



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 298 829**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 39/008 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **04790046 .9**

⑧6 Fecha de presentación : **22.10.2004**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1615663**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **18.01.2006**

⑤4 Título: **Agente para el tratamiento de infecciones por *Leishmania*.**

③0 Prioridad: **24.10.2003 EP 03090368**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

⑦3 Titular/es: **Mologen AG.**
Fabeckstrasse 30
14195 Berlin, DE

⑦2 Inventor/es: **Wittig, Burghardt;**
Fuertes-López, Laura y
Timón-Jiménez, Marcos

⑦4 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Agente para el tratamiento de infecciones por *Leishmania*.

5 La invención se refiere al uso de una combinación de constructos de expresión de ADN para la preparación de un medicamento para la inmunización frente a infecciones por leishmaniosis, así como a una correspondiente vacuna. Los constructos de ADN mismos son igualmente objeto de la invención.

10 Las *Leishmania* son flagelados tripanosomátidos del orden de los cinetoplastidos que se transmiten mediante moscas de arena hembra chupadoras de sangre del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* a distintas especies de mamíferos y al hombre. Las leishmaniosis son enfermedades con distintos cuadros clínicos que representan un problema de salud significativo. La OMS estima que en todo el mundo están afectados por la enfermedad aproximadamente 12 millones de personas. Aproximadamente 2 a 9% de todos los pacientes de VIH padecen leishmaniosis visceral, por tanto ésta es la tercera enfermedad parasitaria más común que padecen las personas positivas de VIH. Aunque en las leishmaniosis mucocutánea y cutánea aparecen destrucciones de tejido considerables, la leishmaniosis visceral (kala-azar) no tratada termina la mayoría de las veces con la muerte.

20 Para el tratamiento de la enfermedad, están disponibles sólo unos pocos medicamentos probados clínicamente. Así, se utilizan desde hace aproximadamente 60 años para la terapia de leishmaniosis visceral productos quimioterapéuticos, principalmente compuestos del metal pesado antimonio. Sin embargo, la toxicidad masiva en cierta medida de la mayoría de estos preparados limita su uso. Además, las *Leishmania* han desarrollado resistencia en muchos campos frente a los preparados de antimonio (*J. Postgrad. Med.*, ene-mar 2003, 49(1), 61-68).

25 No hay hasta ahora una vacunación rutinaria compatible y protectora.

Ya que las personas que han sufrido la infección desarrollan una fuerte inmunidad contra una infección posterior, debería ser posible el desarrollo de una protección por vacunación eficaz.

30 La vacunación o inmunoterapia de la leishmaniosis, cuya causa son parásitos intracelulares, debería ser posible mediante la generación de una reacción inmune Th1 típica. En el estado de la técnica, se indica en muchos casos la importancia de la generación de una respuesta Th1 en la terapia o prevención de leishmaniosis (Handman *et al.*, *J. Immunol.* 160: 3949-3957, Gurunathan *et al.*, *Nature Med.*: 4(12): 1409-1415). Para la potenciación de la activación de una respuesta inmune Th1 típica, se refiere la citocina IL-12 coestimuladora como coadyuvante indispensable (Parker *et al.*, *J. Immunol.* 104: 896-902).

35 Además, pueden utilizarse secuencias de ácido nucleico inmunoestimulantes (SAI) como coadyuvante. Los motivos CPG de las SAI efectúan una elevación de la actividad de las células NK y macrófagos así como una fuerte estimulación de la respuesta inmune Th1 celular. Preferiblemente, pueden utilizarse SAI cerradas covalentemente con una longitud de 30 pb como se describen, por ejemplo, en el documento EP 1.196.178 A1.

40 Se han ensayado distintos antígenos en protocolos de vacunación experimentales en ratones. La reacción inmunológica en ratones ante esta infección parece compararse con la del hombre y probablemente también con la del perro (Cox, *Int. J. Parasitol.*, 263: 1147-1157). Los antígenos relacionados eran gp63 (Scott *et al.*, *J. Exp. Med.* 168: 1675-1684), gp46 (McMahon-Pratt *et al.*, *Infection and Immunity* 61: 3351-3359), p-4 y p-8 (Scott *et al.*, *Immunology* 99: 615-624), así como p36 o también el antígeno designado como LACK (Gonzales-Aseguinolaza *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 259: 909-916). El régimen de vacunación más exitoso, primera inmunización con proteína p36, segunda inmunización con virus Vaccinia que codifica p36 e IL-12, conducía a una reducción media de las lesiones de un 52% en comparación con ratones no vacunados (Gonzalo *et al.*, *Microbes and Infection*: 3 (9), 701-711).

50 Además de una protección de sólo un 52%, se utilizaban en el ensayo citado virus Vaccinia como vehículo génico. A este respecto, se trata de vectores víricos que a causa de su alta eficacia de transfección representan todavía el vehículo génico más frecuentemente utilizado. Sin embargo, es conocido que existe un alto riesgo de reacción citotóxica del organismo anfitrión ante las células transfectadas. Así, la aplicación de una alta dosis de un adenovirus condujo en un ensayo clínico a la muerte del paciente; aparentemente la causa de ello fue una fuerte sobre-reacción del sistema inmune (Lehrman, 1999, *Nature* 401: 517-518). Además, por la inestabilidad de la cepa de vacunación atenuada, no hay que excluir la retrotransformación en una cepa virulenta. Además, los componentes víricos mismos pueden actuar como inmunógenos, lo que conduce a un descenso de su actividad por el sistema inmune del paciente.

60 En trabajos propios de la solicitante, se han inmunizado ratones BALB/c con vectores de expresión mínimos que codificaban el antígeno p36 LACK. A este respecto, se han empleado distintos esquemas de vacunación. En el marco de estos estudios, pudo conseguirse en un grupo un 57% de protección ante una infección por *Leishmania major* (L. López-Fuertes *et al.*, 2002, *Vaccine* 21: 247-257).

65 Gurunathan *et al.* utilizan el antígeno p36 LACK, codificado por vectores de expresión eucarióticos, en ensayos de vacunación en ratones (*J. Exp. Med.*, vol. 186, n° 7 (1997): 1137-1147).

En otras preparaciones, se han utilizado distintas combinaciones de antígeno. Con una mezcla de ADN de plásmido que codifica TSA y LmST11, pudo reducirse así el tamaño de las lesiones durante un intervalo de tiempo determinado después de la infección (A. Campos-Neto *et al.*, 2002, *Infection and Immunity*: 2828-2836).

- 5 La combinación terciaria de antígeno LACK, LmST11 y TSA pudo reducir en gran medida la aparición de lesiones dérmicas después de la infección y condujo a una protección mantenida durante varias semanas (S. Méndez *et al.*, 2001, *J. of Immunology* 166: 5122-5128).

10 En todos los ensayos citados es común que sea alcanzable sólo una protección parcial y por tanto insuficiente ante una infección por leishmaniosis. Igualmente, se probaron las combinaciones de vacuna desventajosamente no en perros, el vehículo principal, sino en ratones. Es una desventaja adicional que los vehículos génicos sean plásmidos. Los plásmidos se obtienen mediante fermentación bacteriana. Por tanto, contienen además del gen deseado también el ADN necesario para su propagación y selección, habitualmente genes de resistencia frente a los antibióticos usados en la fermentación. En el uso de constructos de expresión génica basados en ADN de plásmido, existe por tanto el riesgo
15 inherente de proliferación de los genes de resistencia a antibióticos lo que, particularmente en campañas de vacunación de protección, no es justificable. En la práctica médica, las desventajas descritas de los vectores de expresión basados en plásmido se oponen a su amplia aplicación masiva.

20 A partir de este estado de la técnica, es por tanto objetivo de la presente invención poner a disposición un constructo de expresión de ADN o también varios constructos de expresión de ADN que puedan usarse para la preparación de un medicamento para inmunización eficaz contra la leishmaniosis.

El objetivo se consigue mediante las características de las reivindicaciones independientes.

- 25 Como constructos de expresión de ADN, se usan preferiblemente constructos de expresión génica definidos inmunológicamente mínimos según la invención, que se designan a continuación como vectores MIDGE (MIDGE®: vectores de Expresión Génica Inmunológicamente Definidos Mínimos, véanse los documentos EP 0.941.318 B1, US 6.451.593 B1). Los vectores MIDGE tienen la ventaja de que con ellos puede renunciarse a estructuras que no son esenciales para el efecto terapéutico.

30 Según la invención, se prevé particularmente que se use el antígeno inmunogénico p36 LACK en combinación con el antígeno proteína antioxidante específica de tiol de *Leishmania infantum* (TSA), el antígeno proteína 11 de membrana de cinetoplastidos de *Leishmania infantum* (Kmp-11) y el antígeno glicoproteína 63 (gp63) de *Leishmania infantum* para la obtención de una respuesta inmune.

35 En consecuencia, se prevé el uso de un constructo de expresión de ADN para la preparación de un medicamento para la inmunización contra infecciones por leishmaniosis, en el que el citado constructo de expresión de ADN contiene una o varias secuencias de ácido nucleico de codificación que conducen a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetoplastidos (Kmp-11).

40 Pero se prefiere también el uso de dos o tres constructos de expresión de ADN para la preparación de un medicamento para la inmunización contra infecciones por leishmaniosis, en el que los citados constructos de expresión de ADN contienen respectivamente una o varias secuencias de ácido nucleico de codificación que conducen conjuntamente a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetoplastidos (Kmp-11).

