

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 884**

51 Int. Cl.:

C07H 21/02	(2006.01)	C07K 14/52	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)	C07K 19/00	(2006.01)
A61K 35/76	(2006.01)	C12N 1/15	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)	C12N 1/19	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)	C12N 1/21	(2006.01)
A61K 39/21	(2006.01)	C12N 5/10	(2006.01)
A61P 31/18	(2006.01)	C12N 7/00	(2006.01)
A61P 37/04	(2006.01)	C12N 15/62	(2006.01)
A61P 43/00	(2006.01)		
C07K 14/155	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **01989844 .4**
- 96 Fecha de presentación: **01.11.2001**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1379535**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

54 Título: **Vectores de expresión capaces de inducir respuesta inmunomejorada y métodos para usarlos**

30 Prioridad:
01.11.2000 US 245113 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.09.2012

73 Titular/es:
THE GOVERNMENT OF THE UNITED STATES OF AMERICA, as represented by THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES
The National Institute of Health, Office of Technology Transfer, 6011 Executive Boulevard, Suite 325
Rockville, MD 20852, US

72 Inventor/es:
PAVLAKIS, George, N.;
GRAGEROV, Alexander y
FELBER, Barbara, K.

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 386 884 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

Vectores de expresión capaces de inducir respuesta inmunomejorada y métodos para usarlos

5 **I. Campo técnico**

Se describen en este documento ácidos nucleicos (tales como plásmidos de inmunización de ADN), que codifican proteínas de fusión que contienen una secuencia de aminoácidos desestabilizante unida a una secuencia de aminoácidos de interés, en los que la inmunogenicidad de la secuencia de aminoácidos de interés se aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizante. También se describen en este documento ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión secretadas, tales como las que contienen quimiocinas o citocinas y una secuencia de aminoácidos unida de interés, en los que la inmunogenicidad de la secuencia de aminoácidos de interés aumenta como resultado de estar unida a la secuencia secretora. Se describen además en este documento métodos para aumentar la inmunogenicidad de las proteínas codificadas para su uso como vacunas o en terapia génica.

15 **II. Antecedentes**

Se ha demostrado que las respuestas inmunes celulares frente a virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) y el virus de inmunodeficiencia de simios (VIS) relacionado desempeñan un papel importante en el control de la infección por VIH-1 y VIS y en el retardo de la progresión de enfermedad. La contención de infección de VIH-1 primaria en individuos infectados se correlaciona con la aparición de respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de virus (1, 2, 3). En individuos con infección crónica, también se correlaciona una respuesta de CTL de alta frecuencia contra VIH-1 con una carga viral baja y progresión de la enfermedad lenta (4,5). También se ha demostrado una respuesta de CTL específica de VIH-1 en ciertos individuos seronegativos altamente expuestos (6, 7, 8). También, se han identificado respuestas proliferativas específicas de VIH fuertes, que pueden ser críticas para el mantenimiento de respuestas de CTL en pacientes sin progresión a largo plazo (9, 10).

Gag de VIH-1 es una de las proteínas virales más conservadas. Se han detectado respuestas de CTL entre distintos clades, amplias que reconocen epítomos conservados en Gag de VIH-1 en personas infectadas con VIH-1 (11, 12) y el desarrollo de una vacuna de VIH-1 segura y eficaz puede depender de la inducción de respuestas de CTL y/o T auxiliar eficaces contra proteínas de VIH-1 conservadas tales como Gag. Se ha mostrado que las vacunas de ADN inducen respuestas inmunes celulares eficaces y protección contra una diversidad de patógenos virales, bacterianos y parasitarios en modelos animales. Sin embargo, aún no están disponibles vacunas de ADN que puedan inducir respuestas inmunes celulares potentes contra Gag de VIH-1.

Los inventores han demostrado recientemente que destruyendo las secuencias inhibitorias en la región codificante de Gag de VIH-1, podrían aumentar significativamente la expresión de proteína Gag en primate así como en células de ratón (13, 14, 15, 16) y potenciar drásticamente la respuesta inmune inducida por una vacuna de ADN (13). Puesto que este nuevo vector de expresión de Gag es independiente de Rev/RRE e independiente de especie, proporciona un enfoque factible para evaluar sistemáticamente las estrategias que podrían conducir a la inducción máxima de respuestas inmunes celulares contra moléculas Gag de VIH en modelos animales.

