGCTAAC CGCTTTTTTG CACAACATGG
661 GGGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAACCG
721 ACCAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAAC GTTGCGCAAA CTATTAAGCTG
781 CCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG CGCGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTATTGGCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAAGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTGGTA ACTGTCAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAATT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTAAACGTGA GTTTTCGTTG CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTTGAGATCC TTTTTTCTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGCA AACAAAAAAA CCACCCCTAC CAGCGGTGGT TTGTTTGGCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTCCGAAG GTAACGGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTA GCCGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTTA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTCG TGTCTTACCG
1501 GGTGGGACTC AAGACGATAG TTACCGGATA AGGCGCAGCG GTCCGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCCCGAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAAGCG
1681 GCAGCGTCGG AACAGGAGAG CGCAGGAGGG AGCTTCCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCCGTG CCGGTTTCGC CACCTCTGAC TTGAGCGTCG ATTTTGTGA TGCTCGTCAG
1801 GGGGCGGAG CCTATGAAA AACGCCAGCA ACGCGCCTT TTACGGTTC TGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTACATG TTCTTCTCTG CGTTATCCCC TGATTCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCCCTC GCCGCAGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 TACGTAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC CGCGTTGGC
2041 CGATTTCATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTCAAGCGCA
2101 ACGCAATTAA YGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTTGTAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAGCTA GTCGACATA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCATACG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CGGGGTCATT AGTTCATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCCCGCCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATATCA TATGCCAAGT CCGGCCCTCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCTTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGGTTTGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTIT
2821 TGGCACCAAA ATCAACGGGA CTTTCCAAAA TGTGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GGCGGTGACG GTGGGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC GCGGCCGGGA ACGGTGCAAT GGAACGCGGA TTCCCGTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCTT CTTATGCTA TAGGTGATGG TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTTATPG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGGTC CCATTTATTA
3361 TTTACAAATT CACATATACA ACAACGCCGT CCCCCGTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGGGAA TCTCGGGTAC GTGTTCGGGA CATGGGCTCT TCTCCGTTAG
3481 CGGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCTCTC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCCTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTGCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

FIGURA 5-2

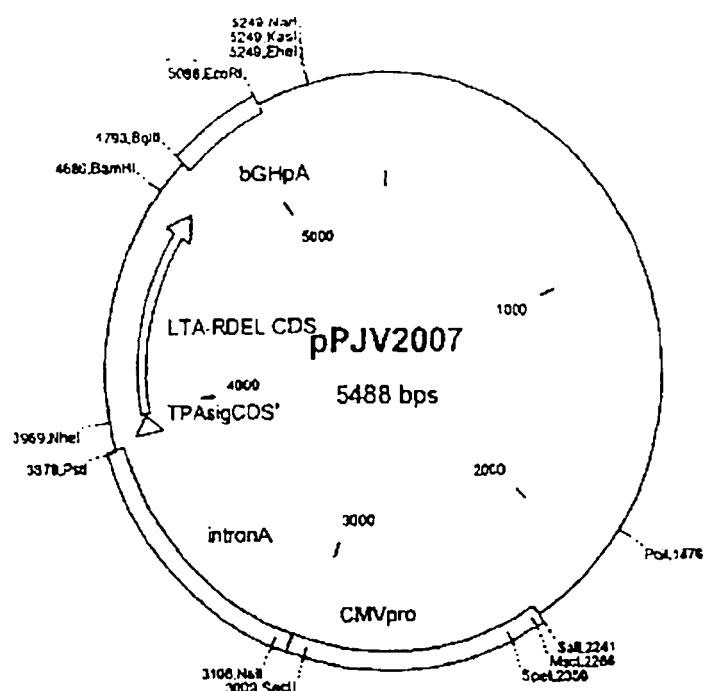
ES 2 332 261 T3

```

3661 GGCTCGCACC JTGAAGCAGA TGGAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAAGAGBA TCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GC3CCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCGCTCCC CAGTCTATTA CAGAACTATG TTCGGAATAT CGCAACACAC
4021 AAATATATAC GATAAATGAC AAGATACTAT CATATACGA ATCGATGGCA GGCAAAAGAG
4081 AAATGGTTAT CATTACATT AAGAGCGGCG CAACATTTCA GGTGGAAGTC CCGGGCAGTC
4141 AACATATAGA CTCCCAAAA AAAGCCATTG AAAGGATGAA GGACACATTA AGAATCACAT
4201 ATCTGACCGA GACCAAAATT GATAAATTAT GTGTATGGAA TAATAAAACC CCAATTCAA
4261 TTGCGGCAAT CAGTATGGAA AACTAGGGAT CCTCGCAATC CTTAGGAGGA TTAGGCAAGG
4321 GCTTGAGCTC ACGCTCTTGT GAGGGACAGA AATACAATCA GGGGCAGTAT ATGAATACTC
4381 CATGGAGAAA CCCAGATCTA CGTATGATCA GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA
4441 TCTGTTGTTT GCCCCCTCCC CGTGCCCTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCACTGTC
4501 CTTTCTAAT AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
4561 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG CAGGCATGCT
4621 GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA CCAGCTGGGG CTCGACAGCT
4681 CGACTCTAGA ATTCACTGGC CGTCGTTTTA CAACGTCGTG ACTGGGAAAA CCCTGGCGTT
4741 ACCCAACTTA ATCGCCTTGC AGCACATCCC CTTTCGCCA GCTGGCGTAA TAGCGAAGAG
4801 GCCCGCACCG ATCGCCCTTC CCAACAGTTG CGCAGCCTGA ATGGCGAATG GCGCCTGATG
4861 CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTCACACC GCATATGGTG CACTCTCAGT
4921 ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC ACCCGCTGAC
4981 GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT GACCGTCTCC
5041 GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACOGA AACGCGCGA

```

FIGURA 5-3



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-KEDL	
REGION	4793	5089	bGHpA	

Enzimas (14 sitios)

PciI	1876,	SalI	2241,	MscI	2266,	SpeI	2356
SacII	3009,	NsiI	3106,	PstI	3879,	NheI	3969
BamHI	4686,	BglII	4793,	EcoRI	5008,	EhoI	5249

Figura 6-1

```

1   GACGAAAGGG CCTCGTGATA CGCCTATTTT TATAGGTTAA TGTCATGATA ATAATGGTTT
61  CTTAGACGTC AGGTGGCACT TTTCGGGGAA ATGTGCGCGG AACCCCTATT TGTTTATTTT
121 TCTAAATACA TTCAAATATG TATCCGCTCA TGAGACAATA ACCCTGATAA ATGCTTCAAT
181 AATATTGAAA AAGGAAGAGT ATGAGTATTC AACATTTCCG TGTCGCCCTT ATTCCCTTTT
241 TTGCGGCATT TTGCCITCCT GTTTTGTCTC ACCCAGAAAC GCTCGTGAAA GTAAAAGATG
301 CTGAAGATCA GTTGGGTGCA CGAGTGGGTT ACATCGAACT GGATCTCAAC AGCGGTAAGA
361 TCCITGAGAG TTTTCGCCCC GAAGAACGTT TTCCATGAT GAGCACTTTT AAAGTTCTGC
421 TATGTGGCGC GGTATTATCC CGTATTGACG CCGGGCAAGA GCAACTCGGT CGCCGCATAC
481 ACTATTCTCA GAATGACTTG GTTGAGTACT CACCAGTCAC AGAAAAGCAT CTTACGGATG
541 GCATGACAGT AAGAGAATTA TGCAGTGCTG CCATAACCAT GAGTGATAAC ACTGCGGCCA
601 ACTTACTTCT GACAACGATC GGAGGACCBA AGGAGCTAAC CGCTTTTTCG CACAACATGG
661 GCGATCATGT AACTCGCCTT GATCGTTGGG AACCGGAGCT GAATGAAGCC ATACCAAACG
721 ACGAGCGTGA CACCACGATG CCTGTAGCAA TGGCAACAC ACCTTAACTG GTTGCGCAAA
781 GCGAACTACT TACTCTAGCT TCCCGGCAAC AATTAATAGA CTGGATGGAG CCGGATAAAG
841 TTGCAGGACC ACTTCTGCGC TCGGCCCTTC CGGCTGGCTG GTTTATGTCT GATAAATCTG
901 GAGCCGGTGA GCGTGGGTCT CGCGGTATCA TTGCAGCACT GGGGCCAGAT GGTAAGCCCT
961 CCCGTATCGT AGTTATCTAC ACGACGGGGA GTCAGGCAAC TATGGATGAA CGAAATAGAC
1021 AGATCGCTGA GATAGGTGCC TCACTGATTA AGCATTTGGA ACTGTGAGAC CAAGTTTACT
1081 CATATATACT TTAGATTGAT TTAAAACTTC ATTTTAAAT TAAAAGGATC TAGGTGAAGA
1141 TCCTTTTGA TAATCTCATG ACCAAAATCC CTAAACGTGA GTTTTCTGTC CACTGAGCGT
1201 CAGACCCCGT AGAAAAGATC AAAGGATCTT CTGAGATCC TTTTTCGTG CGCGTAATCT
1261 GCTGCTTGA AACAATAAAA CCACCGCTAC CAGCGTGGT TTGTTTCCG GATCAAGAGC
1321 TACCAACTCT TTTTCCGAAG GTAACGTGCT TCAGCAGAGC GCAGATACCA AATACTGTCC
1381 TTCTAGTGTG GCGGTAGTTA GGCCACCACT TCAAGAACTC TGTAGCACCG CCTACATACC
1441 TCGCTCTGCT AATCCTGTGA CCAGTGGCTG CTGCCAGTGG CGATAAGTGC TGTCTTACCG
1501 GGTGGACTC AAGACGATAG TTACGGGATA AGGCGCAGCG GTCCGGCTGA ACGGGGGGTT
1561 CGTGACACCA GCCCAGCTTG GAGCGAACGA CCTACACCGA ACTGAGATAC CTACAGCGTG
1621 AGCATTGAGA AAGCGCCACG CTTCGCCAAG GGAGAAAGGC GGACAGGTAT CCGGTAGCGG
1681 GCAGGGTCCG AACAGGAGAG CGCAGCAGGG AGCTTCAGG GGGAAACGCC TGGTATCTTT
1741 ATAGTCTGTG CGGGTTCCG CACCTCTGAC TTGACCGTGC ATTTTGTGA TGGTCTGACG
1801 GGGGGCGGAG CCTATGGAAA AACGCCAGCA ACGCGGCTT TTTACGGTTC CTGGCCTTTT
1861 GCTGGCCTTT TGCTCACATG TTCTTTCTG CGTTATCCCC TGATCTGTG GATAACCGTA
1921 TTACCGCCTT TGAGTGAGCT GATACCGCTC GCCGCGCCG AACGACCGAG CGCAGCGAGT
1981 CAGTGAGCGA GGAAGCGGAA GAGCGCCCAA TACGCAAAAC GCCTCTCCCC GCGGTGTGGC
2041 CGATTCAATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA
2101 ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC
2161 CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG
2221 ACCATGATTA CGCCAAGCTA GTCAGACATA ATCAATATTG GCTATTGGCC ATTGCAATCG
2281 TTGTATCTAT ATCATAATAT GTACATTTAT ATTGGCTCAT GTCCAATATG ACCGCCATGT
2341 TGACATTGAT TATTGACTAG TTATTAATAG TAATCAATTA CCGGGTCAAT AGTTCAATAGC
2401 CCATATATGG AGTTCCGCGT TACATAACTT ACGGTAAATG GCGCCGCTCG TGACCGCCCA
2461 ACGACCCCGG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC CATAGTAACG CCAATAGGGA
2521 CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT TACGGTAATC TGCCCACTTG GCAGTACATC
2581 AAGTGATCA TATGCCAAGT CCGGCCCCCT ATTGACGTCA ATGACGGTAA ATGGCCCGCC
2641 TGGCATTATG CCCAGTACAT GACCTTACGG GACTTTCCTA CTTGGCAGTA CATCTACGTA
2701 TTAGTCATCG CTATTACCAT GGTGATGCGG TTTTGGCAGT ACACCAATGG GCGTGGATAG
2761 CGTTTGGACT CACGGGGATT TCCAAGTCTC CACCCCATTG ACGTCAATGG GAGTTTGTTT
2821 TGGCACCAA ATCAACGGGA CTTTCCAAA TGTGTAATA ACCCCGCCCC GTTGACGCAA
2881 ATGGGCGGTA GCGGTGTACG GTGOGAGGTC TATATAAGCA GAGCTCGTTT AGTGAACCGT
2941 CAGATCGCCT GGAGACGCCA TCCACGCTGT TTTGACCTCC ATAGAAGACA CCGGGACCGA
3001 TCCAGCCTCC CCGGCCGGGA ACGGTGCATT GGAACGCCA TTCCCGCTGC CAAGAGTGAC
3061 GTAAGTACCG CCTATAGACT CTATAGGCAC ACCCCTTTGG CTCTTATGCA TGCTATACTG
3121 TTTTGGCTT GGGGCCTATA CACCCCGCT CTTTATGCTA TAGGTGATGO TATAGCTTAG
3181 CCTATAGGTG TGGGTATTG ACCATTATTG ACCACTCCCC TATTGGTGAC GATACTTTCC
3241 ATTACTAATC CATAACATGG CTCTTTGCCA CAACTATCTC TATTGGCTAT ATGCCAATAC
3301 TCTGTCTTC AGAGACTGAC ACGGACTCTG TATTTTACA GGATGGGTG CCATTATTA
3361 TTTACAAAT CACATATACA ACAACGCGT CCCCCTGCC CGCAGTTTTT ATTAACATA
3421 GCGTGGGATC TCCACGCGAA TCTCGGTGAC GTGTTCGGA CATGGGCTCT TCTCCGGTAG
3481 CGCGGAGCT TCCACATCCG AGCCCTGGTC CCATGCTTCC AGCGGCTCAT GGTGCTCGG
3541 CAGCTCCTTG CTCTTAACAG TGGAGGCCAG ACTTAGGCAC AGCACAATGC CCACCACCAC
3601 CAGTGTCCCG CACAAGGCCG TGGCGGTAGG GTATGTGTCT GAAAATGAGC TCGGAGATTG