45 Según la invención, se prevé que al menos dos de los antígenos de *Leishmania infantum* se expresen como proteína de fusión. A este respecto, puede tratarse por un lado de la proteína de fusión, como producto de expresión, de gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA) y gen de proteína 11 de membrana de cinetoplastidos (Kmp-11). Consiguientemente, se prefiere también con respecto a los tres antígenos de *Leishmania infantum* distintos una proteína de fusión, como producto de expresión, de gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y gen de proteína 11 de membrana de cinetoplastidos (Kmp-11).

50 A este respecto, es posible cualquier serie/disposición de genes o de la dirección de lectura, a saber por ejemplo [TSA-Kmp-11], pero también [Kmp-11-TSA] o [TSA-gp63-Kmp-11] o [TSA-Kmp-11-gp63] o [Kmp-11-TSA-gp63] y demás.

55 Por tanto, se prevé así igualmente un constructo de expresión génica que codifica proteínas de fusión eventualmente distintas. La proteína de fusión está compuesta como se ha descrito por una combinación de al menos dos de los antígenos citados (TSA, Kmp-11). La proteína de fusión doble se utiliza en combinación con el antígeno gp63.

60 Sin embargo, la proteína de fusión puede estar compuesta también como se ha descrito por tres antígenos. Se trata entonces de una combinación de antígenos TSA, Kmp-11 y gp63.

Además, se prefiere un uso en el que adicionalmente a los productos de expresión de ADN descritos, independientemente de si las proteínas de fusión se expresan o no, está contenido un constructo de expresión de ADN para la

expresión del antígeno p36 LACK de *Leishmania*. El antígeno p36 LACK puede añadirse por tanto opcionalmente a este cóctel.

Como vehículo génico, se usa un módulo de expresión MIDGE cerrado covalentemente bicatenario lineal. Las secuencias polinucleotídicas inmunizantes se presentan como constructos de expresión que están compuestos por moléculas de ácido desoxirribonucleico lineales cerradas covalentemente que presentan una zona bicatenaria lineal, en la que las cadenas individuales que forman la doble cadena están ligadas por cortos bucles monocatenarios de desoxirribonucleótidos, y en la que las cadenas individuales que forman la doble cadena están compuestas sólo por la secuencia de codificación bajo el control de un promotor operativo en el animal a vacunar y una secuencia terminadora. El módulo de expresión está compuesto así por la secuencia de codificación, el promotor y eventualmente una secuencia de terminación, de modo que el constructo sólo contiene la información necesaria para la expresión del gen deseado, lo que en última instancia evita la desventaja del origen vírico del vehículo génico. Además, se prevé según la invención que el (o los) constructo(s) de expresión de ADN esté(n) conjugado(s) para aumentar la eficacia de transfección respectivamente con un oligopéptido de 3 a 30 aminoácidos, estando el oligopéptido compuesto a la mitad por aminoácidos básicos del grupo de arginina y lisina. Se prefieren especialmente:

- la secuencia peptídica representativa de una señal de localización nuclear (señal de localización nuclear=NLS) PKKKRKV (prolina-lisina-lisina-lisina-arginina-lisina-valina) del virus de simio SV-40. Se ha mostrado, especialmente para la SV-40-NLS, que dirige las proteínas de hasta 465 kDa al núcleo celular (Lanford *et al.*, 1986, *Cell* 15; 46(4): 575-582). Esta capacidad del péptido se ha aprovechado aquí mediante el acoplamiento a ADN para la mejora de la transferencia génica.
- o el fragmento de péptido T largo de 11 aminoácidos YGRKKRRQRRR del producto génico TAT de VIH-1.

Se prefieren por tanto como componente de los constructos de expresión oligopéptidos que refuerzan la eficacia de transfección de vacunas de ADN, por ejemplo, péptidos y proteínas catiónicos.

Las secuencias polinucleotídicas de codificación se pueden presentar también en un vector de expresión bicatenario circular.

Es conocido que mediante la optimización del uso de codón en el constructo de expresión a los codones usados preferiblemente en mamíferos, puede aumentar considerablemente la expresión de proteínas (Grantham *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 1980, 9: 1893-1912). Para expresar más antígeno *in vivo* y por tanto activar una respuesta inmune más fuerte que muestre una protección eficaz y duradera ante la infección por leishmaniosis, se optimizó la secuencia de tipo silvestre de gp63. Por optimización debe entenderse la adaptación de codón, también designada como "optimización del uso de codón". Para ello, se desarrolló una estrategia de clonación que posibilitó la síntesis de esta secuencia de ADN optimizada de gp63 a partir de oligonucleótidos.

Según la invención, se optimizaron por tanto los codones de la secuencia del antígeno gp63 de *Leishmania infantum* (SEC N° ID 5). Por lo tanto, se prefiere igualmente un constructo de expresión de ADN que presente esta secuencia.

Los constructos de expresión de ADN según la invención sirven para la preparación de una vacuna para el tratamiento de enfermedades de infección por leishmaniosis y son parte componente de la correspondiente vacuna.

La vacuna puede comprender secuencias de ácido nucleico inmunoestimulantes (SAI). Las secuencias de ácido nucleico inmunoestimulantes, que contienen motivos CpG, comprenden una cadena circular de ácido desoxirribonucleico con una secuencia de bases antiparalela complementaria parcialmente. Las secuencias de ácido nucleico inmunoestimulantes pueden tener forma lobular.

Es concebible igualmente la combinación de la vacuna según la invención con compuestos mejoradores de la transfección como, por ejemplo, PEI (polietilenimina).

Para la transfección, pueden utilizarse procedimientos biológicos, químicos y/o físicos que pertenecen al estado de la técnica, por ejemplo, transfección mediante transferencia balística o electroporación. La transfección puede realizarse mediante inyección intradérmica con jeringuilla o dispositivos de inyección sin aguja.

El protocolo de secuencias adjunto, que es parte componente de la solicitud y la presente descripción, reproduce las siguientes secuencias.

ID SEC	Nombre/descripción de secuencia
SEC N° ID 1	Secuencia de ADN del gen de la proteína 11 de membrana de cinetoplástidos (Kmp-11) de <i>Leishmania infantum</i>
SEC N° ID 2	Secuencia de proteína del antígeno proteína 11 de membrana de cinetoplástidos (Kmp-11) de <i>Leishmania infantum</i>
SEC N° ID 3	Secuencia de ADN del gen de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA) de <i>Leishmania infantum</i>
SEC N° ID 4	Secuencia de proteína del antígeno proteína antioxidante específica de tiol (TSA) de <i>Leishmania infantum</i>
SEC N° ID 5	Secuencia de ADN del antígeno glicoproteína 63 (gp63) de <i>Leishmania infantum</i> de codón optimizado
SEC N° ID 6	Secuencia de proteína del antígeno glicoproteína 63 (gp63) de <i>Leishmania infantum</i> de codón optimizado
SEC N° ID 7	Secuencia de ADN del antígeno p36 (LACK) de <i>Leishmania infantum</i>
SEC N° ID 8	Secuencia de proteína del antígeno p36 (LACK) de <i>Leishmania infantum</i>
SEC N° ID 9	Secuencia de localización nuclear (secuencia peptídica) de SV40
SEC N° ID 10	Fragmento de péptido T largo del producto génico TAT de VIH-1 (péptido-TAT)
SEC N° ID 11 a SEC N° ID 36	Oligómeros de ADN sintético como se describen a continuación

Están contenidas otras medidas ventajosas en las demás reivindicaciones subordinadas. La invención se describe detalladamente y se discute a continuación mediante las figuras y ejemplos de realización.

El sorprendente efecto de la combinación según la invención de constructos de expresión de ADN y un medicamento que contiene una de dichas combinaciones se observa claramente mediante las representaciones según las Figuras. A este respecto, significan:

MIDGE-NLS p36	MIDGE acoplado con NLS que codifica el antígeno p36 LACK
MIDGE-NLS TSA	MIDGE acoplado con NLS que codifica el antígeno TSA
MIDGE-NLS gp63	MIDGE acoplado con NLS que codifica el antígeno gp63
MIDGE-NLS Kmp-11	MIDGE acoplado con NLS que codifica el antígeno Kmp-11
pMCVp36	plásmido que codifica el antígeno p36 LACK
pMCV TSA	plásmido que codifica el antígeno TSA
pMCV gp63	plásmido que codifica el antígeno gp63
pMCV Kmp-11	plásmido que codifica el antígeno Kmp-11.

Se muestra:

Fig. 1: Desarrollo de las lesiones en la semana 8 después de la exposición a la infección en ratones. Significan en ésta:

L+K: LACK en combinación con Kmp-11

L+T: LACK en combinación con TSA

L+G: LACK en combinación con gp 63

K+T: Kmp-11 en combinación con TSA

K+G: Kmp-11 en combinación con gp63

T+G: TSA en combinación con gp63

T+G+L: TSA en combinación con gp63 y LACK

T+G+K: TSA en combinación con gp63 y Kmp-11

L+K+G: LACK en combinación con Kmp-11 y gp63

L+K+T: LACK en combinación con Kmp-11 y TSA

T+G+L+K: TSA en combinación con gp63, LACK y Kmp-11

PBS: grupo de control con PBS.