La administración intramuscular (i.m.) de una vacuna de ADN representa un medio sencillo y eficaz para inducir respuestas inmunes tanto humorales como celulares (17). Hay tres rutas potenciales responsables de la presentación de antígenos después de la inyección i.m. de ADN. En primer lugar, las células musculares podrían captar el ADN, expresar el antígeno proteico codificado y presentarlo a células inmunes. Datos recientes sugieren que esta ruta es poco probable *in vivo* (18). En segundo lugar, las células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas atraídas al sitio de inyección pueden captar el ADN, expresar la proteína codificada y presentarla a linfocitos T y B. En tercer lugar, las células musculares pueden captar el ADN y expresar el antígeno proteico, transmitiéndose después el antígeno a células dendríticas para presentación. Si sucede la segunda posibilidad, una proteína que se sintetice y se degrade en el citoplasma de células dendríticas sería una diana excelente para la presentación de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I e inducción de respuestas de CTL. Como alternativa, si sucediera el tercer escenario, una proteína sintetizada en las células musculares que podría dirigirse eficazmente a células dendríticas induciría la mejor respuesta de CTL.

Para distinguir entre estas diferentes posibilidades, se construyeron tres formas diferentes de vectores de vacuna de ADN de Gag de VIH-1 y se compararon con respecto a la inducción de respuestas inmunes. Estas formas diferentes de Gag incluyeron (i) una Gag convencional (St-Gag) (también denominada Gag "WT" en este documento) que se ensambla en partículas, que se liberan eficazmente de células y se rodean por membrana lipídica derivada de la célula hospedadora adquirida durante gemación del virus; (ii) una forma citoplásmica de Gag (Cy-Gag) que no se dirige a la membrana plasmática y por lo tanto permanece en el citoplasma; y (iii) una forma secretada de Gag (Sc-Gag) que se sintetiza en la cara citoplasmática del retículo endoplásmico rugoso (RE), se transporta a través del RE y el aparato de Golgi y se libera como una proteína secretada (es decir, no rodeada por una membrana lipídica) (19). (Las proteínas Gag mutantes que no se dirigen eficazmente a la membrana plasmática y permanecen principalmente en el citoplasma se crearon destruyendo la señal de miristilación de Gag de VIH-1. Las moléculas de

SC-Gag se crearon mediante la adición de la secuencia de péptido señal t-PA al extremo N terminal de la molécula Gag de VIH-1. Esta secuencia proporciona una señal para translocación de la proteína secretada al lumen del RE, para transporte a través del RE y el aparato de Golgi y para liberación en forma de moléculas de Sc-Gag). (19).

- 5 En el estudio descrito anteriormente, se abordó la cuestión de si la dirección de Gag de VIH-1 a diversos compartimentos subcelulares podría influir en la inducción de las respuestas inmunes en ratones inmunizados por ADN. Los resultados demostraron que la dirección de las moléculas Gag de VIH-1 a diferentes compartimentos subcelulares influye de hecho en las respuestas inmunes tanto humoral como celular que se inducen por vacunación con ADN i.m. Específicamente, cuando estas formas de Gag se administraron a ratones como una vacuna de ADN, se descubrió que el vector de ADN que codifica la Sc-Gag generó mejores respuestas T auxiliar y CTL primarias que el vector de ADN que codifica Cy-Gag. Además, el vector de ADN que codifica la Sc-Gag también generó un mayor nivel de respuestas de CTL secundarias que el vector de ADN que codifica Cy-Gag después de sensibilización con ADN e infección con Gag de virus vaccinia recombinante. Las titulaciones del virus vaccinia se redujeron notablemente en los ovarios de ratones inmunizados con vacuna de ADN Gag más de 125 días antes de la infección, en comparación con las titulaciones en ratones que recibieron solamente el vector de ADN de control. Estos datos indicaron que la memoria de linfocitos T CD8⁺ inducida por vacunación con ADN es funcionalmente relevante y proporciona inmunidad protectora en este sistema. El vector de ADN que codifica la Sc-Gag proporcionó mejor protección contra Gag de virus vaccinia recombinante que el vector de ADN que codifica Cy-Gag (19).
- 10
- 15
- 20 Otro estudio ha mostrado que la alteración de la localización celular de la glucoproteína D (gD) de herpesvirus 1 bovino por vacuna de ADN modula la respuesta inmune humoral. Aunque las formas tanto secretora como citosólica de gD indujeron una respuesta de anticuerpo IgG2a, la forma secretora de gD indujo una respuesta de IgG1 más fuerte que la respuesta de IgG2a (23). Se observaron resultados similares para Sc-Gag y Cy-Gag en el estudio descrito anteriormente. Por otro lado, St-Gag (también llamada gag "WT" en este documento), que es competente para formar partículas de tipo viral, indujo una respuesta predominantemente de anticuerpo IgG2a. Este último dato es coherente con la idea de que la localización de antígenos después de inmunización con ADN podría influir en el tipo y potencia de respuestas inmunes humorales.
- 25