```

FIGURA 6-2

ES 2 332 261 T3

```

3661 GGCTCGCACC GTGAGGCAGA TGGAAAGACTT AAGGCAGCGG CAGAGAGAGCA TGCAGGCAGC
3721 TGAGTTGTTG TATTCTGATA AGAGTCAGAG GTAACCTCCG TTGCGGTGCT GTTAACGGTG
3781 GAGGGCAGTG TAGTCTGAGC AGTACTCGTT GCTGCCGCGC GCGCCACCAG ACATAATAGC
3841 TGACAGACTA ACAGACTGTT CCTTTCATG GGTCTTTTCT GCAGTCACCG TCCAAGCTTG
3901 CAATCATGGA TGCAATGAAG AGAGGGCTCT GCTGTGTGCT GCTGCTGTGT GGAGCAGTCT
3961 TCGTTTCGGC TAGCAATGGC GACAAATTAT ACCGTGCTGA CTCTAGACCC CCAGATGAAA
4021 TAAAACGTTT CCGAGGTCTT ATGCCCAGAT GGCATAATGA GTACTTCGAT AGAGGAACTC
4081 AAATGAATAT TAATCTTTAT GATCACGCGA GAGGAACACA AACC GGCTTT GTGAGATATG
4141 ATGACGGATA TGTTCCTACT TCTCTTAGTT TGAGAAGTGC TCACTTAGCA GGACAGTCTA
4201 TATTATCAGG ATATTCCACT TACTATATAT ATGTTATAGC GACAGCACCA AATATGTTTA
4261 ATGTTAATGA TGTATTAGGC GTATACAGCC CTCACCCATA TGAACACGAG GTTTCTGCGT
4321 TAGGTGGAAT ACCCATATTCT CAGATATATG GATGGTATCG TGTTAATTTT GGTGTGATTG
4381 ATGAACGATT ACATCGTAAC AGGGAATATA GAGACCGGTA TTACAGAAAT CTGAATATAG
4441 CTCCGGCAGA GGATGGTTAC AGATTAGCAG GTTTCACCAC GGATCACCAA GCTTGGAGAG
4501 AAGAACCCCTG GATTTCATCAT GCACCACAAG GTTGTGGAAT TTCATCAAGA ACAATTACAG
4561 GTGATACTTG TAATGAGGAG ACCCAGAATC TGAGCACAAT ATATCTCAGG AAATATCAAT
4621 CAAAAGTTAA GAGGCAGATA TTTTCAGACT ATCAGTCAGA GGTGACATA TATAACAGAA
4681 TTTGAGGATC CTCGCAATCC CTAGGAGGAT TAGGCAAGGG CTGAGCTCA CGCTCTGTG
4741 AGGGCAGAA ATACAATCAG GGCAGTATA TGAATACTCC ATGGAGAAAC CCAGATCTAC
4801 GTATGATCAG CCTCGACTGT GCCTTCTAGT TGCCAGCCAT CTGTTGTTTG CCCCTCCCC
4861 GTGCCCTTCT TGACCTGGA AGGTGCCACT CCCACTGTCC TTTCTAATA AAATGAGGAA
4921 ATTGCATCGC ATTGTCTGAG TAGGTGTCTT TCTATTCTGG GGGGTGGGGT GGGGCAGGAC
4981 AGCAAGGGGG AGGATTGGGA AGACAATAGC AGGCATGCTG GGGATGCGGT GGGCTCTATG
5041 GCTTCTGAGG CGGAAAGAAC CAGCTGGGGC TCGACAGCTC GACTCTAGAA TTCCTGGCC
5101 GTCGTTTAC AACGTCGTGA CTGGGAAAC CCTGGGTTA CCCAACTTAA TCGCCTTGCA
5161 GCACATCCCC CTTTCGCCAG CTGGCGTAAT AGCGAAGAGG CCGCACCAGA TCGCCCTTCC
5221 CAACAGTTGC GCAGCCTGAA TGGCGAATGG CGCCTGATGC GGTATTTTCT CTTTACGCAT
5281 CTGTGCGGTA TTTACACCCG CATATGGTGC ACTCTCAGTA CAATCTGCTC TGATGCCGCA
5341 TAGTTAAGCC AGCCCCGACA CCCGCCAACA CCCGCTGACG CGCCTGACG GGCTTGTCTG
5401 CTCCCGGCAT CCGCTTACAG ACAAGCTGTG ACCGTCTCCG GGAGCTGCAT GTGTCAGAGG
5461 TTTTCACCGT CATCACCGAA ACGCGCGA