La Fig. 1 muestra las distintas combinaciones de los antígenos utilizados en ratones. Los puntos representan allí los datos de animales individuales, mientras que los brazos horizontales caracterizan el valor medio del correspondiente grupo. Los antígenos referidos se utilizaron respectivamente individualmente, en seis combinaciones de dos distintas, en cuatro combinaciones de tres distintas y en una combinación de cuatro. Como parámetro relevante para el éxito clínico de la vacunación, se midió el crecimiento de las lesiones causadas por la infección en las patas traseras infectadas de los animales. Se aplica el aumento de tamaño de las lesiones a las ordenadas en milímetros. Se representa en las abscisas las distintas combinaciones de antígeno. A este respecto, se muestra que, en el grupo de combinaciones de dos, la combinación de TSA con gp63 ofrece la mejor protección de vacuna. La siguiente protección mejor la ofrece la combinación de LACK con TSA. En el grupo de combinaciones de tres, el grupo LACK, Kmp-11 y TSA ofrece la mejor protección. El efecto de vacunación alcanzado se muestra en el tamaño claramente reducido de las lesiones formadas. La segunda mejor protección de vacunación la ofrece la combinación de antígenos TSA, gp63 y Kmp-11. En este grupo, se consigue un tamaño de lesión de 0,4 mm de media. Sin embargo, el valor de 0,5 mm representa el valor de hinchamiento a partir del cual las lesiones son perceptibles y evaluables claramente al ojo humano. Esto significa que los animales que se trataron con la combinación de TSA, gp63 y Kmp-11 no mostraron por definición lesiones o se encuentran evaluadas por debajo del límite de detección. En comparación con ello, los ratones no tratados del grupo de control mostraron un tamaño de lesión de 1,7 mm de media. Igualmente, apareció en estos animales un fuerte hinchamiento y enrojecimiento de las patas, síntomas que no se observaron igualmente en los grupos protegidos, y que representan claramente señales de inflamación como consecuencia de la infección.

Fig. 2: Determinación del título total de IgG en el animal diana perro antes de la exposición a la infección con promastigotos de *Leishmania infantum*. Significan en ésta:

Grupo 1: MIDGE-NLSp36 LACK

Grupo 2: MIDGE-NLS combinación de 4 antígenos

Grupo 3: plásmido combinación de 4 antígenos

Grupo 4: grupo de control: PBS

Los puntos representan los datos de los perros individuales, mientras que los brazos horizontales caracterizan el valor medio de los correspondientes grupos. La densidad óptica (DO) aumenta con la concentración de anticuerpo sérico. En la Figura 2, es visible una clara diferencia entre las concentraciones de anticuerpos anti-*Leishmania* de los grupos 1 y 2 por un lado y los grupos 3 y 4 por otro lado. Los perros del grupo 1, que se vacunaron con MIDGE-NLS-LACK, y los perros del grupo 2, que habían recibido la combinación de las cuatro secuencias antigénicas en MIDGE-NLS, exhibieron más anticuerpos contra *Leishmania infantum* que los grupos 3 y 4. Resulta notable que en el grupo 3 no fuera detectable ningún anticuerpo, aunque se usaron las mismas secuencias antigénicas que en el grupo 2. Esto muestra que la combinación de las cuatro secuencias antigénicas especialmente en asociación con vectores MIDGE-NLS es adecuada para la inducción de una respuesta inmune humoral. También en comparación con el grupo 1, los

perros del grupo 2 exhibieron de media más anticuerpos. A partir de ello puede llegarse a la conclusión de que la combinación de los cuatro antígenos representa una ventaja frente a la administración individual de LACK.

A continuación se detallan los resultados de ensayo, en particular:

Se ensayó la actividad en un ensayo de vacunación en ratones a distintas combinaciones de los antígenos utilizados para alcanzar la protección más alta posible contra infecciones por leishmaniosis. Como parámetro para el efecto protector alcanzado, se empleó la supresión del crecimiento de lesión por las combinaciones de vacuna utilizadas. Para la estimación del efecto protector, se llevó a cabo una exposición a la infección con promastigotos de *Leishmania infantum*. La estimación del crecimiento de la lesión se realizó semanalmente. Los resultados de la Figura 2 proceden de la semana 8 después de la exposición a la infección. Básicamente, todos los animales que se vacunaron con un antígeno o una combinación de dos antígenos desarrollaron lesiones más tempranas que los animales que se vacunaron con una combinación de tres o cuatro antígenos. Se consiguió un buen éxito de vacunación con la combinación de tres antígenos Kmp-11, TSA y p36 LACK. Se consiguió un efecto protector comparable con la combinación de antígenos TSA, gp63 y Kmp-11. El sorprendente éxito de vacunación fue visible en que, en ambas combinaciones de tres exitosas (TSA, gp63, Kmp-11 y p36 LACK, Kmp-11, gp63), el tamaño de las lesiones se encuentra por debajo del límite de detección de 0,5 mm y por tanto no desarrollaron lesiones visibles. Por ello, el tamaño de lesión en los animales vacunados es un 100% menor que en el grupo de control no vacunado.

TABLA 1

Composición de las combinaciones de antígenos en un ensayo de inmunización en ratones

<u>Grupo</u>	<u>Número de animales</u>	<u>Cantidad de ADN (en µg)</u>
1. MIDGE-NLS-p36 LACK+Kmp-11	9	50
2. MIDGE-NLS-p36 LACK+TSA	9	50
3. MIDGE-NLS-p36 LACK+gp63	9	50
4. MIDGE-NLS-Kmp-11+TSA	9	50
5. MIDGE-NLS-Kmp-11+gp63	9	50
6. MIDGE-NLS-TSA+gp63	9	50
7. MIDGE-NLS-TSA+gp63+p36 LACK	9	50
8. MIDGE-NLS-TSA-gp63+p36 LACK Kmp-11	9	50
9. MIDGE-NLS p36 LACK	9	50
10. MIDGE-NLS TSA	9	50
11. MIDGE-NLS Kmp-11	9	50
12. MIDGE-NLS gp63	9	50
13. MIDGE-NLS TSA+gp63+Kmp-11	9	50
14. MIDGE-NLS p36 LACK+Kmp-11+gp63	9	50
15. MIDGE-NLS p36LACK+Kmp-11+TSA	9	50
17. PBS	9	50

Cada grupo utilizó nueve ratones Balb/c hembra. Se vacunaron los animales con 50 µg de ADN. En las combinaciones de antígeno, la cantidad de ADN utilizado ascendió a 50 µg por antígeno. Después de 2 semanas, se realizó la segunda inmunización (recuerdo). Tres semanas después del recuerdo, se realizó la exposición a la infección con 5 x 10⁴ promastigotos de *Leishmania infantum* que se encontraban en fase estacionaria metacíclica. Se inyectaron estos en los animales por vía subcutánea en la pata trasera derecha. Se siguió el estado de la infección semanalmente. Se determinó el tamaño de las lesiones con un calibre móvil electrónico mediante comparación con la pata trasera izquierda no tratada. En un experimento de seguimiento en perros Beagle hembra de 4-12 meses de edad, se formularon igualmente distintas composiciones de vacuna que se diferencian en la combinación de antígeno usada. Los controles negativos, grupo 4, recibieron sólo tampón PBS y sirvieron como grupo de control de la infección. El grupo 1 estaba compuesto por sólo un antígeno, el antígeno p36 LACK. Este antígeno ha conducido en ensayos anteriores a una buena protección y debería ensayarse en el animal diana perro (L. López-Fuertes *et al.*, 2002, *Vaccine* 21: 247-257). El grupo 3 estaba

ES 2 298 829 T3

compuesto por distintos plásmidos que codificaban los antígenos de *Leishmania infantum*: TSA, Kmp-11, gp63 y p36 LACK. Este grupo sirve como comparación de vector y de efecto con el grupo 2, que está compuesto por la misma combinación de antígenos, pero contiene MIDGE acoplados a péptido como vectores.

- 5 Se han agrupado 4 grupos de vacunación respectivamente de 6 animales que se han inmunizado cuatro veces por vía intradérmica con un intervalo de 15 días respectivamente con 200 μ g de ADN por constructo (véase la Tabla 3). Antes del inicio del experimento, y después de cada inmunización, se extrajo sangre a los animales, además de los análisis de medicina veterinaria rutinarios, para análisis serológicos.
- 10 Para establecer qué tipo de respuesta inmune se produce mediante la vacunación o una infección, son utilizables distintos procedimientos. A los procedimientos que permiten la conclusión de una respuesta inmune celular pertenece el ensayo de “hipersensibilidad retardada”, que también se designa como ensayo de “hipersensibilidad de tipo retardado” (ensayo DTH). Mediante la medida del grosor de la piel en el sitio de inyección 72 horas después de la administración de antígeno, puede determinarse con relativa exactitud si se ha realizado una reacción de hipersensibilidad retardada y por tanto una reacción específica de células T por el antígeno. Los resultados se representan a
- 15 continuación en la Tabla 2.