- Aunque se ha mostrado que las vacunas de ADN solas protegen contra presentaciones patógenas en animales pequeños (24), su rendimiento en primates en general ha sido decepcionante. Las vacunas de ADN, incluso con refuerzos repetidos, inducen solamente respuestas inmunes moderadas en comparación con vacunas de virus atenuado vivo o virus recombinante. Sin embargo, recientes estudios han demostrado que los regímenes de inmunización de sensibilización-refuerzo heterólogos usando ADN más vectores Ankara de virus vaccinia modificado recombinante pueden inducir respuestas inmunes celulares fuertes y protección contra la malaria en ratones (25), (26) y VISmac (27), (28) en modelos de monos. Aunque las respuestas inmunes de linfocitos T inducidas por inmunización por ADN son moderadas, se centran en gran medida en unos pocos epítomos específicos, debido al pequeño número de otros epítomos expresados por este sistema de suministro de antígenos. Un refuerzo con un virus vaccinia recombinante que exprese el mismo antígeno supuestamente estimula esta población de linfocitos T de memoria sensibilizados. Los datos de los inventores mostraron que pSc-GAG indujo respuestas de linfocitos T de memoria más altas que otros vectores de expresión de Gag como se mide por la actividad de CTL *ex vivo*, número más alto de células productoras de IFN- γ CD8⁺ después de estimulación con péptido específico de Gag de VIH-1 restringido por MHC de clase I y mayor protección contra infección por Gag de virus vaccinia recombinante (19). Estos vectores de expresión de Gag pueden ser útiles para evaluación adicional de la sensibilización y refuerzo heterólogos con ADN más vector viral en la inducción de respuestas inmunes celulares protectoras. Podrían considerarse estrategias similares para modelos de primates no humanos en los que pueden evaluarse VIS o virus de inmunodeficiencia humana/de simio.
- 30
- 35
- 40
- 45

- Ha habido varios informes con respecto al uso de péptidos señal t-PA en vacunas de ADN. En el caso de vacuna de ADN de Env de VIH-1 (20), el reemplazo del péptido señal auténtico de gp160 con el de t-PA pretendía superar el requisito de Rev/RRE para la expresión de proteína Env (21). Se ha mostrado que el reemplazo de secuencias de péptido señal de proteínas micobacterianas con el de t-PA en vectores de ADN se correlaciona con más protección contra presentación tuberculosa en ratones, aunque no se midieron las respuestas de CTL (22). Los vectores de ADN que contenían fusión de péptido t-PA con antígenos de *Plasmodium vivax* no aumentaron significativamente la producción de anticuerpo en ratones y las respuestas inmunes celulares no se evaluaron (39). Si el péptido señal t-PA puede potenciar la inducción de respuestas inmunes para antígenos citoplásmicos en general por medio de una estrategia de vacuna de ADN requiere investigación adicional.
- 50
- 55

- Otros informes, con respecto a vacunas de cáncer potenciales, han demostrado que las inmunizaciones activas de pacientes humanos con vacunas idiotípicas indujeron respuestas de linfocitos T CD8⁺ específicas del antígeno y efectos antitumorales (29). Se han presentado previamente varias estrategias preclínicas alternativas para desarrollar vacunas, incluyendo fusión de Fv de cadena sencilla derivado de idiotipo tumoral ("scFv") con citocinas y péptidos inmunogénicos tales como interleucina ("IL") -2, IL-4 y factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF") (30, 31, 32). Estas fusiones de scFv con citocinas, fragmentos de toxinas y péptidos virales predominantemente inducen una respuesta humoral con activación indetectable de inmunidad mediada por células (véase Tabla 2 de la referencia 33). En un enfoque diferente, el antígeno modelo se hace inmunogénico en ratones fusionándolo genéticamente con un resto de quimiocina (33, 34, 35). La inmunidad antitumoral potente dependía de
- 60
- 65

la generación de anticuerpos anti-idiotípicos específicos y linfocitos T tanto CD4+ como CD8+. Esos investigadores han presentado la hipótesis de que la administración de estas vacunas como proteínas de fusión o vacunas de ADN desnudo pueden permitir la dirección eficaz de células presentadoras de antígeno *in vivo*. También proponen que la fusión de quimiocinas puede representar una nueva estrategia general para formular antígenos clínicamente relevantes, tales como antígenos tumorales y de VIH de nueva identificación no existentes en vacunas para cáncer y SIDA, respectivamente, que inducen inmunidad de linfocitos T CD8⁺ potente (33). Estos investigadores declaran adicionalmente que con respecto al desarrollo de vacunas de VIH, se ha mostrado que VIH no puede entrar en células humanas a no ser que se una primero a dos tipos de receptores de superficie celular: CD4 y receptores de quimiocina. Los dos virus de VIH de movimiento distinto principales infectan células mediante correceptores CCR5 o CXCR4. Por lo tanto, declaran que puede preverse una vacuna de fusión de quimiocinas para VIH que induciría no solamente respuestas de linfocitos T y humorales contra VIH, si no que posiblemente podrían interferir con la unión de VIH con el receptor de quimiocina respectivo, bloqueando de este modo la infección. Finalmente, también proponen que su estrategia puede mejorarse adicionalmente modificando y mutando el resto de quimiocina, o reemplazándolo con los genes de tipo quimiocina virales, que reducirían el riesgo de generación de autoanticuerpos contra quimiocinas nativas.