```

FIGURA 6-3

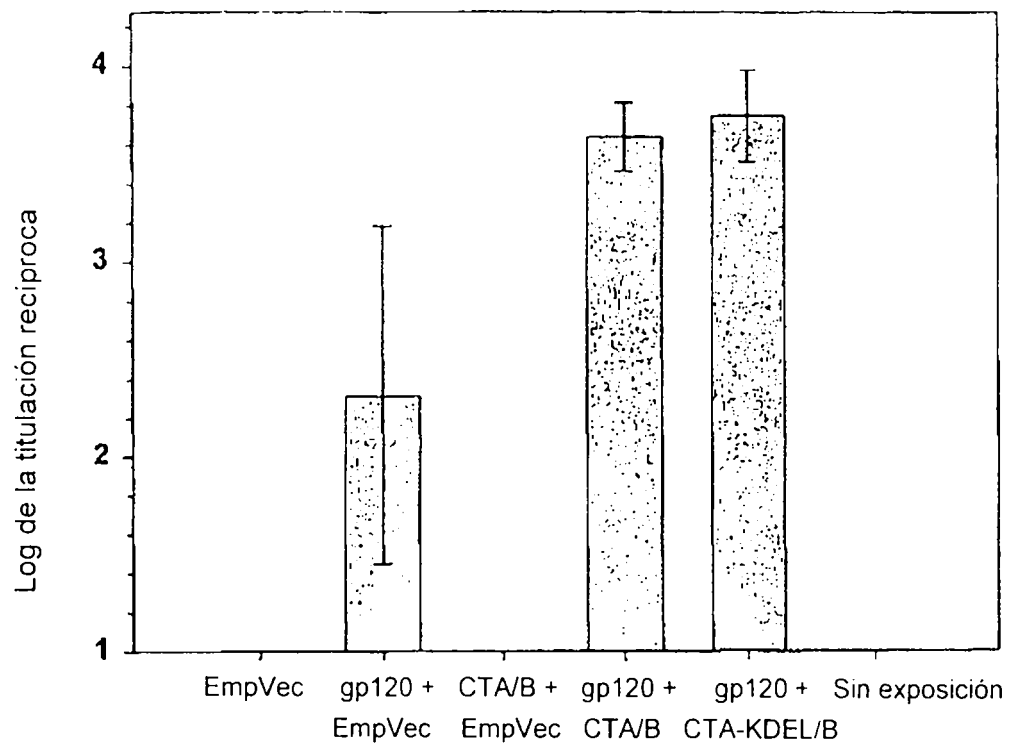


Figura 7

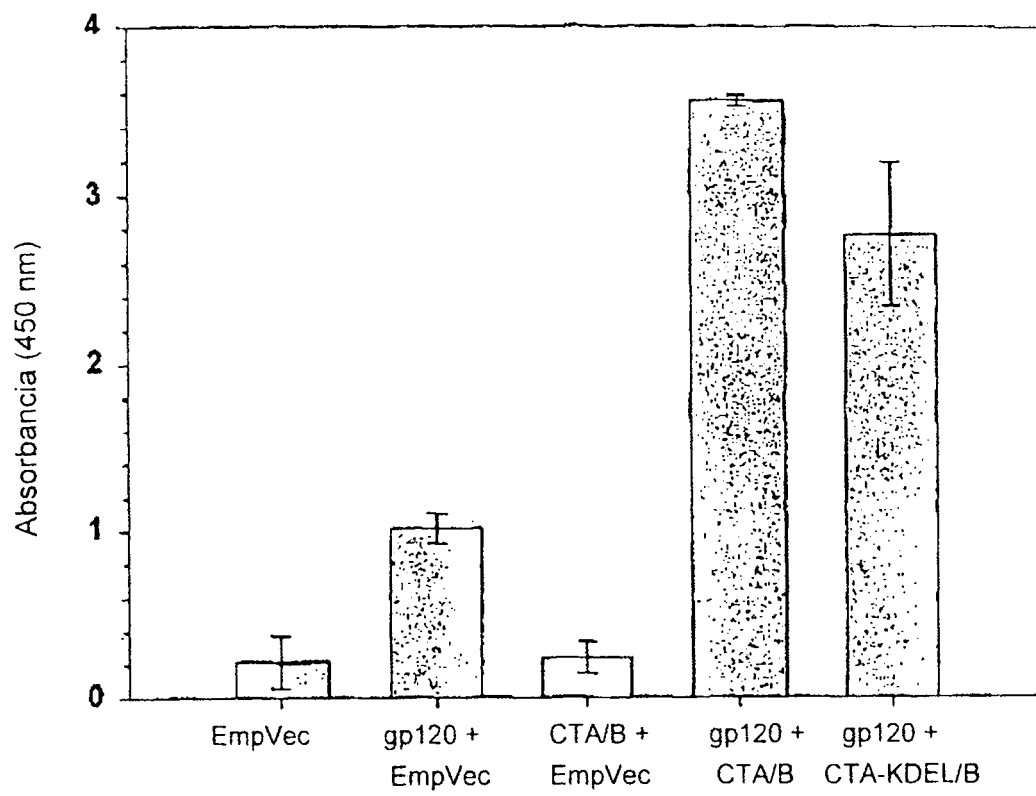


Figura 8

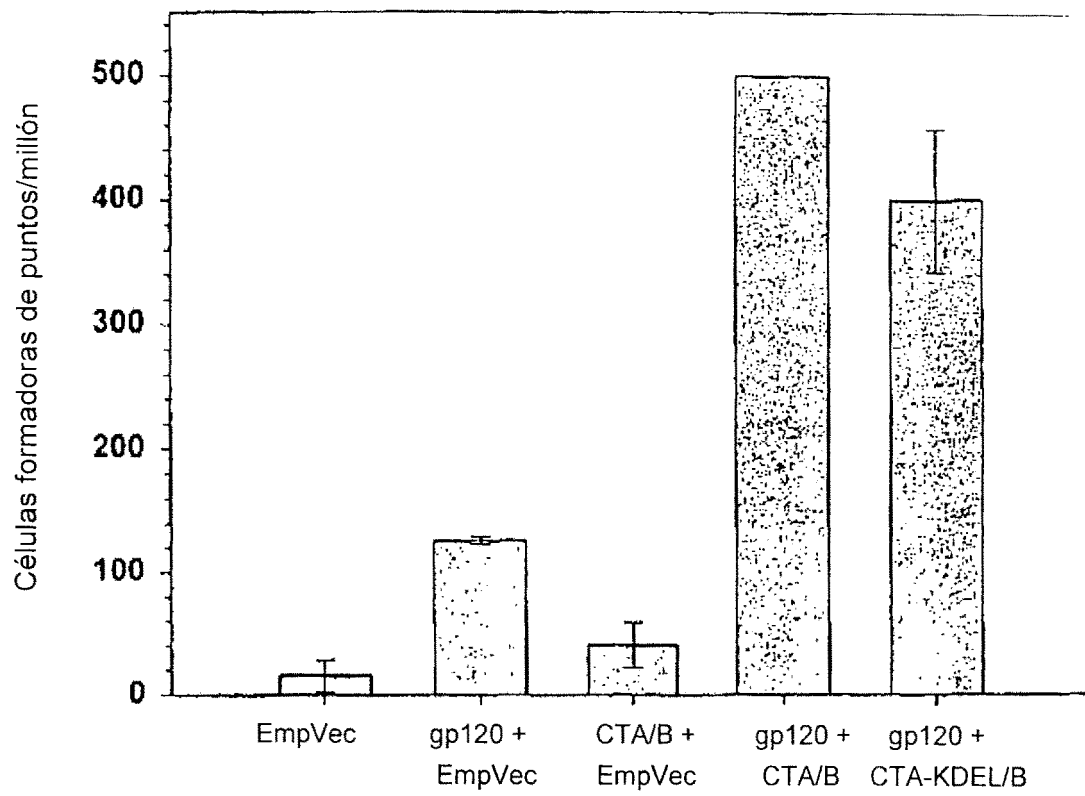


Figura 9

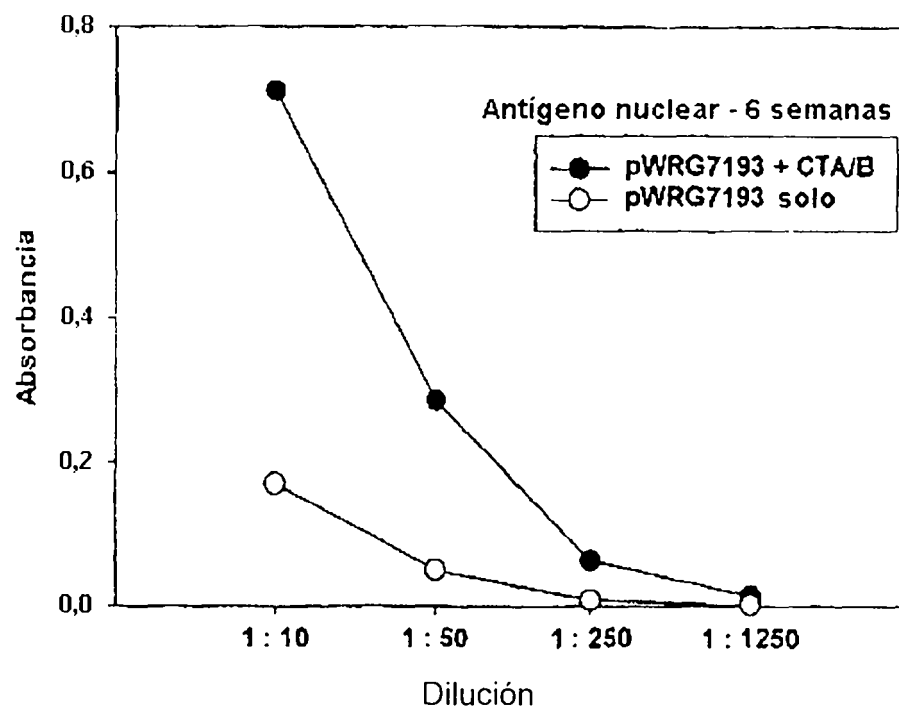


Figura 10

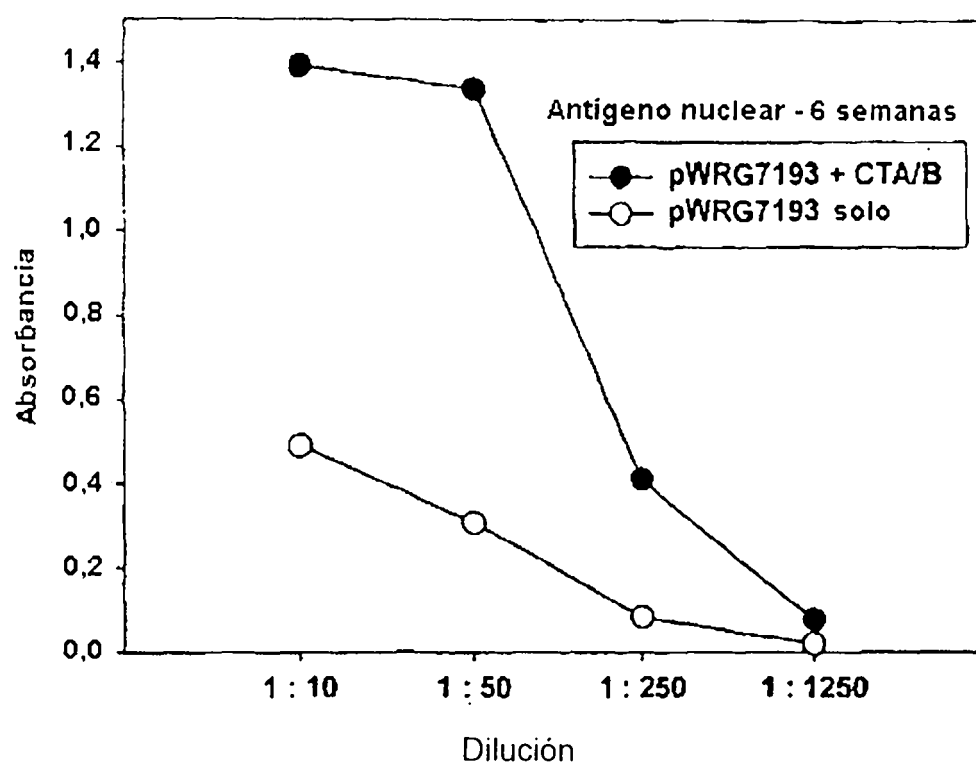


Figura 11

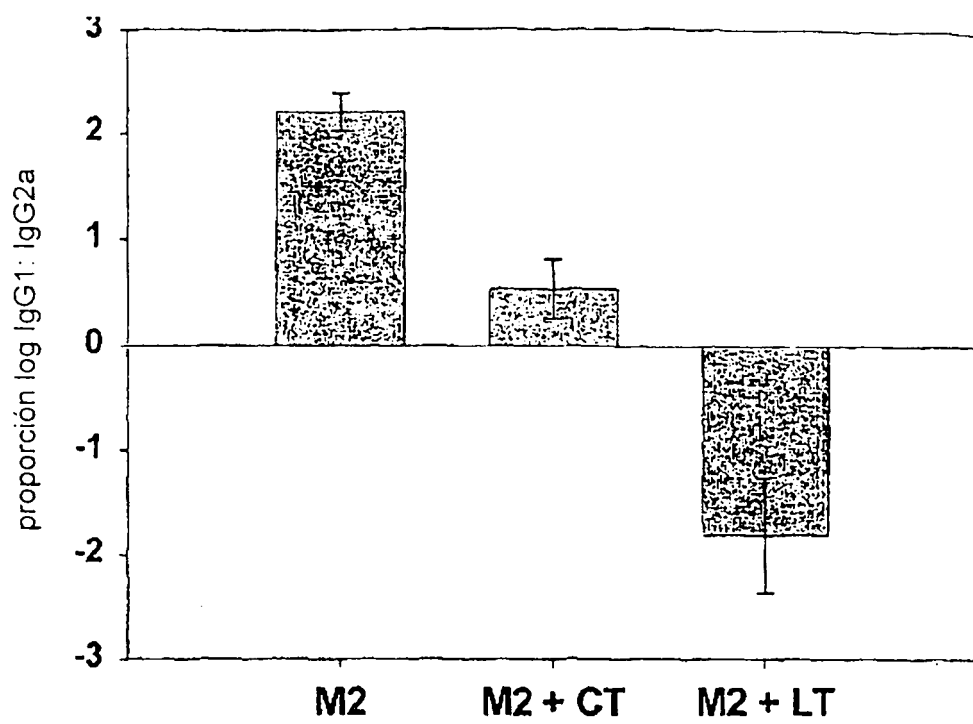
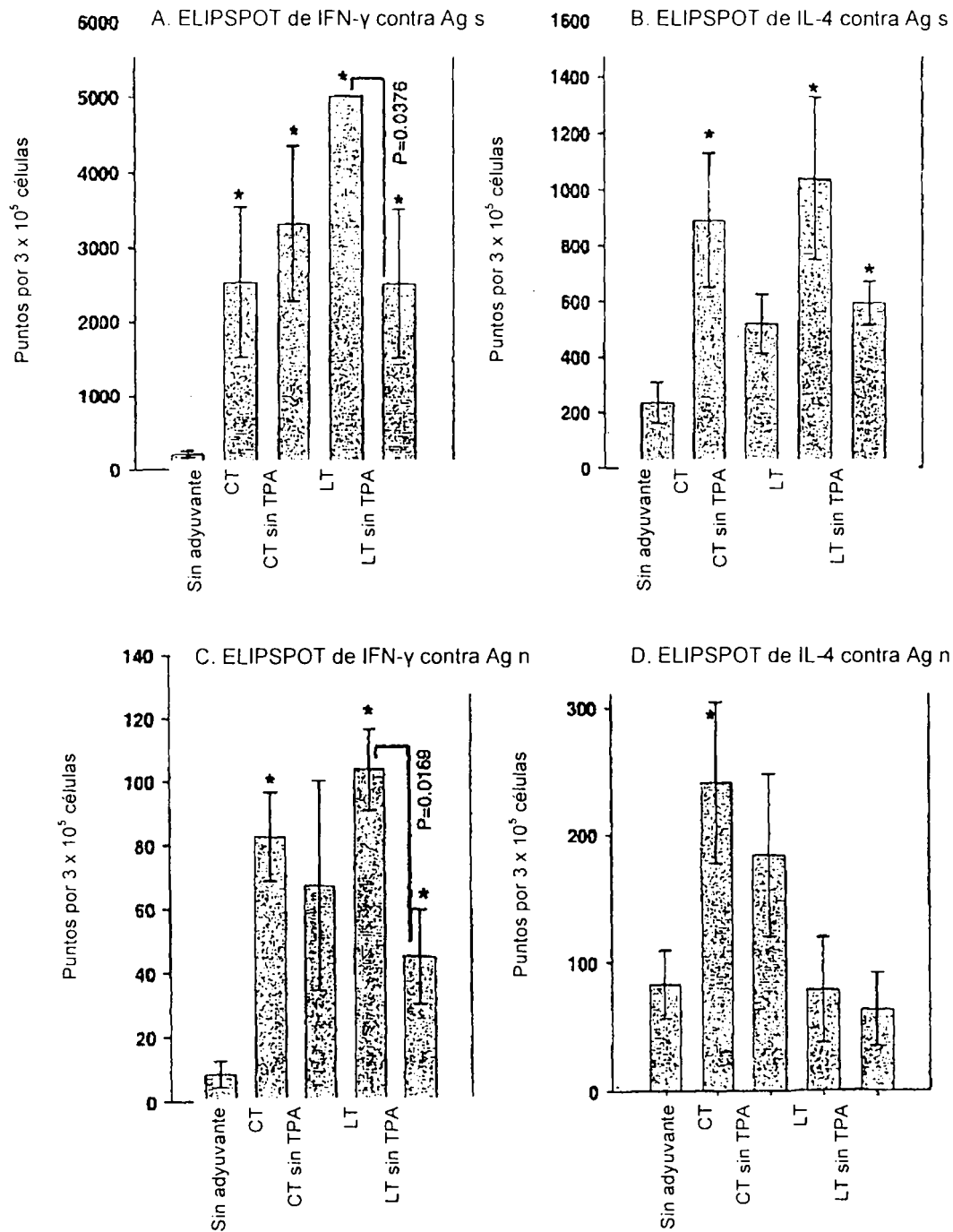


Figura 12



FIGURAS 13A-13D

Protección contra la exposición a HSV-2 en ratones

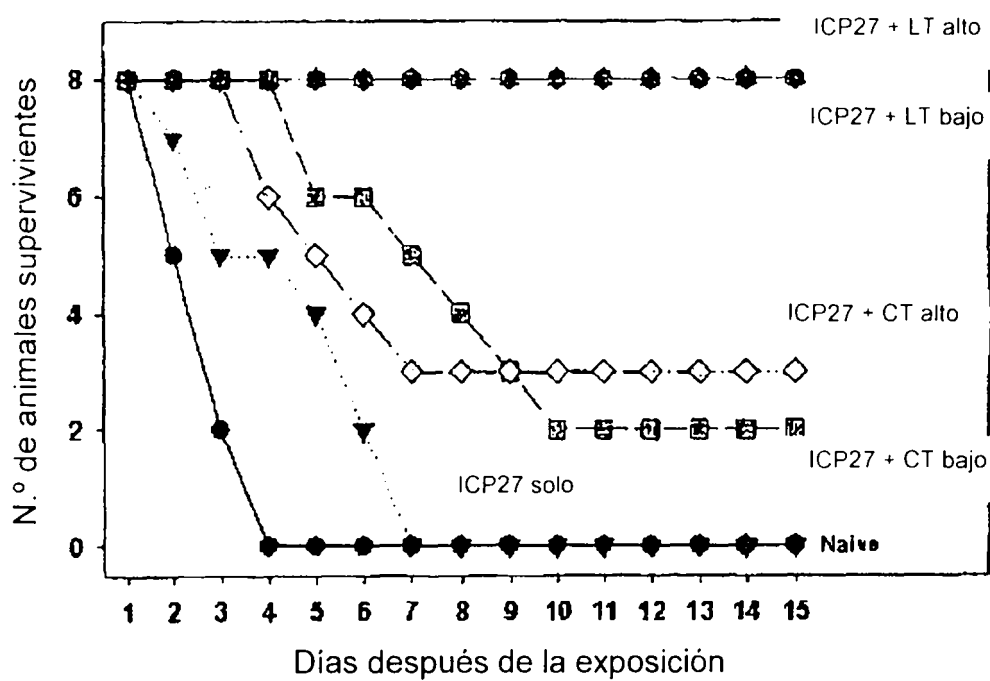


FIGURA 14

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
 <210> 1
 15 <211> 5500
 <212> ADN
 <213> plásmido pPJV2002
 20 <400> 1

25	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatatt	tataggttaa	tgatcatgata	ataatgggtt	60
	cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccctatt	tgtttatatt	120
	tctaaataca	ttcaaatatg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
	aatataggaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgctgcacct	attccctttt	240
	ttgcggcatt	ttgccttcct	gtttttgctc	acccagaaac	gctgggtgaa	gtaaaagatg	300
	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaact	ggatctcaac	agcggtaaga	360
	tccttgagag	ttttcgcccc	gaagaacggt	ttccaatgat	gagcactttt	aaagtctctg	420
30	tatgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	cggggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	480
	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacgggatg	540
	gcatgacagt	aagagaatta	tgcagtgtcg	ccataaccat	gagtgataac	actgcggcca	600
	acttacttct	gacaacgacg	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
	gggatcatgt	aactcgcctt	gatcgttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
35	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcgaa	ctattaactg	780
	gcgaactact	tactctagct	tcccggcaac	aattaataga	ctggatggag	gcggtataag	840
	ttgcaggacc	acttctgcgc	tcggcccttc	cggctggctg	gtttatttgc	gataaatctg	900
	gagccggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	960
	cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
40	agatcgctga	gataggtgcc	tcactgatta	agcattggta	actgtcagac	caagtttact	1080
	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
	tcctttttga	taatctcatg	accaaaatcc	cttaacgtga	gttttcgttc	cactgagcgt	1200
	cagaccccg	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaattc	1260
	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcggtggt	ttgtttgccg	gatcaagagc	1320
45	taccaactct	ttttccgaag	gtaactggct	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	ctacataacc	1440
	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
50	agcattgaga	aagcggccag	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	ccggtaagcg	1680
	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740
	atagtctctg	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atttttgtga	tgctcgtcag	1800
	gggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1860