<u>Grupo</u>	<u>Perros</u>	<u>Ensayo DTH</u> <u>antes de la</u> <u>vacunación</u>	<u>Ensayo DTH</u> <u>después de la</u> <u>vacunación</u>
MIDGE-NLSp36 LACK	1	-	+
	2	-	-
	3	-	-
	4	-	+
	5	-	-
	6	-	-
MIDGE-NLS TSA, p36, Kmp-11, gp36	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+(?)
	4	-	-
	5	-	+
	6	-	+
Plásmido TSA, p36 LACK, Kmp-11, gp36	1	-	+
	2	-	+
	3	-	-
	4	-	++
	5	-	-
	6	-	+
Tampón PBS	1	-	-
	2	+	-
	3	-	+
	4	-	+(?)
	5	-	-(?)
	6	-	-

La Tabla 2 muestra los resultados del ensayo de “hipersensibilidad retardada”, que se designa también como ensayo de “hipersensibilidad de tipo retardado” (ensayo DTH). Se evalúa un hinchamiento dérmico local como positivo del ensayo DTH (en la figura caracterizado por “+” o “++”) y se muestra que el animal afectado crea células T de memoria específicas de antígenos como consecuencia de la vacunación, y por tanto ha tenido lugar una respuesta inmune celular. Como se ha descrito, la respuesta inmune celular es decisiva en la profilaxis y terapia de enfermedades por leishmaniosis. Antes del inicio del experimento, se llevó a cabo el DTH para asegurar que ninguno de los animales de ensayo hubiera creado ya una respuesta inmune celular contra *L. infantum* como consecuencia de una infección/vacunación anterior. Todos los animales excepto uno reaccionaron en el ensayo DTH negativamente, y cumplieron por tanto el requisito para el ensayo. Una reacción positiva después de la terminación de la inmunización significa que la inmunización ha conseguido una respuesta inmune celular específica contra *Leishmania infantum*. Esto ha de valorarse como un éxito de vacunación y deja esperar una mejor protección contra infecciones.

Después de la última vacunación, se vuelve a llevar a cabo un ensayo DTH. Aquí se esperaba que posiblemente todos los animales vacunados reaccionaran positivamente. Ya que el animal anteriormente positivo reaccionó ahora negativamente, ha de suponerse que también era negativo en el primer ensayo DTH y que se trataba de un error en la interpretación del resultado.

Se caracterizó adicionalmente la respuesta inmune generada por las vacunaciones mediante ensayos serológicos. En la Figura 2, se representan los resultados del análisis ELISA de anticuerpos específicos contra *Leishmania infantum* en suero de perros inmunizados. En general, las concentraciones de anticuerpo en los sueros de los perros vacunados no eran muy altas. Este resultado corresponde con las expectativas, ya que la inmunización se dirige más a una respuesta inmune celular que a una humoral.

TABLA 3

Composición de los grupos de vacunación en el ensayo de inmunización contra *Leishmania infantum* en perros

Grupo	Antígeno usado	Número de animales	Cantidad de ADN	Volumen administrado
1	MIDGE-NLSp36 LACK	6	200 µg por constructo	500 µl por animal
2	MIDGE-NLS-TSA, MIDGE-NLS-Kmp-11, MIDGE-NLS-gp63, MIDGE-NLS-p36 LACK	6	200 µg por constructo	500 µl por animal
3	pCMV-TSA, pMVC-Kmp-11, pMCV-gp63, pMCV-p36, LACK MIDGE	6	200 µg	500 µl por animal
4	Tampón PS	6	-	500 µl por animal

El éxito de la inmunización es describible mediante una reacción de exposición de los animales al patógeno. Cuatro semanas después de la última inmunización, tuvo lugar por tanto una exposición a la infección por vía intravenosa con 5×10^7 promastigotos de *Leishmania infantum*. El grado de infección, y por tanto la protección alcanzada por la vacunación, se comprobó mediante análisis de patología clínica. Entre estos, se cuentan el análisis del hinchamiento de los ganglios linfáticos de la fosa poplítea, la pérdida de peso, la degeneración con cambio asociado del color de los músculos, el crecimiento de uñas excesivo, lesiones de la piel así como cambios en el hemograma. La existencia y la cantidad de patógeno se determinan mediante una reacción de PCR cuantitativa. En la comparación de los grupos 11 meses después de la exposición a la infección con respecto a la aparición de síntomas clínicos, resulta el siguiente cuadro: es observable una diferencia clara entre el grupo 2 y el grupo de control. En el grupo 2, enfermó sólo 1 perro de leishmaniosis, mientras que en el grupo de control enfermaron 4 de 6 perros de leishmaniosis. También en el grupo 1, se redujo claramente el número de perros enfermos frente al grupo de control, mientras que el grupo 3 presentaba sólo una pequeña diferencia con el grupo de control. La comparación directa del efecto de MIDGE-NLS con plásmido que codifica exactamente los mismos antígenos (grupo 2 y grupo 3) muestra que con MIDGE-NLS se conseguía una mejor protección contra leishmaniosis que la posible con plásmido. Los resultados de ensayo permiten la conclusión de que la inmunización de perros contra leishmaniosis con una combinación de los cuatro antígenos codificados por MIDGE-NLS puede reducir el desarrollo de los síntomas clínicos de la leishmaniosis en perros. Según el estado del

ES 2 298 829 T3

conocimiento del solicitante, se ha descrito hasta ahora un buen resultado por Ramiro *et al.* (*Vaccine* 3696, 2003: 1-11) comparable al conseguido con la vacuna según la invención MIDGE-NLS que codifica 4 antígenos. Sin embargo, a diferencia de la MIDGE-NLS, en el estudio de Ramiro *et al.* se usa un virus Vaccinia recombinante (rVV) como vacuna de recuerdo. En el virus Vaccinia recombinante, se trata de virus modificados genéticamente que representan
5 conocidamente un alto riesgo para la seguridad (Lehrman, 1999, *Nature* 401: 517-518).

Ejemplos de realización

10 Ejemplo 1

Clonación del plásmido pMCVp36

Se amplificaron dos fragmentos mediante PCR a partir del plásmido de partida pSCp36:

15 1ª PCR de aproximadamente 800 pb:

Cebador izquierdo: 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT

20 Cebador derecho: 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCG

2ª PCR de aproximadamente 950 pb:

25 Cebador izquierdo: 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT,

Cebador derecho: 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG

El producto de PCR de la 2ª PCR se cortó con Eco311 y se aisló el fragmento menor (aprox. 200 pb).

30 El producto de PCR de la 1ª PCR se cortó con Bpil.

Se ligaron conjuntamente el fragmento de 200 pb y el fragmento cortado de la 1ª PCR y a continuación se cortaron con KpnI y SacI y se ligaron con el vector pMOK cortado con KpnI y SacI. El plásmido obtenido recibió el nombre
35 de pMCVp36.

Ejemplo 2

40 *Clonación del plásmido pMCVKmp-11*

Se amplificó el gen mediante PCR a partir de ADNc de *Leishmania infantum*. Se clonó el producto de PCR después de digestión con KpnI y XhoI en el vector pMCV1.4 igualmente cortado y se secuenció. Se denominó al plásmido formado pMCVKpm11.

45 Cebador izquierdo: 5'-ATTATAGGTACCATGGCCACCACGTACGAG

Cebador derecho: 5'-TTAATTCTCGAGTTACTTGGATGGGTACTGCG

50 Ejemplo 3

Clonación del plásmido pMCVTSA

55 Se amplificó el gen mediante PCR a partir de ADNc de *Leishmania infantum* y se separó una secuencia de reconocimiento Eco311 mediante la inserción de un intercambio de bases, sin cambiar la secuencia de aminoácidos. Se clonó el producto de PCR terminal después de digestión con KpnI y XhoI en el vector pMCV1.4 igualmente cortado y se secuenció. Se denominó al plásmido formado pMCVTSA.

60 Cebador izquierdo: 5'-AATTATGGTACCATGTCCTGCGGTAACGCCAAGATC

Cebador derecho: 5'-AATATACTCGAGTTACTGCTTGCTGAAGTATCCTTCGAC

Cebador de mutación izquierdo: 5'-TACCGCGGTCTCTTCATCATCG

65 Cebador de mutación derecho: 5'-ATTGGGGGTCTCGATGAATAGACCGCGGTAGG

Ejemplo 4

Estrategia de clonación para la optimización del uso de codón de gp63

Se encargaron los oligonucleótidos con una longitud de 18 y 28 bases (MWG Biotech). Se unieron dos veces entre sí 90 oligonucleótidos que reproducen respectivamente la cadena con sentido y la cadena antisentido mediante apareamiento y ligación. Los oligonucleótidos apareados generaron respectivamente dos protuberancias de 4 bases. Se tuvo cuidado de que las protuberancias sólo aparecieran una vez y no fueran palindrómicas. Se aparearon los oligonucleótidos mezclando ambos oligonucleótidos individuales (cadena y anticadena) con tampón cinasa calentado aproximadamente a 80°C, y después se enfriaron lentamente hasta temperatura ambiente. Después, se añadieron ATP y polinucleótido cinasa (PNK) y se fosforilaron los oligonucleótidos durante 1 hora. A continuación, se mezclaron conjuntamente en una primera etapa los oligonucleótidos respectivamente adyacentes y se ligaron (oligonucleótido 1+2, oligonucleótido 3+4). Después de 1 h de ligación, se mezclaron conjuntamente una alícuota de la preparación de ligación del oligonucleótido 1+2 y una alícuota de la preparación de ligación 3+4. Esto se llevó a cabo con las distintas preparaciones de ligación hasta una longitud del producto de ligación de aproximadamente 300 pb. Se utilizó una alícuota de la última etapa de ligación respectiva como molde en una PCR con cebadores flanqueantes. Se sometió a clonación intermedia el producto de PCR en el vector de clonación TOPO-TA (Invitrogen) y se secuenció. Esto se realizó con 6 fragmentos en total del gen completo. Los 6 fragmentos individuales se cortaron con Eco311 a partir del plásmido clonado intermedio y se ligaron entre sí. Se amplificó el producto de ligación total de longitud correcta en una PCR terminal, se digirió con KpnI y SacI y se clonó en el vector pMCV1.4 igualmente cortado después de extracción de gel. A continuación, se controló la secuencia mediante secuenciación. El plásmido formado se denominó pMCVgp63.

Cebadores para los 6 fragmentos mezclados conjuntamente:

Fragmento 1:

Cebador izquierdo: ATTATTGGTACCATGTCTGTGGACT

Cebador derecho: TTATATGGTCTCTCTCAGGGCTCCCCAGTTG

Fragmento 2:

Cebador izquierdo: ATTATAGGTCTCCTGAGAATTGCTGTGTCCACAGAG

Cebador derecho: TTATATGGTCTCACAGAGGCCACATACATCACAA

Fragmento 3:

Cebador izquierdo: TATTATGGTCTCCTCTGTGCCCTCTGAGGAGGGAGTGCTGGCC

Cebador derecho: AATTATGGTCTCCTCAATCTCCAGGTACTCCAGG

Fragmento 4:

Cebador izquierdo: ATTATAGGTCTCATTGAGGACCAGGGAGGAG

Cebador derecho: TAATATGGTCTCGTGTCTGGTCACTCCACACTTG

Fragmento 5:

Cebador izquierdo: ATTATAGGTCTCGACACCCAGACCTGCCCC

Cebador derecho: TTATATGGTCTCGGGGTGCAGTTGGCATAGCC

Fragmento 6:

Cebador izquierdo: ATATATGGTCTCCACCCCAGGCCTGAGAGTGG

Cebador derecho: TAATATGAGCTCCTACAGGGCCACAGCCAGCAGG

Secuencia total

Cebador izquierdo: ATTATTGGTACCATGTCTGTGGACT

5 Cebador derecho: TAATATGAGCTCCTACAGGGCCACAGCCAGCAGG

Ejemplo 5

Acoplamiento de la secuencia de NLS a los oligonucleótidos

10 Se realiza el acoplamiento de NLS como sigue: se acopló el péptido NLS con la secuencia PKKKRKV en dos etapas a los ODN. En primer lugar, se activó el oligonucleótido modificado 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (en el que xT representa bases de timina aminomodificadas con un aminoengarce C₂= ODN1) (0,1 mM) con sulfo-KMUS (5 mM) en PBS a temperatura ambiente (TA). Después de 120 minutos, se detuvo la reacción con tris (hidroximetil)aminometano 50 mM y se obtuvo el ODN activado después de precipitación con etanol (NaOAc 300 mM, pH 5,2, MgCl₂ 5,5 mM, 70% de etanol), centrifugación y lavado una vez con etanol al 70%. Se disolvió el ODN así obtenido (0,1 mM) en PBS y se hizo reaccionar con el péptido (0,2 mM) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se ensayó la reacción mediante electroforesis en gel (al 3%) y coloración con bromuro de etidio. Se purificó el ODN acoplado a NLS formado por HPLC y se usó para la síntesis de los constructos de antígeno MIDGE-NLS.

Ejemplo 6

Preparación de MIDGE-NLSp36

25 Los MIDGE son módulos de expresión lineales cerrados covalentemente que están compuestos únicamente por el promotor CMV, un intrón, la correspondiente secuencia génica y una secuencia de poliadenilación (véase el documento EP 0.941.318 B1). Se obtuvieron los constructos como sigue: se digirió totalmente el plásmido pMCVp36 descrito en el ejemplo 1.1 con Eco311. Se detuvo la ligación con oligodesoxinucleótidos (ODN) de forma lobular 5'-fosforilados 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (=ODN1) y 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (=ODN2) mediante ADN ligasa T4 en presencia de Eco311 mediante calentamiento a 70°C. Se concentró la mezcla resultante y se trató con Eco311 y ADN ligasa T7 en presencia de trifosfatos de desoxirribonucleótido. Se realizó la purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico.

35 Se realizó la preparación de MIDGE-NLS-TSA, -Kmp-11 y -p63 análogamente.

Ejemplo 7

40 *Ensayo DHT*

Ensayo de "hipersensibilidad retardada" que se designa también como ensayo de "hipersensibilidad de tipo retardado" (ensayo DTH). Se administra en este ensayo al animal vacunado una cantidad muy pequeña de antígeno en las capas superiores de la piel. Antes, se mide exactamente el grosor de la piel en el lugar de administración. A continuación, se observa si la piel en el sitio de inyección sufre cambios inflamatorios. Es característica de una reacción inmune causada por células T sensibilizadas ante el antígeno una reacción de inflamación que es detectable sólo después de 48 a 72 horas. Los síntomas clínicos como hinchamiento dérmico local, enrojecimiento y eventual dolor pueden atribuirse al efecto de las citocinas. Se evalúa un hinchamiento dérmico local como positivo del ensayo DTH (en la tabla 1, caracterizado con "+" o "++") y se muestra que el animal afectado ha generado células T de memoria específicas de antígeno a consecuencia de la vacunación.

Ejemplo 8

55 *Determinación de los anticuerpos totales después de la inmunización*

En la Fig. 2, se representan los resultados de la detección por ELISA de anticuerpos específicos contra *Leishmania infantum* en suero de perros inmunizados. Antes de la exposición a la infección, se obtuvieron los sueros de todos los perros. La determinación del título total de anticuerpos IgG se realizó mediante ELISA, en la que se determinó la absorción en DO (densidad óptica) a una longitud de onda de $\lambda = 406$ nm.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un constructo de expresión de ADN para la preparación de un medicamento para la inmunización contra infecciones por leishmaniosis, en el que el citado constructo de expresión de ADN contiene una o varias secuencias de ácido nucleico de codificación que conducen a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).
2. Uso de dos o tres constructos de expresión de ADN para la preparación de un medicamento para la inmunización contra infecciones por leishmaniosis, en el que los citados constructos de expresión de ADN contienen una o varias secuencias de ácido nucleico de codificación que conducen conjuntamente a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).
3. Uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que al menos dos de los antígenos de *Leishmania infantum* se expresan como proteína de fusión.
4. Uso según la reivindicación 3, en el que la proteína de fusión es el producto de expresión del gen de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA) y el gen de la proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).
5. Uso según la reivindicación 3 y 1, en el que la proteína de fusión es el producto de expresión del gen de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA), el gen de la glicoproteína gp63 y el gen de la proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).
6. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en el que está contenido adicionalmente un constructo de expresión de ADN para la expresión del antígeno de *Leishmania* p36 LACK.
7. Uso según al menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las secuencias polinucleotídicas de codificación se presentan como constructos de expresión que están compuestos por moléculas de ácido desoxirribonucleico lineales cerradas covalentemente que presentan una zona bicatenaria lineal, en la que las cadenas individuales que forman la doble cadena están ligadas por cortos bucles monocatenarios de desoxirribonucleótidos, y en la que las cadenas individuales que forman la doble cadena están compuestas sólo por la secuencia de codificación bajo el control de un promotor operativo en el animal a vacunar y una secuencia terminadora.
8. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que las secuencias polinucleotídicas de codificación se presentan en un vector de expresión bicatenario circular.
9. Uso según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que el constructo de expresión de ADN está unido covalentemente a uno o varios oligopéptidos para aumentar la eficacia de transfección.
10. Uso según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que los constructos de expresión de ADN están conjugados respectivamente con un oligopéptido de 3 a 30 aminoácidos, estando el oligopéptido compuesto a la mitad por aminoácidos básicos del grupo de arginina y lisina.
11. Uso según la reivindicación 10, en el que los oligopéptidos conjugados presentan la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR.
12. Uso según al menos una de las reivindicaciones precedentes, en el que los constructos de expresión de ADN lineales cerrados covalentemente están modificados con un péptido que contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) del antígeno T grande de SV40 con la secuencia de aminoácidos PKKKRKV.
13. Uso de un constructo de expresión de ADN para la preparación de una vacuna para el tratamiento de enfermedades infecciosas por leishmaniosis, en el que dicho constructo de expresión de ADN contiene una o varias secuencias de ácidos nucleicos de codificación que conducen a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).
14. Uso de dos o tres constructos de expresión de ADN para la preparación de una vacuna para el tratamiento de enfermedades infecciosas por leishmaniosis, en el que dichos constructos de expresión de ADN contienen respectivamente una o varias secuencias de ácidos nucleicos de codificación que conducen conjuntamente a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).
15. Constructo de expresión de ADN que contiene una o varias secuencias de ácido nucleico de codificación que conducen a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA), glicoproteína gp63 y proteína 11 de membrana de cinetopláستidos (Kmp-11).

ES 2 298 829 T3

16. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 15, en el que los productos génicos se expresan como una proteína de fusión única.

5 17. Constructo de expresión de ADN que contiene una o varias secuencias de ácido nucleico de codificación que conducen a la expresión de los antígenos de *Leishmania infantum* gen de proteína antioxidante específica de tiol (TSA) y proteína 11 de membrana de cinetoplastidos (Kmp-11).

10 18. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 17, en el que los productos génicos se expresan como una proteína de fusión única.

19. Constructo de expresión de ADN según al menos una de las reivindicaciones 15-18, presentándose el constructo de expresión como una molécula de ácido desoxirribonucleico lineal cerrada covalentemente que presenta una zona bicatenaria, en la que las cadenas individuales que forman la doble cadena están ligadas por cortos bucles monocatenarios de desoxirribonucleótidos, y en la que las cadenas individuales que forman la doble cadena están compuestas sólo por la secuencia de codificación bajo el control de un promotor operativo en el animal a vacunar y una secuencia terminadora.