55

60

65

ES 2 332 261 T3

	getggccttt	tgetcacatg	ttctttctctg	cggttatcccc	tgattctctg	gataaacgta	1920
	ttaccgcctt	tgagtgaagt	gataccgctc	gocgcagccg	aacgaccgag	cgcagcgagt	1980
	cagtgagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttgge	2040
	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
5	acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgcttc	2160
	cggtcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
	accatgatta	cgccaagcta	gtcgacataa	atcaatattg	gctattggcc	attgcatacg	2280
	ttgtatctat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
	tgacattgat	tattgactag	ltattaatag	taatcaatta	cggggctcatt	agttcatagc	2400
10	ccatatatgg	agttccgcgt	tacataaact	acggtaaatg	gcccgcctcg	tgaccgcccc	2460
	acgacccccg	cccattgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
	ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtaacat	2580
	aagtgtatca	tatgccaggt	ccggccccc	attgacgtca	atgacggtaa	atgcccgcgc	2640
	tggcattatg	cccagtagat	gacctaacgg	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	2700
15	ttagtcacgc	ctallaccat	ggtagtgagg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	cacccatttg	acgtcaatgg	gagtttggtt	2820
	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgctcgtaata	accccgcgcc	gttgacgcaa	2880
	atgggcggga	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatataagca	gagctcgttt	agtgaaccgt	2940
	cagatgcctc	ggagacgcca	tccacgttgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccga	3000
20	teccagctcc	gcggccggga	acgggtgcatt	gggaacgcgga	ttcccgcgtg	caagagtga	3060
	gtaagtaccg	cctatagact	ctataggcac	acccctttgg	ctcttatgca	tgctatactg	3120
	tttttggctt	ggggcctata	caccccgctt	ccttatgcta	taggtgatgg	tatagcttag	3180
	cctatagggtg	tgggttattg	accattattg	accactcccc	tattgggtgac	gatactttcc	3240
	attactaatc	cataacatgg	ctctttgcca	caactatctc	tattggctat	atgccaatat	3300
25	tctgtccttc	agagactgac	acggactctg	tatttttaca	ggatgggggtc	ccattttatta	3360
	tttacaanatt	cacatatata	acaacgcctg	ccccgcgtgc	cgcagttttt	attaaacata	3420
	gcgtgggacg	tccacgcgaa	tctcgggtac	gtgttccgga	catgggctct	tctccggtag	3480
	cggcggagct	tccacatccg	agccctggtc	ccatgcctcc	agcggctcat	ggctcgtcgg	3540
	cagctccttg	ctcctaacag	tggaggccag	acttaggcac	agcacaatgc	ccaccaccac	3600
30	cagtggtgccg	cacaaggccg	tggcggtagg	gtatgtgtct	gaaaatgagc	tcggagattg	3660
	ggctcgcacc	gtgacgcaga	tgggaagactt	aaggcagcgg	cagaagaaga	tgacggcagc	3720
	tgagttgttg	tattctgata	agagtcagag	gtaactcccc	ttgcgggtgct	gttaacgggtg	3780
	gagggcaattg	tagtctgagc	agtactcgtt	gctgccgcgc	gcgccaccag	acataattgc	3840
	tgacagacta	acagactgtt	cttttccatg	ggctctttct	gcagtcaccg	tccaagcttg	3900
35	caatcatgga	tgcaatgaag	agagggctct	gctgtgtgt	gctgtgtgt	ggagcagctc	3960
	tctgtttcggc	tagcaatgat	gataagttat	atcgggcaga	ttctagacct	cctgatgaaa	4020
	taaagcagtc	aggtggtctt	atgccaaagag	gacagagtga	gtactttgac	cgaggtactc	4080
	aaatgaatat	caacctttat	gatcatgcaa	gaggaactca	gacgggattt	gttaggcacg	4140
	atgatggata	tgtttccacc	tcaattagtt	tgagaagtgc	ccacttagtg	ggtaaacata	4200
40	tattgtctgg	tacttctact	tcatatata	atgttatagc	cactgcacc	acatagttta	4260
	acgttaatga	tgtattaggg	gcatacagtc	ctcatccaga	tgaacaagaa	gtttctgctt	4320
	taggtgggat	tccatactcc	caaatatatg	gatggtatcg	agttcatttt	gggggtgctt	4380
	atgaacaatt	acatcgtaat	aggggctaca	gagatagata	ttacagtaac	ttagatattg	4440
	ctccagcagc	agatggttat	ggattggcag	gtttccctcc	ggagcataga	gcttggaggg	4500
45	aagagccgtg	gattcatcat	gcaccgcggg	gttgtgggaa	tgtcccaaga	tcatcgatga	4560
	gtaatacttg	cgatgaaaaa	acccaaagtc	taggtgtaaa	attccttgac	gaataaccaat	4620
	ctaaagttaa	aagacaaata	ttttcaggct	atcaatctga	tattgatata	cataatagaa	4680
	ttaaggatga	attatgagga	tcttcgcaat	ccctaggagg	attaggcaag	ggcttgagct	4740
	cacgctcttg	tgagggacag	aaatacaatc	aggggcagta	tatgaatact	ccatggagaa	4800
50	accagatct	acgtatgatc	agcctcgact	gtgccttcta	gttgccagcc	atctgttgtt	4860
	tgccccctcc	ccgtgccttc	cttgacctcg	gaagggtgcca	ctcccactgt	cctttcctaa	4920
	taaaatgagg	aaattgcac	gcattgtctg	agtaggtgtc	attctattct	gggggggtggg	4980
	gtggggcagg	acagcaaggg	ggaggattgg	gaagacaata	gcaggcatgc	tggggatgcg	5040
	gtgggctcta	tggcttctga	ggcggaaaga	accagctggg	gctcgacagc	tcgactctag	5100
55	aattcactgg	ccgtcgtttt	acaacgtcgt	gactgggaaa	accctggcgt	taccacactt	5160
	aatcgcttg	cgcacatcc	ccctttcgcc	agctggcgta	atagcgaaga	ggcccgcacc	5220
	gacgcgccct	cccaacagtt	gcgcagcctg	aatggcgaat	ggcgcctgat	gcgggtatttt	5280
	ctccttacgc	atctgtgcgg	tatttcacac	cgcataatgg	gcactctcag	tacaatctgc	5340
60	tctgatgccg	catagttaag	ccagccccga	caccgcgcaa	caccgcgtga	cgcgccttga	5400
	cgggcttgctc	tgtcccgccg	atccgcttac	agacaagctg	tgaccgtctc	cgggagctgc	5460
	atgtgtcaga	ggttttccac	gtcatcaccg	aaacgcgcga			5500

ES 2 332 261 T3

<210> 2

<211> 5089

<212> ADN

5 <213> Plásmido pPJV2003

<400> 2

```

10  gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatddd tatagggttaa tgtcatgata ataatggddd 60
    cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aaccctattt tgtttatddd 120
    tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
    aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgccctt attccctddd 240
15  ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
    ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
    tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat gagcactddd aaagttctgc 420
    tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgccgcatac 480
    actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
20  gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtcg ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600
    acttacttct gacaacgacg ggaggaccga aggagctaac cgcttttttg cacancatgg 660
    gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaacg 720
    acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
    gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
25  ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttatttgt gataaatctg 900
    gagccggtga gcgtgggtct cgcgggtatc ttgcagact ggggccagat ggtaagccct 960
    cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
    agatcgtgta gatagggtcc tctactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
    catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
30  tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
    cagaccccg t agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
    gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgccc gatcaagagc 1320
    taccaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
    ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
35  tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
    ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acgggggggt 1560
    cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
    agcattgaga aagcgcacg cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaaagc 1680
    gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatatctt 1740
40  atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgctcgtcag 1800
    gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacgggtc ctggcctddd 1860
    gctggccttt tgctcacatg ttctttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
    ttaccgcctt tgagtgaact gataccgtc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcgagt 1980
45  cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcccaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
    cgattcatta atgcagctgg cacyacaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
    acgcaattaa tgtgagttag ctactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
    cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220

```

50

55

60

65

ES 2 332 261 T3

```

accalgatta cgccaagcta glegacataa atcaatatgg gctattggcc attgcatacg 2280
ttgtatctat atcataatat gracatttat attgggtcat gtccaatatg accgccatgt 2340
tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 2400
ccatataatgg agttccgctg tacataactt acggtaaatg gcccgcctcg tgaccgcca 2460
acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 2520
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt taaggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 2580
aagtgtatca tatgccaatg ccggccccct attgacgtca atgacggtaa atggccccgc 2640
tggcattatg cccagtacat gaccttacgg gacttttcta cttggcagta catctacgta 2700
ttagtcacacg ctattaccat ggtgatgagg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag 2760
cggtttgact cagggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt 2820
tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaata accccgcccc gttgacgcaa 2880
atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggagggt tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt 2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga 3000
tccagcctcc gcggcgggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgc 3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac accccttttg ctcttatgca tgctatactg 3120
tttttggctt ggggcctata caccctcgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag 3180
cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattggtgac gatactttcc 3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcca caactatctc tattggctat atgccaatac 3300
tctgtccttc agagactgac acggaactct tatttttaca ggtgggggtc ccattttatta 3360
tttacaaatt cacatataca acaacgcctt cccccgtgcc cgcagttttt attaaacata 3420
gcgtgggac tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcggga catgggctct tctccggtag 3480
cggcgagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgtctcg 3540
cagctccttg ctctaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac 3600
cagtgtgccg cacaaggccg tggcggtagg gttatgtctc gaaaatgagc tcggagattg 3660
ggctcgacc gtgacgcaga tggaaactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc 3720
tgagttgctg tattctgata agagtcagag gtaactcccg ttgcggtgct gttaacgggtg 3780
gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgccgcgc gcgccaccag acataatagc 3840
tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg 3900
caatcatgga tgcaatgaag agagggctct gctgtgtgct gctgtgtgtt ggagcagctc 3960
tcgtttcggc tagcacacct caaaatatta ctgatttgtg tgcagaatac cacaacacac 4020
aaatatatac gctaaatgat aagatatatt cgtatacaga atctctagct ggaaaaagag 4080
agatggctat cattactttt aagaatgggt caatttttca agtagaagta ccaggtagtc 4140
aacatataga ttcaaaaaa aaagcgattg aaaggatgaa ggataccctg aggattgcat 4200
atcttactga agctaaagtc gaaaagttat gtgtatggaa taataaaacg cctcatgcga 4260
ttgccgcaat tagtatggca aattaaggat cctcgcaatc cctaggagga ttaggcaagg 4320
gcttgagctc acgctcttgt gagggacaga aatacaatca ggggcagtat atgaatactc 4380
catggagaaa cccagatcta cgtatgatca gctcgactg tgccttctag ttgccagcca 4440
tctgttgttt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aagggtgccac tcccactgtc 4500
ctttcctaatt aaaatgagga aattgcatcg catgtctga gtaggtgtca ttctattctg 4560
gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct 4620
ggggatgcgg tgggctctat ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg ctcgacagct 4680
cgactctaga attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaa cctggcgctt 4740
acccaactta atgccttgc agcacatccc cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag 4800
gcccgaccg atgccttcc ccaacagtgt cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg 4860
cggtattttc tcttacgca tctgtgggtt atttcacacc gcataatggtg cactctcagt 4920
acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac 4980
gcgccctgac gggcttgtct gctcccgga tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc 5040
gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcga 5089

```

<210> 3

<211> 5488

<212> ADN

<213> Plásmido pPJV2006

ES 2 332 261 T3

<400> 3

5	gacgaaaggg	cctcgtgata	cgcctatfff	tataggttaa	tgtcatgata	ataatggfff	60
	cttagacgtc	aggtggcact	tttcggggaa	atgtgcgcgg	aacccttatt	tgffffatfff	120
	tctaaataca	ttcaaatacg	tatccgctca	tgagacaata	accctgataa	atgcttcaat	180
	aattattgaaa	aaggaagagt	atgagtattc	aacatttccg	tgtcgccttt	attccctfff	240
	ttgcggcatt	ttgccttcc	gtttttgtct	accagaaac	gctgggtgaa	gtaaaagatg	300
	ctgaagatca	gttgggtgca	cgagtgggtt	acatcgaa	ggatctcaac	agcggtaaga	360
10	tccltgagag	ttttcgcctc	gaagaacgtt	ttccaatgat	gagcactfff	aaagttctgc	420
	latgtggcgc	ggtattatcc	cgtattgacg	ccgggcaaga	gcaactcggg	cgccgcatac	480
	actattctca	gaatgacttg	gttgagtact	caccagtcac	agaaaagcat	cttacggatg	540
	gcatgacagt	aagagaattt	tgcagtgtct	ccataaccat	gagtataaac	actgcggcca	600
	acttactttc	gacaacgata	ggaggaccga	aggagctaac	cgcttttttg	cacaacatgg	660
15	gggatcatgt	aactcgcctt	gategttggg	aaccggagct	gaatgaagcc	ataccaaacg	720
	acgagcgtga	caccacgatg	cctgtagcaa	tggcaacaac	gttgcgcaaa	ctattaactg	780
	cggaactact	tactctagct	tcccggaac	aattaataga	ctggatggag	gcggataaag	840
	ttgcaggacc	acttctgcgc	tgggccttct	cggctggctg	gtttattgct	gataaatctg	900
	gagccgggtga	gcgtgggtct	cgcggtatca	ttgcagcact	ggggccagat	ggtaagccct	960
20	cccgtatcgt	agttatctac	acgacgggga	gtcaggcaac	tatggatgaa	cgaaatagac	1020
	agatcgctga	gataggtgcc	tacttgatta	agcatttggt	actgtcagac	caagtttact	1080
	catatatact	ttagattgat	ttaaaacttc	atfttttaatt	taaaaggatc	taggtgaaga	1140
	tcctttttga	taactctatg	accaaaatcc	cttaacgtga	gttttctgtc	cactgagcgt	1200
25	gcagccccgt	agaaaagatc	aaaggatctt	cttgagatcc	tttttttctg	cgcgtaactc	1260
	gctgcttgca	aacaaaaaaa	ccaccgctac	cagcgggtgg	ttgtttgcgc	gatcaagagc	1320
	taccaactct	ttttccgaag	gttaactggc	tcagcagagc	gcagatacca	aatactgtcc	1380
	ttctagtgtg	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
30	ggttggactc	aagacgatag	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggt	1560
	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
	agcattgaga	aagcggccag	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacaggtat	cggtaagcg	1680
	gcagggtcgg	aacagggag	cgcacgagg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggtatcttt	1740
	atagtccgtg	cgggtttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	atftttgtga	tgtcgtcag	1800
35	ggggggcggg	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacggttc	ctggcctttt	1860
	gctggccttt	tgtctacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	tgattctgtg	gataaccgta	1920
	ttaccgcctt	tgagttagct	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcagat	1980
	cagttagcga	ggaagcggaa	gagcgcccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
	cgattcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgaact	gaaagcgggc	agttagcgca	2100
40	acgcaattaa	tgtgagttag	ctcaactcatt	aggcacccca	ggctttacac	tttatgtctt	2160
	cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
	accatgatta	cgccaagcta	gtcgacataa	atcaatattg	gtatttggcc	attgcatacg	2280
	ttgtatctat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
	tgacattgat	tattgactag	ttattaatag	taatcaatta	cggggtcatt	agttcatagc	2400
45	ccatataatg	agttccgcgt	tacataactt	acggtaaatg	gcccgcctcg	tgaccgcccc	2460
	acgacccccg	cccattgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
	ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
	aagtgtatca	tatgccaaag	cgggccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggcccggc	2640
	tggcattatg	cccagtacat	gaccttacgg	gactttccta	cttggcagta	catctacgta	2700
50	ttagtcatcg	ctattaccat	ggtgatgcgg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
	cggtttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccccatbg	acgtcaatgg	gagtttgttt	2820
	tggcaccaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgttaata	accccgcccc	gttgacgcaa	2880
	atgggaggta	ggcgtgtacg	gtgggaggte	tatataagca	gagctcgttt	agtgaaccgt	2940
55	cagatcgctt	ggagacgcca	tccacgctgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccga	3000
	tccagcctcc	gcggccggga	acggtgcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	caagagtgc	3060

60

65

ES 2 332 261 T3

```

5   gtaagtaccg cctatagact ctataggaac accccttttg ctcttatgca tgctatactg 3120
    tttttggcct ggggcctata ccccccgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag 3180
    cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattggtgac gatactttcc 3240
10  attactaatc cataacatgg ctctttgcca caactatctc tattggctat atgccaatac 3300
    tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta 3360
    tttacaaatt cacatataca acaacgcgct ccccggtgcc cgcagttttt attaaacata 3420
    gcgtgggacg tccacgcgaa tctcgggtac gtgttccgga catgggctct tctccggtag 3480
15  cggcgagctc tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgctcgg 3540
    cagctccttg ctccaaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac 3600
    cagtgtgccc cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tccgagattg 3660
    ggctcgcacc gtgacgcaga tgggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc 3720
    tgagtgtgtg tattctgata agagtccagag gtaactcccc ttgcggtgct gttaacgggtg 3780
    gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgcgcgcg gcgccaccag acataatagc 3840
20  tgacagactc acagactggt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagctag 3900
    caatcatgga tgcataaag agagggtctc gctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagctc 3960
    tctgttcggc tagcaatgat gataagttat atcgggcaga ttctagacct cctgatgaaa 4020
    taaagcagtc aggtggtctt atgccaagag gacagagtga gtactttgac cgaggctactc 4080
    aatgaatat caacctttat gatcatgcaa gaggaactca gacgggattt gttaggcagc 4140
25  atgatggata tgtttccacc tcaattagtt tgagaagtgc ccacttagtg ggtcaaaacta 4200
    tattgtctgg tcatcttact tattatatac atgttatagc caetgcaccc aacatgttta 4260
    acgttaatga tgtactaggg gcatcacgct ctcattccaga tgaacaagaa gtttctgctt 4320
    taggtgggag tccatactcc caaatatatg gatggtatcg agttcatttt ggggtgcttg 4380
    atgaacaatt acatcgtaat aggggctaca gagatagata ttacagtaac ttagatattg 4440
30  ctccagcagc agatggttat ggattggcag gtttccctcc ggagcataga gcttggaggg 4500
    aagagccgtg gattcatcat gcaccgccgg gttgtgggaa tgctccaaga tcatcgatga 4560
    gtaatacttg cgatgaaaaa acccaaagtc taggtgtaaa attccttgac gaataccaat 4620
    ctaaagttaa aagacaaata ttttcaggct atcaatctga tattgatata cataatagaa 4680
    tttgaggatc ctgcgaatcc ctaggaggat taggcaaggg cttgagctca cgctcttggtg 4740
35  agggacagaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac 4800
    gtatgatcag cctcgactgt gccctctagt tgcagccat ctgttgtttg cccctcccc 4860
    gtgccttctc tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc ttctctaata aaatgaggaa 4920
    attgcacgcg attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggt ggggcaggac 4980
    agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgct gggatgcggt gggctctatg 5040
40  gctctlgagg cggaaagaac cagctggggc tgcacagctc gactctagaa ttcactggcc 5100
    gtcgttttca aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcggtta cccaacttaa tgcgcttgca 5160
    gcacatcccc ctctcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tgcgcccttc 5220
    caacagttgc gcagcctgaa tggcggaatgg cgctgatgc ggtattttct ccttacgcac 5280
    ctgtgcggta ttccacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca 5340
    tagttaagcc agccccgaca cccgccaaac cccgtgacg cgccctgacg ggcttgtctg 5400
    ctccggcatc ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 5460
    ttttcaccgt catcaccgaa acgcgcga 5488

```

```

45  <210> 4
    <211> 5500
    <212> ADN
50  <213> Plásmido pPJV2004
    <400> 4

```

```

55  gacgaaaggg cctcgtgata cgcctathtt tataggttaa tgtcatgata ataatggttt 60
    cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg aacccttatt tgtttathtt 120
    tctaaatata ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
    aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg tgtcgcccct attccctttt 240

```

60

65

ES 2 332 261 T3

thgcygcatl ttgccttctt gtttttgcct acccagaaac gctgggtgaa gtaaaagatg 300
 ctgaagatca gttgggtgca cgaagtgggtt acatcgaaact ggatctcaac agcggtaaga 360
 tccttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagttctgc 420
 tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggc cgccgcatac 480
 actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac agaaaagcat cttacggatg 540
 gcatgacagt aagagaatta tgcagtgcct ccataaccat gagtataaac actgcggcca 600
 acttactttt gacaacgac ggagaccga aggagctaac cgtttttttg cacaacatgg 660
 gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacc 720
 acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaaa ctattaactg 780
 gccaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcgataaag 840
 rtgcaggacc aactctgcgc tcggcccttc cggctggly gtttattgct gataaatctg 900
 gagccgtga cgttgggtct cgggtatca ttgcagcact ggggcccagat ggtaagccct 960
 cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaatatagac 1020
 agatcgctga gataggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
 catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
 tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
 cagaccccgct agaaaagac aaaggatctt ctlgagatcc tttttttctg cgcgtaact 1260
 gctgcttga aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgtgggt ttgtttgccc gataaagagc 1320
 tacciaactct ttttcgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
 ttctagtgtt gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
 tgcctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
 ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtccggctga acgggggggt 1560
 cgtgcacaca gccagcctg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg 1620
 agcattgaga aagcggccacg ctcccggaag ggagaaaggc ggacaggat ccggtaagcg 1680
 gcagggtcgg aacaggagag cgcacgagg agcttccagg gggaaacgcc tggatcttt 1740
 atagtcctgt cgggtttcgc caccctctgac ttgagcgtcg atttttga tgctcgtcag 1800
 gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcccctt ttacgggtc ctggcccttt 1860
 gctggccctt tgctcacatg ttctttcctg cgttatccc tgattctgtg gataaccgta 1920
 ttaccgcctt tgagtgaact gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat 1980
 cagtgaagca ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaac gcctctcccc gcgcgttggc 2040
 cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt ttcccgactg gaaagcgggc agtgagcgca 2100
 acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac tttatgcttc 2160
 cggtcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
 accatgatta cgccaagca gtcgacataa atcaatatg gctattggcc attgcatacg 2280
 ttgtacttat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt 2340
 tgacactgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc 2400
 ccataatagg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctcg tgaccgccc 2460
 acgacccccg ccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 2520
 ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtaac 2580
 aagtgtatca tatgccaagt ccggccccc attgacgtca atgacggtaa atggcccgc 2640
 tggcattatg ccagctacat gaccttacgg gactttccta cttggcagta catctacgta 2700
 ttagtcacg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag 2760
 cggtttgact cagggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gaggttgttt 2820
 tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaa tgtcgtata accccgccc gttgacgcaa 2880
 atgggaggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcggtt agtgaaccgt 2940
 cagatcgccg ggagacgcca tccacyctgt ttgacctcc alagaagaca ccgggaccga 3000
 tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacggga ttccccgtgc caagagtga 3060
 gtaagtaccg cctatagact ctataggcac accccttgg ctcttatgca tgctatactg 3120
 tttttggctt ggggcctata cacccecgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag 3180
 cctatagggtg tgggttattg accattattg accactcccc tattgggtgac gatactttcc 3240
 attactaatc cataacatgg ctctttgcca caactatctc tattgggtat atgccaatac 3300
 tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccatttatta 3360