20 20. Constructo de expresión de ADN según al menos una de las reivindicaciones 15-18, en el que las secuencias polinucleotídicas de codificación se presentan en un vector de expresión bicatenario circular.

21. Constructo de expresión de ADN según al menos una de las reivindicaciones 15-20, en el que el constructo de expresión de ADN está ligado covalentemente con uno o varios oligopéptidos para aumentar la eficacia de transfección.

25 22. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 21, estando el constructo de expresión de ADN conjugado con un oligopéptido de 3 a 30 aminoácidos, y el oligopéptido está compuesto a la mitad por aminoácidos básicos del grupo de arginina y lisina.

30 23. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 22, en el que el oligopéptido conjugado presenta la secuencia de aminoácidos YGRKKRRQRRR.

24. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 21, estando el constructo de expresión de ADN lineal cerrado covalentemente modificado con un péptido que contiene la secuencia de localización nuclear (NLS) del antígeno T grande de SV40 con la secuencia de aminoácidos PKKKRKV.

35 25. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 15 ó 16, en el que la secuencia para gp63 está optimizada a nivel de codón.

26. Constructo de expresión de ADN según la reivindicación 25, que contiene la secuencia SEC N° ID 5.

40 27. Vacuna para el tratamiento de enfermedades infecciosas por leishmaniosis que contiene un constructo de expresión de ADN según una o varias de las reivindicaciones 15 a 26.

28. Vacuna según la reivindicación 27, que contiene adicionalmente coadyuvantes y/o secuencias de ácido nucleico inmunoestimulantes con uno o varios motivos CpG.

45 29. Vacuna según la reivindicación 28, en la que las secuencias de ácido nucleico inmunoestimulantes se presentan como ácidos desoxirribonucleicos de cadena circular con una secuencia de bases antiparalela complementaria parcialmente.

50

55

60

65

Fig. 1:

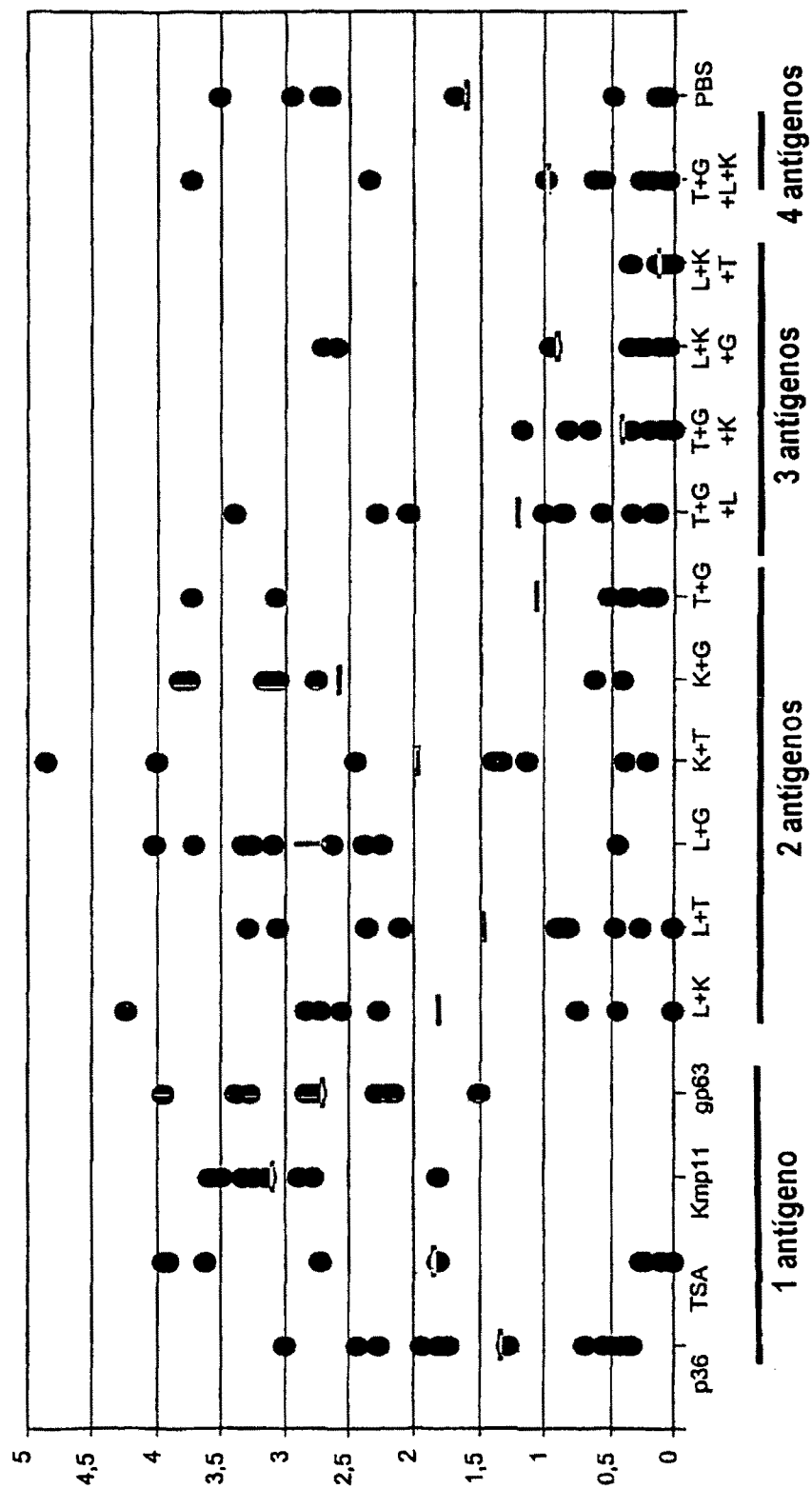
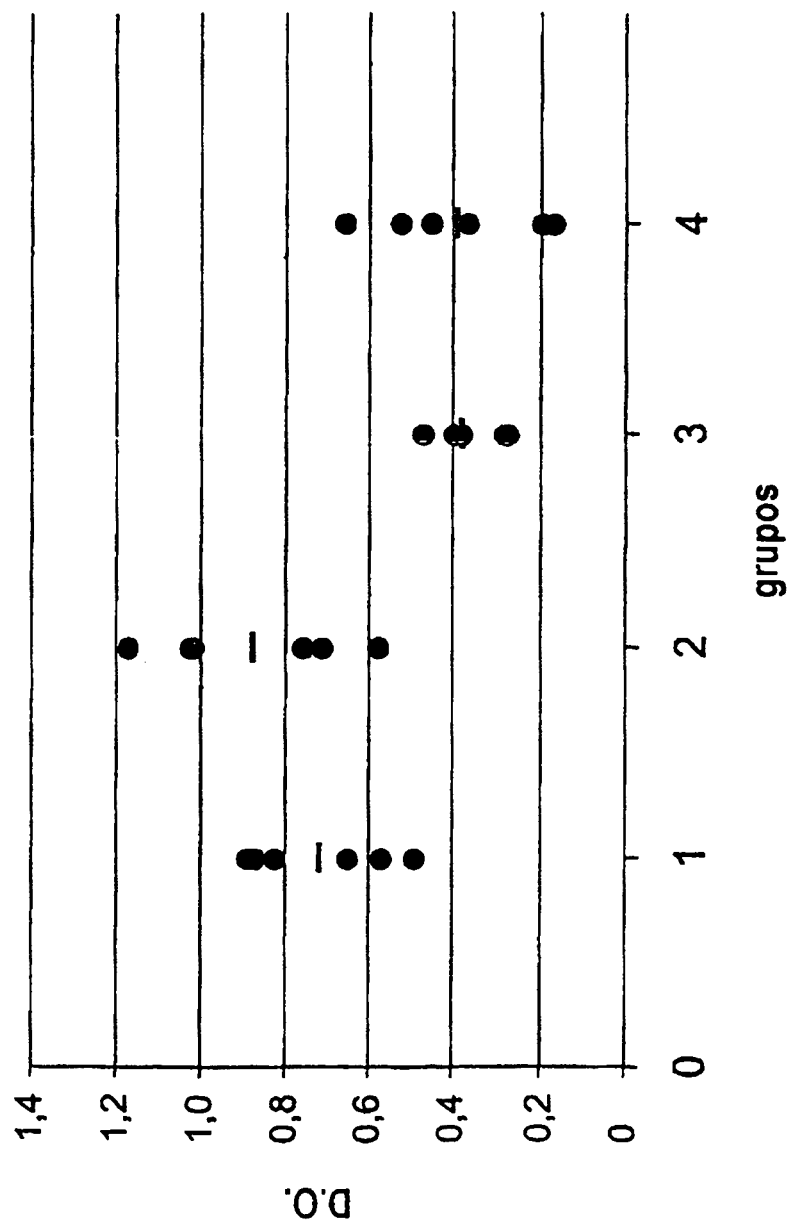


Fig. 2:



ES 2 298 829 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Mologen AG
 <120> AGENTE PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES POR LEISHMANIOSIS
 <130> XI 1827-03
 <150> EP 03090368.6
 <151> 22-10-2004
 <150> EP 03090368.6
 <151> 22-10-2003
 <160> 36
 <170> PatentIn versión 3.3
 <210> 1
 <211> 279
 <212> ADN
 <213> *Leishmania infantum*
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> secuencia de ADN del gen de la proteína 11 de membrana de cinetoplástidos de *Leishmania infantum* (kmp-11)
 <400> 1

```

30      atggccacca cgtacgagga gttttcggcg aagctggacc gcctggatga ggagttcaac      60
      aggaagatgc aggagcagaa cgccaagttc tttgcggaca agccggatga gtcgacgctg      120
      tcgcccgaga tgaaggagca ctacgagaag ttcgagcgca tgatcaagga acacacagag      180
35      aagttcaaca agaagatgca cgagcactcg gagcacttca agcagaagtt cgccgagctg      240
      ctcgagcgagc agaaggctgc gcagtaccca tccaagtaa      279
  
```

<210> 2
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> *Leishmania infantum*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de proteína de la proteína 11 de membrana de cinetoplástidos de *Leishmania infantum* (kmp-11)
 <400> 2

```

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

ES 2 298 829 T3

<210> 3
 <211> 600
 <212> ADN
 5 <213> *Leishmania infantum*
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <223> secuencia de ADN del antígeno de *Leishmania infantum* gen de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA)
 <400> 3

15	atgtcctgcg gtaacgccaa gatcaactgt cccgcgcgc ccttcgagga ggtggcgctc	60
	atgccccaacg gcagcttcaa gaagatcagc ctgcgcgcct acaagggcaa gtgggtcgtg	120
20	ctcttcttctt acccgctcga cttcaccttc gtgtgcccga cagagatcat cgcgttctcc	180
	gaaaacgtga gtcgcttcaa cgagctcaac tgcgaggtcc tcgcgtgctc catggacagc	240
	gagtacgcgc acctgcagtg gacgctgcag gaccgcaaga agggcggcct cggcgccatg	300
25	gcgattccaa tgctggccga caagaccaag agtatcgctc gtgcctacgg cgtgctggag	360
	gagaaacagg gcgtggccta ccgcgggtcta ttcattcatcg accccaatgg catggtgcgc	420
30	cagatcacccg tcaacgacat gccgggtgggc cgcaacgtgg aggaggttct gcgcctgctg	480
	gaggcttttc agttcgtgga gaagcacggc gaggtgtgcc ccgcgaactg gaagaagggc	540
	gccccacga tgaagccgga gccgaaggcg tctgtcgaag gatacttcag caagcagtaa	600

35 <210> 4
 <211> 199
 <212> PRT
 40 <213> *Leishmania infantum*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <223> secuencia de proteína de la proteína antioxidante específica de tiol (TSA) de *Leishmania infantum*

50

55

60

65

ES 2 298 829 T3

<400> 4

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

<210> 5

<211> 1800

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de ADN del antígeno gp63 de *Leishmania infantum* optimizada a nivel de codón

<400> 5

atgtctgtgg actcctcctc caccacaga cacagatctg tggctgccag actggtgaga 60
ctggctgcag ctggagctgc tgtgattgct gctgtgggca cagctgctgc ctgggcccatt 120
gctggagctg tgcagcacag atgcatccat gatgccatgc aggccagagt gagacagtct 180

ES 2 298 829 T3

	gtggccagac accacacagc cccaggagct gtgtctgctg tgggcctgcc ctatgtgacc	240
	ctggacacag ctgcagctgc agacagaaga ccaggctctg cccccacagt ggtgagagct	300
5	gccaactggg gagccctgag gattgctgtg tccacagagg acctgacaga cccagcctac	360
	cactgtgcc a gagggtggcca gcacatcaag agaagactgg gaggagtgg a catctgcaca	420
10	gctgaggaca tcctgacaga tgagaagaga gacatcctgg tgaagcacct gatccccag	480
	gccctgcagc tgcacacaga gagactgaaa gtgagacagg tgcaggacaa gtggaagggtg	540
	acaggcatgg gagatgatgt gtgctctgac ttcaagggtgc cccagccca catcacagat	600
15	ggcctgtcca acacagactt tgtgatgtat gtgacctctg tgccctctga ggagggagtg	660
	ctggcctggg ccaccatctg ccagggtgtt tctgatggcc acccaaccgt gggagtgatc	720
	aacatcccag ctgccaacat tgccctcaga tatgaccagc tggtgaccag agtggtgacc	780
20	catgagatgg cccatgccct gggcttctct gtgggcttct ttgagggagc cagaatcctg	840
	gagtccatct ccaatgtgag acacaaggac tttgatgtgc cagtgatcaa ctctccact	900
25	gctgtggcca aggccagaga gcagtatggc tgtgacaccc tggagtacct ggagattgag	960
	gaccagggag gagctggctc tgctggctcc cacatcaaga tgagaaatgc ccaggatgag	1020
	ctgatggccc cagctgcagc tgcaggctac tactctgccc tgaccacggc catcttccag	1080
30	gacctgggct tctaccaggc tgacttctcc aaggctgagg tgatgccctg gggcagaaat	1140
	gctggctgtg ccttctctgtc tgagaagtgc atggagagaa acatcaccca gtggccagcc	1200
35	atgttctgca atgagaatga ggtgaccatg agatgcccc cctccagact gtccctgggc	1260
	aagtgtggag tgaccagaca cccagacctg ccccccact ggagtgactt cacagacccc	1320
	tccctggctg gcatctctgc ctcatggac tgctgccag tggcggagcc ctatggagat	1380
40	ggctcctgtg cccagagagc ctctgaggct ggagccccct tcaagggtt caatgtgttc	1440
	tctgatgctg cccgatgcat tgatggagcc ttcagaccca agacctocca tggcatcatc	1500
	aagtcctatg ctggcctgtg tgccaatgtg agatgtgaca cagccaccag aacctactct	1560
45	gtgcagggtg atggaggctc tggctatgcc aactgcaccc caggcctgag agtggagctg	1620
	tccacagtgt cctctgcctt tgaggagggg ggctacatca cctgcccccc ctatgtggag	1680
50	gtgtgccagg gcaatgtgca ggctgccaa gatggaggca atgcagctgc tggcagaaga	1740
	ggccccagag ctgctgccac agccctgctg gtggctgccc tgctggctgt ggcctgtag	1800

55 <210> 6

<211> 599

<212> ADN

<213> Artificial

60 <220>

<223> secuencia de proteína del antígeno gp63 de *Leishmania infantum* optimizada a nivel de codón

65

ES 2 298 829 T3

<400> 6

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

ES 2 298 829 T3

	Arg	Val	Val	Thr	His	Glu	Met	Ala	His	Ala	Leu	Gly	Phe	Ser	Val	Gly	
						260				265					270		
5	Phe	Phe	Glu	Gly	Ala	Arg	Ile	Leu	Glu	Ser	Ile	Ser	Asn	Val	Arg	His	
			275					280					285				
10	Lys	Asp	Phe	Asp	Val	Pro	Val	Ile	Asn	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Ala	Lys	
		290					295					300					
	Ala	Arg	Glu	Gln	Tyr	Gly	Cys	Asp	Thr	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	
	305					310					315					320	
15	Asp	Gln	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Ala	Gly	Ser	His	Ile	Lys	Met	Arg	Asn	
					325					330					335		
20	Ala	Gln	Asp	Glu	Leu	Met	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Ser	
				340					345					350			
	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Ile	Phe	Gln	Asp	Leu	Gly	Phe	Tyr	Gln	Ala	Asp	
		355					360						365				
25	Phe	Ser	Lys	Ala	Glu	Val	Met	Pro	Trp	Gly	Arg	Asn	Ala	Gly	Cys	Ala	
		370					375					380					
30	Phe	Leu	Ser	Glu	Lys	Cys	Met	Glu	Arg	Asn	Ile	Thr	Glu	Trp	Pro	Ala	
	385				390						395					400	
	Met	Phe	Cys	Asn	Glu	Asn	Glu	Val	Thr	Met	Arg	Cys	Pro	Thr	Ser	Arg	
				405						410					415		
35	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys	Cys	Gly	Val	Thr	Arg	His	Pro	Asp	Leu	Pro	Pro	
			420						425					430			
40	Tyr	Trp	Gln	Tyr	Phe	Thr	Asp	Pro	Ser	Leu	Ala	Gly	Ile	Ser	Ala	Phe	
			435					440					445				
	Met	Asp	Cys	Cys	Pro	Val	Ala	Glu	Pro	Tyr	Gly	Asp	Gly	Ser	Cys	Ala	
45		450					455					460					
	Gln	Arg	Ala	Ser	Glu	Ala	Gly	Ala	Pro	Phe	Lys	Gly	Phe	Asn	Val	Phe	
	465					470					475					480	
50	Ser	Asp	Ala	Ala	Arg	Cys	Ile	Asp	Gly	Ala	Phe	Arg	Pro	Lys	Thr	Ser	
					485					490					495		
55	His	Gly	Ile	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ala	Gly	Leu	Cys	Ala	Asn	Val	Arg	Cys	
			500						505					510			

ES 2 298 829 T3

Asp Thr Ala Thr Arg Thr Tyr Ser Val Gln Val His Gly Gly Ser Gly
 515 520 525
 5 Tyr Ala Asn Cys Thr Pro Gly Leu Arg Val Glu Leu Ser Thr Val Ser
 530 535 540
 10 Ser Ala Phe Glu Glu Gly Gly Tyr Ile Thr Cys Pro Pro Tyr Val Glu
 545 550 555 560
 Val Cys Gln Gly Asn Val Gln Ala Ala Lys Asp Gly Gly Asn Ala Ala
 565 570 575
 15 Ala Gly Arg Arg Gly Pro Arg Ala Ala Ala Thr Ala Leu Leu Val Ala
 580 585 590
 20 Ala Leu Leu Ala Val Ala Leu
 595

<210> 7

25 <211> 939

<212> ADN

<213> *Leishmania infantum*

<220>

30 <221> misc_feature

<223> secuencia de ADN del antígeno p36 (LACK) de *Leishmania*

<400> 7

35

	atgaactacg aggggtcacct gaagggccac cgcggtatggg tcacctccct ggccctgcccg	60