ES 2 332 261 T3

```

5   tttacaaatt cacaataaca acaacgcggt cccccgtgcc cgcagttttt attaaacata 3420
    gcgtgggagc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttcggga catgggctct tctcgggtag 3480
    cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcggctcgg 3540
    cagctccttg ctctaacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac 3600
    cagtggtgcc cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tccgagattg 3660
    ggctcgcacc gtgacgcaga tggaaagactt aaggcaagcg cagaagaaga tgcaggcagc 3720
    tgagttgttg tattctgata agagtcagag gtaactcccc ttgcgggtgct gttaacgggtg 3780
    gagggcagtg tagtctgagc agtactcgtt gctgcgcgcg gcgccaccag acataatagc 3840
10  tgacagacta acagactgtt cctttccatg ggtcttttct gcagtcaccg tccaagcttg 3900
    caatcatgga tgcaatgaag agagggctct gctgtgtgct gctgctgtgt ggagcagttc 3960
    tcgtttcggc tagcaatggc gacaaattat accgtgctga ctctagaccc ccagatgaaa 4020
    taaaacgctt cggaggtctt atgcccagag ggcataatga gtacttcgat agaggaactc 4080
    aaatgaatat taatctttat gatcacgcga gggcaacaca aaccggcttt gtcaggcatg 4140
15  atgacggata tgtttccact tctcttaght tgagaagtgc tcacttagca ggacagtcta 4200
    tattatcagg atattccact tactatatat atgttatagc gacagcacca aatatgttta 4260
    atgttaatga tgtattaggg gtatacagcc ctacccata tgaacaggag gtttctgcgt 4320
    taggtggaat accatattct cagatatatg gatggtatcg tgttaatttt ggtgtgattg 4380
    atgaacgatt acatcgtaac aggggaatata gagaccggta ttacagaaat ctgaatatag 4440
20  ctccggcaga ggatggttac agattagcag gtttcccacc ggatcaccac gctlggagag 4500
    aagaaccctg gattcatcat gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaga acaattacag 4560
    gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat 4620
    caaaagttaa gaggcagata ttttcagact atcagtcaga gggttgacata tataacagaa 4680
    ttccgggatga attatgagga tctcgcgaat ccctaggagg attaggcaag ggcttgagct 4740
25  cagctccttg tgagggacag aaatacaatc aggggcagta tatgaatact ccatggagaa 4800
    acccagatct acgtatgac agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc atctgttgtt 4860
    tgccctctcc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgccca ctcccactgt cctttcctaa 4920
    taaaatgagg aaattgcac gcattgtctg agtaggtgtc attctattct ggggggtggg 4980
    gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagacaata gcaggcatgc tggggatgag 5040
30  gtgggctcta tggcttctga ggcggaaga accagctggg gctcgacagc tgcactctag 5100
    aattcactgg ccgtcgtttt acaacgctgt gactgggaaa accctggcgt taccacactt 5160
    aatcgccctg cagcacatcc ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggccgcacc 5220
    gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggcgcctgat gcggatattt 5280
    ctctttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatggt gcactctcag tacaatctgc 5340
35  tctgatgccg catagttaag ccagcccgca caccgcgcaa caccgcgtga cgcgcctga 5400
    cgggcttgtc tgctcccggc atccgcttac agacaagctg tgaccgtctc cgggagctgc 5460
    atqtqtcaga ggttttcacc gtcacaccg aaacgcgcga 5500

```

```

40  <210> 5
    <211> 5089
    <212> ADN
45  <213> Plásmido pPJV2005

    <400> 5

```

```

50  gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tatagggttaa tgcctatgata ataattggttt 60
    cttagacgtc aggtggcact ttccggggaa atgtgcgcgg aacccctatt tgtttatttt 120
    tctaaataca ttcaaatatg tctcgcctca tgagacaata accctgataa atgcttcaat 180
    aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttcgg tgcgcgccct attccctttt 240
55  ttgcggcatt ttgccttccg gtttttgctc acccageaac gctggtgaaa gtaaaagatg 300
    ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact ggatctcaac agcggtaaga 360
    tctttgagag ttttcgcccc gaagaacggt ttccaatgat gagcactttt aaagtctctg 420
    tatgtggcgc ggtattatcc cgtattgacg ccgggcaaga gcaactcggg cgcgcctac 480
    actattctca gaatgacttg gttgagtact cccagtcac agaaaagcat cttaaggatg 540
60  gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtct ccataaccat gagtgataac actgcggcca 600

```

65

ES 2 332 261 T3

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50

```

acttacttct gacaacgata ggaggaccga agggagctaac cgtttttttg cacaacatgg 660
gggatcatgt aactcgcctt gatcgttggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaaag 720
acgagcgtga caccacgatg cctgtagcaa tggcaacaac gttgcgcaa ctattaactg 780
gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga ctggatggag gcggataaag 840
ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gtttattgct gataaatctg 900
gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact ggggccagat ggttaagcct 960
cccgatcgt agtlatctac acgacgggga gtcaggcaac tatggatgaa cgaaatagac 1020
agatcgtga gatagggtgcc tcaactgatta agcattggta actgtcagac caagtttact 1080
catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt taaaaggatc taggtgaaga 1140
tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcgttc cactgagcgt 1200
cagaccccgat agaaaagata aaaggatctt cttagatcc tttttttctg cgcgtaatct 1260
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg ttgtttgcc gatcaagagc 1320
taccaactct tttccgaag ttacttggt tcagcagagc gcagatacca aatactgtcc 1380
ttctagtgtg gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc tgtagcaccg cctacatacc 1440
tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg cgataagtcg tgtcttaccg 1500
ggttggaactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg gtcgggctga acggggggtt 1560
cgtgcacaca gcccgacttg gaggcaacga cctacaccga actgagatcc ctacagcgtg 1620
agcattgaga aagcggccag cttcccgaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggttaagcg 1680
gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg gggaaacgcc tggatctctt 1740
atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg atttttgtga tgcctcgtcag 1800
ggggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcccctt tttacggttc ctggcctttt 1860
gctggccttt tgcacacatg ttctttctcg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta 1920
ttaccgcctt tgagttagct gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgcagcagat 1980
cagttagcga ggaagcggaa gagcgcctaa tacgcaaacc gcctctcccc gcgcgttggc 2040
cgattcatta atgcagctgg cagcagaggt ttcccgaact gaaagcgggc agtgagcgca 2100
acgcaattaa tgtgagttag ctcaactcatt aggcacccca ggctttacac ttatgtcttc 2160
cggctcgtat gttgtgtgga attgtgagcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg 2220
accatgatta cgccaagcta gtcgacataa atcaatatg gctattggcc attgcatacg 2280
ttgtatctat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg accgccatgt 2340
tgacattgat tattgactag ttattaatat taatcaatta cgggggtcatt agttcatagc 2400
ccatataatg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gccgcctcgt tgaccgcca 2460
acgaccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagttaacg ccaataggga 2520
ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 2580
aagtgtatca tatgccaagt cgggccccct attgacgtca atgacggtaa atggccccgc 2640
tqqcattatg ccagtagcat gaacttacgg gactttccta ctltgcagta catctacgta 2700
ttagtcatcg ctattaccat ggtgatggcg ttttggcagt acaccaatgg gcgtggatag 2760
cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gaggttggtt 2820
tggcaccaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgttaata accccgcccc grtgacgcaa 2880
atgggcggta ggcgtgtacg gtgggagggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt 2940
cagatcgctt ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga 3000
tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttcccctgtc caagagtga 3060
gtaagtaccg cctatagact ctataggcac acccttttgg ctcttatgca tgctatactg 3120
tttttggctt ggggcctata caccctcgct ccttatgcta taggtgatgg tatagcttag 3180
cctatagggt tgggttattg accattattg accactcccc tattggtgac gatactttcc 3240
attactaatc cataacatgg ctctttgcca caactatctc tattggctat atgccaatc 3300
tctgtccttc agagactgac acggactctg tatttttaca ggatggggtc ccattttatta 3360
tttacaatc cacatatata acaacgccgt ccccctgtcc cgcagtttll atlaaacata 3420
gcgtgggatc tccacgcgaa tctcgggtac gtgttccgga catgggctct tctccggtag 3480
cggcggagct tccacatccg agccctggtc ccatgcctcc agcggctcat ggtcgtcgg 3540
cagtcctctg ctccataacag tggaggccag acttaggcac agcacaatgc ccaccaccac 3600
cagtggtccg cacaaggccg tggcggtagg gtatgtgtct gaaaatgagc tcggagattg 3660
ggctcgcacc gtgacgcaga tgggaagactt aaggcagcgg cagaagaaga tgcaggcagc 3720
  
```

ES 2 332 261 T3

```

5      tgagttgttg  tattctgata  agagtcagag  gtaactcccg  ttgcgggtgt  gttaacgggtg  3780
      gagggcagtg  tagtctgagc  agtactcggt  gctgcgcgcg  gcgccaccag  acataatagc  3840
      tgacagacta  acagactggt  cctttccatg  ggtcttttct  gcagtcaccg  tccaagcttg  3900
      caatcatgga  tgcaatgaag  agagggctct  gctgtgtgtg  gctgctgtgt  ggagcagtc  3960
      tcgttttcggc  tagcgctccc  cagtcctatc  cagaactatg  ttccggaatat  cgcaacacac  4020
      aaatatatac  gataaatgac  aagatactat  catatacggg  atcgatggca  ggcaaaagag  4080
      aaatgggttat  cattacattt  aagagcggcg  caacatttca  ggtcgaagtc  ccgggcagtc  4140
      aacatataga  ctcccaaaaa  aaagccattg  aaaggatgaa  ggacacatta  agaatcacat  4200
10     atctgaccca  gaccaaaaat  gataaattat  gtgtatggaa  taataaaacc  cccaattcaa  4260
      ttgcggcaat  cagtatggaa  aactagggat  cctcgcaatc  cctaggagga  ttaggcaagg  4320
      gcttgagctc  accctcttgt  gagggacaga  aatacaatca  ygggcagtat  atgaatactc  4380
      catggagaaa  ccagatccta  cctatgatca  gcttcgactg  tgccctctag  ttgccagcca  4440
      tctgttgttt  gccctcccc  cgtgccttcc  ttgacctgg  aaggtgccac  tcccactgtc  4500
15     ctttcccta  azaatgagga  aattgcctcg  cattgtctga  gtaggtgtca  ttctattctg  4560
      ggggggtggg  tggggcagga  cagcaagggg  gaggattggg  aagacaatag  caggcatgct  4620
      ggggatgcgg  tgggctctat  ggcttctgag  gccgaaagaa  ccagctgggg  ctgcacagct  4680
      cgactctaga  attcactggc  cgtcgtttta  caacgtcgtg  actgggaaaa  cctggcggtt  4740
      acccaactta  atcgcttgc  agcacatccc  cctttcgcca  gctggcgtaa  tagcgaagag  4800
20     gccgcaccg  atcgcccttc  ccaacagttg  cgcagcctga  atggcgaaatg  gcgcctgatg  4860
      cgggtattttc  tcttaccgca  tctgtgcggt  atttcacacc  gcataatggtg  cactctcagt  4920
      acaatctgct  ctgatgcgc  atagttaagc  cagccccgac  acccgccaac  acccgctgac  4980
      gcgcctgac  gggcttgtct  gctcccggca  tccgcttaca  gacaagctgt  gaccgtctcc  5040
      gggagctgca  tgtgtcagag  gttttcaccg  tcataccga  aacgcgcga  5089

```

<210> 6

<211> 5488

30 <212> ADN

<213> Plásmido pPJV2007

<400> 6

```

35     gacgaaaggg  cctcgtgata  cgcctatttt  tataggttaa  tgatcatgata  ataattgggtt  60
      cttagacgtc  aggtggcact  tttcggggaa  atgtgcgcgg  aacccctatt  tgtttatttt  120
      ctaaaatata  ttcaaatatg  tatccgctca  tgagacaata  accctgataa  atgcttcaat  180
40     aattattgaaa  aaggaagagt  atgagtattc  aacatttccg  tgtcgccctt  attccctttt  240
      ttgcggcatt  ttgccttctt  gtttttgctc  acccagaaac  gctgggtgaaa  gtaaaagatg  300
      ctgaagatca  gttgggtgca  cgagtgggtt  acatcgaact  ggatctcaac  agcggtaaga  360
      tcccttgagag  ttttcgcccc  gaagaacggt  ttccaatgat  gagcactttt  aaagtctctg  420
      tatgtggcgc  ggtattatcc  cgtattgacg  cggggcaaga  gcaactcggg  cgcgcatac  480
45     actatttctca  gaatgacttg  gttgagtact  caccagtcac  agaaaagcat  cttacggatg  540
      gcatgacagt  aagagaatta  tgcagtgtcg  ccataaccat  gagtgataac  actgcggcca  600
      acttacttct  gacaacgata  ggaggaccga  aggagctaac  cgcctttttg  cacaacatgg  660
      gggatcatgt  aactcgcctt  gatcgttggg  aaccggagct  gaatgaagcc  ataccaaacg  720
      acgagcgtga  caccacgatg  cctgtagcaa  tggcaacaac  gttgcgcaaa  ctattaactg  780
50     gcgaactact  tactctagct  tcccggcaac  aattaataga  ctggatggag  gcggataaag  840
      ttgcaggacc  acttctgcgc  tcggcccttc  cggtcggctg  gtttatttgt  gataaatctg  900
      gaacccgtga  gcgtgggtct  cgcggtatca  ttgcagcact  ggggccagat  ggtaagccct  960
      cccgtatcgt  agttatctac  acgacgggga  gtcaggcaac  tatggatgaa  cgaaatagac  1020
      agatcgtcta  gataggtgcc  tcaactgatta  agcattggta  actgtcagac  caagtttact  1080
55     catatatact  ttagattgat  ttaaaacttc  atttttaatt  taaaaggatc  taggtgaaga  1140
      tcccttttga  taatctcatg  accaaaatcc  cttaacgtga  gttttcgttc  cactgagcgt  1200
      cagacccgt  agaaaagatc  aaaggatctt  cttgagatcc  ttttttctg  cgcgtaatct  1260
      gctgcttgca  aacaaaaaaa  ccaccgctac  cagcgggtgt  ttgtttgccg  gatcaagagc  1320
60     taccaactct  ttttccgaag  gtaactggct  tcagcagagc  gcagatacca  aatactgtcc  1380

```

65

ES 2 332 261 T3

	ttctagtgtta	gccgtagtta	ggccaccact	tcaagaactc	tgtagcaccg	cctacatacc	1440
	tcgctctgct	aatcctgtta	ccagtggctg	ctgccagtgg	cgataagtcg	tgtcttaccg	1500
	ggttggactc	aagacgatat	ttaccggata	aggcgcagcg	gtcgggctga	acgggggggtt	1560
5	cgtgcacaca	gcccagcttg	gagcgaacga	cctacaccga	actgagatac	ctacagcgtg	1620
	agcatttgaga	aagcggccacg	cttcccgaag	ggagaaaggc	ggacagggtat	ccggtaagcg	1680
	gcagggtcgg	aacaggagag	cgcacgaggg	agcttccagg	gggaaacgcc	tggatatcttt	1740
	atagtccctgt	cgggttttcgc	cacctctgac	ttgagcgtcg	attttttgtga	tgctcgtcag	1800
	ggggggcggag	cctatggaaa	aacgccagca	acgcggcctt	tttacgggtc	ctggcctttt	1860
10	gctggccttt	tgtccacatg	ttctttcctg	cgttatcccc	lgallcltgtg	galaaccgta	1920
	ttaccgcctt	tgagtgaact	gataccgctc	gccgcagccg	aacgaccgag	cgcagcaggt	1980
	cagtgacgca	ggaagcggaa	gagcggccaa	tacgcaaacc	gcctctcccc	gcgcgttggc	2040
	cgatttcatta	atgcagctgg	cacgacaggt	ttcccgactg	gaaagcgggc	agtgagcgca	2100
	acgcaattaa	tgtgagttag	ctcactcatt	aggcacccca	ggcttttacac	tttatgcttc	2160
15	cggctcgtat	gttgtgtgga	attgtgagcg	gataaacaatt	tcacacagga	aacagctatg	2220
	accatgatta	cgccaageta	gtcgacataa	atcaatatgt	gctattggcc	attgcatacg	2280
	ttgtatccat	atcataatat	gtacatttat	attggctcat	gtccaatatg	accgccatgt	2340
	tgacattgat	tattgactag	ttattaatat	taatcaatta	cggggtcatt	agttcatagc	2400
	ccataatatgg	agttccgctg	tacataactt	acggtaaaatg	gcccgcctcg	tgaccgcsca	2460
20	acgacccccg	cccattgacg	tcaataatga	cgtatgttcc	catagtaacg	ccaataggga	2520
	ctttccattg	acgtcaatgg	gtggagtatt	tacggtaaac	tgcccacttg	gcagtacatc	2580
	aagtgtatca	tatgccaaagt	cgggccccct	attgacgtca	atgacggtaa	atggcccggc	2640
	tggcatttatg	cccagtagac	gaccttacgg	gactttcccta	cttggcagta	catctacgta	2700
	ttagtcatcg	ctattaccat	gggtgatggg	ttttggcagt	acaccaatgg	gcgtggatag	2760
25	cgggttgact	cacggggatt	tccaagtctc	caccocattg	acgtcaatgg	gagtttgttt	2820
	tggcaccaaaa	atcaacggga	ctttccaaaa	tgtcgraata	accccgcgcc	gttgacgcaa	2880
	atgggcggtg	ggcgtgtacg	gtgggaggtc	tatatagca	gagctcgttt	agtgaaccgt	2940
	cagatcgccct	ggagacgcca	tcacagctgt	tttgacctcc	atagaagaca	ccgggaccga	3000
	tccagccctcc	gcggccggga	acggtgcatt	ggaacgcgga	ttccccgtgc	caagagttag	3060
30	gtaagtaccg	cctatagact	ctataggcac	acccctttgg	ctcttatgca	tgctatactg	3120
	tttttggttt	ggggccctata	caccoccgct	ccttatgcta	tagggtgatgg	tatagcttag	3180
	cctatagggtg	tgggttattg	accattattg	accactcccc	tattgggtgac	gatactttcc	3240
	attactaatc	cataacatgg	ctctttgcca	caactatctc	tattggctat	atgccaatac	3300
	tctgtccttc	agagactgac	acggactctg	tattttttaca	ggatgggggtc	ccattttatta	3360
35	tttacaaaatt	cacatataca	acaacgcgct	ccccgtgccc	cgcagttttt	attaaacata	3420
	gcgtgggagc	tcacgcggaa	tctcgggtac	gtgttccgga	catgggctct	tctccggtag	3480
	cggcggagct	tcacatcccg	agccctgggt	ccatgcctcc	agcggctcat	ggtcgtctgg	3540
	cagctccttg	ctcctaacag	tggaggccag	acttaggcac	agcacaatgc	ccaccaccac	3600
	cagtgtgccg	cacaaggccg	tggcggtagg	gtatgtgtct	gaaaaatgagc	tcggagattg	3660
40	ggctcgcacc	gtgacgcaga	tggaagactt	aaggcagcgg	cagaagaaga	tgaggcagc	3720
	tgagtgtgtg	tattctgata	agagtccagag	gtaactcccg	ttgcgggtgct	gttaacgggtg	3780
	gagggcagtg	tagtctgagc	agtactcgtt	gctgccgcgc	gcgccaccag	acataatagc	3840
	tgacagacta	acagactggt	cctttccatg	ggtcttttct	gcagtcaccg	tccaagcttg	3900
	caatcatyga	tgcaatgaag	agagggtctt	gctgtgtgct	gctgctgtgt	ggagcagttt	3960
45	tcgtttcggc	tagcaatggc	gacaaattat	accgtgctga	ctctagaccc	ccagatgaaa	4020
	taaaacgttc	cggagggtctt	atgccagat	ggcataatga	gtacttcgat	agagggaactc	4080
	aaatgaatat	taatctttat	gatcacgcga	gaggaaacaca	aaccggcttt	gtcagatatg	4140
	atgacggata	tgtttccact	tctcttagtt	tgagaagtgc	tcacttagca	ggacagtcta	4200
	tattatcagg	atatccact	tactatatat	atgttatagc	gacagcacca	aatatgttta	4260
50	atgttaatga	tgtattaggg	gtatcacagc	ctcaccata	tgaacaggag	gtttctgcgt	4320
	taggtggaat	accatattct	cgatatatag	gatggtatcg	tgttaatttt	ggtgtgattg	4380
	atgaacgatt	acatcgtaac	agggaaatata	gagaccggtg	ttacagaaat	ctgaatatag	4440
	ctccggcaga	ggatgggttac	agatttagcag	gtttcccacc	ggatcaccaa	gcttggagag	4500

ES 2 332 261 T3

5 aagaacccctg gattcatcat gcaccacaag gttgtggaaa ttcatacaaga acaattacag 4560
 gtgatacttg taatgaggag acccagaatc tgagcacaat atatctcagg aaatatcaat 4620
 caaaagttaa gaggcagata ttttcagact atcagtcaga gggtgacata tataacagaa 4680
 tttgaggatc ctgcgaatcc ctaggaggat taggcaaggg cttgagctca cgctcttggtg 4740
 agggacagaa atacaatcag gggcagtata tgaatactcc atggagaaac ccagatctac 4800
 gtatgatcag cctgcactgt gccttctagt tggcagccat ctgttgtttg cccctcccc 4860
 gtgccttcc tgcacctgga aggtgccact cccactgtcc tttcctaata aaatgaggaa 4920
 attgcacgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg ggggtggggg ggggcaggac 4980
 10 agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcattgctg gggatgcggg gggctctatg 5040
 gctactgagg cggaaagaac cagctggggc tcgacagctc gactctagaa ttcactgggc 5100
 gtcggttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgtaa cccaacttaa tcgcttgca 5160
 gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttcc 5220
 caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg cgctgatgc ggtattttct ccttacgcac 5280
 15 ctgtgcggta tttcacaccg catatggtgc actctcagta caatctgctc tgatgccgca 5340
 tagttaagcc agccccgaca cccgccaaac cccgtgacg cgcctgacg ggcctgtctg 5400
 ctcccggcat ccgcttacag acaagctgtg accgtctccg ggagctgcat gtgtcagagg 5460
 ttttcaccgt catcaccgaa 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 gttatacgg 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 ccttaattct 30

<210> 9
 50 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

60 <400> 9
 ggagctagca cacctcaaaa tattactgat 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 taatttgcca tactaattgc 30
 <210> 11
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 11
 20 cctggatcct caaattctat tatgtgtatc 30
 <210> 12
 <211> 30
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 12
 35 ggagctagca atggcgacaa attataccgt 30
 <210> 13
 <211> 30
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 13
 cctggatcct cataattcat cccgaattct 30
 50 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

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

60 <400> 14
 ggagctagcg ctccccagtc tattacagaa 30
 65 <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 caaattctgt tatatatgic 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 acctatcaga 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

cccggatcct 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

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

5 Arg

<210> 20
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 15 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 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

<220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 21

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

<210> 22
 40 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: construcción sintética

<400> 22

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

55

60

65