	cagcagggcgg ggtcgtacat caaggtggtg tcgacgtcgc gcgatggcac ggccatctcg	120
40	tggaaagcca accccgaccg ccacagcgtg gacagcgact acgggtctgcc gagccaccgc	180
	ctcgagggcc acaccggctt cgtgtcgtgt gtgtcgttgg cccacgccac cgactacgcg	240
45	ctgaccgcgt cctgggaccg ctccatccgc atgtgggacc tgcgcaatgg ccagtgccag	300
	cgcaagtcc tgaagcacac caaggacgtg ctgcgcgtcg ccttctcgcc ggacgaccgc	360
	ctgatcgtgt ccgcggggccg cgacaacgtg atccgcgtgt ggaacgtggc gggcgagtgc	420
50	atgcacgagt tcctgcgcga cggccacgag gactgggtga gcagcatctg tttctcgccg	480
	tcgctggagc atccgatcgt ggtgtccggc agctgggaca acaccatcaa ggtatggaac	540
55	gtgaacgggg gcaagtgtga gcgcacgctc aagggccaca gcaactacgt gtccacgggtg	600
	acgggtgtcgc cagacgggtc gctgtgcgcg tccggcggca aggacggcgc ggcgtgctg	660
	tgggacctga gcaccggcga gcagctgttc aagatcaacg tggagtcgcc catcaaccag	720
60	atgcgccttct cgcccaaccg cttctggatg tgcgtcgcga cggagaggtc cctgtccgtg	780
	tacgacctgg agagcaaggc tgtgattgcg gagctgacgc cggacggcgc gaagccgtcc	840
65	gagtgcattc ccattgcctg gtccgccgac ggcaacactc tgtactccgg tcacaaggac	900
	aacctgatcc gcgtgtggtc catctccgac gccgagtaa	939

ES 2 298 829 T3

<210> 8
 <211> 312
 <212> PRT
 5 <213> *Leishmania infantum*
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> secuencia de proteína del antígeno p36 (LACK) de *Leishmania*
 <400> 8

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

60

65

ES 2 298 829 T3

His Ser Asn Tyr Val Ser Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu
 195 200 205
 5 Cys Ala Ser Gly Gly Lys Asp Gly Ala Ala Leu Leu Trp Asp Leu Ser
 210 215 220
 10 Thr Gly Glu Gln Leu Phe Lys Ile Asn Val Glu Ser Pro Ile Asn Gln
 225 230 235 240
 Ile Ala Phe Ser Pro Asn Arg Phe Trp Met Cys Val Ala Thr Glu Arg
 245 250 255
 15 Ser Leu Ser Val Tyr Asp Leu Glu Ser Lys Ala Val Ile Ala Glu Leu
 260 265 270
 20 Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile Ala Trp Ser
 275 280 285
 Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Ser Gly His Lys Asp Asn Leu Ile Arg
 290 295 300
 25 Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu
 305 310

30 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> virus de simio 40
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> secuencia de localización nuclear
 40 <400> 9
 Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1 5
 45 <210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 50 <213> virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <223> fragmento de péptido T largo del producto génico TAT de VIH-1
 <400> 10
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 60 1 5 10
 <210> 11
 <211> 33
 65 <212> ADN
 <213> artificial

ES 2 298 829 T3

	<220>	
	<223> cebador izquierdo de la 1ª PCR; oligo sintético	
5	<400> 11	
	ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct	33
10	<210> 12	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> cebador derecho de la 1ª PCR; oligo sintético	
	<400> 12	
20	ttatatgagc tcagaagaca cggacagga cctcttcggt cg	42
	<210> 13	
25	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> cebador izquierdo de la 2ª PCR; oligo sintético	
	<400> 13	
35	ttatatggta ccatgaacat acgagggtca cct	33
	<210> 14	
40	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> cebador derecho de la 2ª PCR; oligo sintético	
	<400> 14	
50	ttatatgagc tcttactcgg ccgtcggaga tgg	33
	<210> 15	
	<211> 30	
55	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
60	<223> cebador izquierdo de la PCR de Kmp-11; oligo sintético	
	<400> 15	
65	attatagta ccatggccac cacgtacgag	30
	<210> 16	
	<211> 32	

ES 2 298 829 T3

	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
5	<223> cebador derecho de la PCR de Kmp-11; oligo sintético	
	<400> 16	
10	ttaattctcg agttacttgg atgggtactg cg	32
	<210> 17	
	<211> 36	
15	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
20	<223> cebador izquierdo de PCR de TSA; oligo sintético	
	<400> 17	
25	aattatggta ccatgtcctg cggtaacgcc aagatc	36
	<210> 18	
	<211> 39	
30	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador derecho de la PCR de TSA; oligo sintético	
35	<400> 18	
40	aatatactcg agttactgct tgctgaagta tccttcgac	39
	<210> 19	
	<211> 22	
	<212> ADN	
45	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador de mutación izquierdo de TSA; oligo sintético	
50	<400> 19	
	taccgcggtc tcttcatcat cg	22
55	<210> 20	
	<211> 32	
	<212> ADN	
60	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador de mutación derecho de TSA; oligo sintético	
65	<400> 20	
	attggggggtc tcgatgaata gaccgcggta gg	32

ES 2 298 829 T3

	<210> 21	
	<211> 25	
	<212> ADN	
5	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador izquierdo del fragmento 1 de gp63; oligo sintético	
10	<400> 21	
	attattggta ccatgtctgt ggact	25
15	<210> 22	
	<211> 31	
	<212> ADN	
20	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador derecho del fragmento 1 de gp63; oligo sintético	
25	<400> 22	
	ttatatggtc tctctcaggg ctccccagtt g	31
30	<210> 23	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
35	<220>	
	<223> cebador izquierdo del fragmento 2 de gp63; oligo sintético	
40	<400> 23	
	attataggtc tcctgagaat tgctgtgtcc acagag	36
45	<210> 24	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
50	<220>	
	<223> cebador derecho del fragmento 2 de gp63; oligo sintético	
55	<400> 24	
	ttatatggtc tcacagaggc cacatacatc acaa	34
60	<210> 25	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
65	<220>	
	<223> cebador izquierdo del fragmento 3 de gp63; oligo sintético	

ES 2 298 829 T3

	<400> 25	
	tattatggtc tcctctgtgc cctctgagga gggagtgctg gcc	43
5	<210> 26	
	<211> 34	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador derecho del fragmento 3 de gp63; oligo sintético	
15	<400> 26	
	aattatggtc tcctcaatct ccaggtactc cagg	34
20	<210> 27	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> cebador izquierdo del fragmento 4 de gp63; oligo sintético	
30	<400> 27	
	attataggtc tcattgagga ccagggagga g	31
	<210> 28	
35	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> cebador derecho del fragmento 4 de gp63; oligo sintético	
	<400> 28	
45	taatatggtc tcgtgtctgg tcactccaca ctg	34
	<210> 29	
50	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
55	<223> cebador izquierdo del fragmento 5 de gp63; oligo sintético	
	<400> 29	
60	attataggtc tcagacacce agacctgccc c	31
	<210> 30	
	<211> 32	
65	<212> ADN	
	<213> artificial	

ES 2 298 829 T3

	<220>	
	<223> cebador derecho del fragmento 5 de gp63; oligo sintético	
5	<400> 30	
	ttatatgggc tcggggtgca gttggcatag cc	32
10	<210> 31	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
15	<220>	
	<223> cebador izquierdo del fragmento 6 de gp63; oligo sintético	
	<400> 31	
20	atatatgggc tccacccag gcctgagagt gg	32
	<210> 32	
25	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
30	<223> cebador derecho del fragmento 6 de gp63; oligo sintético	
	<400> 32	
35	taatatgagc tcctacaggg ccacagccag cagg	34
	<210> 33	
40	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
45	<223> cebador izquierdo de la secuencia total de gp63; oligo sintético	
	<400> 33	
50	attattggta ccatgtctgt ggact	25
	<210> 34	
	<211> 34	
55	<212> ADN	
	<213> artificial	
	<220>	
60	<223> cebador derecho de la secuencia total de gp63; oligo sintético	
	<400> 34	
65	taatatgagc tcctacaggg ccacagccag cagg	34
	<210> 35	
	<211> 20	

ES 2 298 829 T3

<212> ADN
<213> artificial
<220>
5 <223> ODN1; oligo sintético
<220>
<221> misc_feature
10 <222> (12)...(12)
<223> T= timina modificada químicamente

<400> 35
15 gggagtccag tttctggac 20

<210> 36
20 <211> 20
<212> ADN
<213> artificial
<220>
25 <223> ODN2; oligo sintético

<400> 36
30 aggggtccag tttctggac 20

35

40

45

50

55

60

65