Otra estrategia diseñada para potenciar la inducción de respuestas de CTL específicas de antígeno implica la dirección de antígenos de vacuna directamente a la ruta de procesamiento de antígenos de MHC de clase I, proporcionando de este modo más de los epítopos peptídicos que desencadenan la respuesta de CTL. Una señal que se dirige a proteínas para degradación de proteasoma es el ensamblaje de una cadena de poliubiquitina unida a un resto Lys accesible en la proteína diana. Un factor que influye en la tasa a la que se produce poliubiquitinación es la identidad del resto N terminal de la proteína diana, como ciertas proteínas diana de extremos N terminal no Met para degradación rápida por el proteasoma 26S. Townsend y otros han mostrado que dicha dirección de "norma de extremo N" de antígenos puede potenciar su procesamiento y presentación por la ruta de clase I en una situación *in vitro*. (Véase referencia 36).

Las proteínas con extremos N terminal no Met se han expresado en células usando construcciones de fusión en las que la secuencia codificante de la proteína diana se fusiona en fase con el extremo C terminal de la secuencia codificante de ubiquitina. La ubiquitina se prepara normalmente en la célula como una poliproteína que se escinde por hidrolasas de ubiquitina en el extremo C terminal de cada subunidad de ubiquitina, dando lugar a moléculas de ubiquitina individuales. Estas mismas hidrolasas de ubiquitina también escindirán la proteína de fusión diana de ubiquitina en el extremo C terminal de ubiquitina, exponiendo el extremo N terminal de la diana. En un estudio reciente, Tobery y Siliciano generaron fusiones de ubiquitina con nef de VIH-1 con Met o Arg en el extremo N terminal de nef (UbmNef y UBRNef, respectivamente) (37). En experimentos *in vitro* usando vectores vaccinia para expresar UbmNef y UBRNef, se mostró que aunque ambos vectores indujeron la expresión de cantidades comparables de nef, la forma de nef con un resto de Arg en el extremo N terminal y una semivida mucho más corta ($t_{1/2} = 15$ minutos frente a 10 horas). Además, la inmunización de ratones con un vector vaccinia que expresaba el UBRNef rápidamente degradado dio como resultado la inducción de una respuesta de CTL específica de nef más vigorosa que la inmunización con un vector vaccinia que expresaba el UbmNef estable. Tobery y Siliciano concluyen que aumentar las respuestas de CTL específicas de nef dirigiendo el antígeno para degradación citoplásmica rápida representa una estrategia atractiva para vacunación contra VIH (37).

En un estudio más reciente, Tobery y Siliciano usaron la proteína viral (nef de VIH-1) como un modelo antígeno asociado con tumor para evaluar la eficacia *in vivo* de la estrategia de dirección de "norma de extremo N" para potenciar la inducción de respuesta de CTL *de novo* en ratones. Declaran que sus resultados sugieren que la estrategia de dirección de "norma de extremo N" puede conducir a una potenciación en la inducción de CTL que es suficiente para conferir protección contra una dosis letal de células tumorales que expresan antígenos (36).

Vleminckx *et al* (Mechanisms of Development, vol. 81, páginas 65-74 (1999) describen que el dominio de transactivación C terminal de beta-catenina es necesario y suficiente para señalización por el complejo de LEF-1/beta-catenina en *Xenopus laevis*. Wu *et al* (J. Immunol, vol. 159, páginas 6037-6043 (1997)) describen que las vacunas de ácido desoxirribonucleico que codifican antígenos con degradación dependiente de proteasoma rápida son inductores altamente eficaces de linfocitos T citolíticos. Hershko (Anual Review of Biochemistry, vol. 67, páginas 425-479 (1998)) describe el sistema de ubiquitina. Rosati (J. Virol, vol 79, páginas 8480-8492 (1998)) describe que las vacunas de ADN expresan diferentes formas de antígeno de virus de inmunodeficiencia de simio reducen la viremia tras exposición a VISmac251. El documento WO 99 46392 describe métodos y composiciones que se refieren a proteínas de fusión de antígeno tumoral-quimiocina como vacunas de cáncer. Biragyn *et al* (Nat. Biotech, vol. 17, páginas 253-258 (1999)) describen que la fusión genética de quimiocinas con un autoantígeno tumoral induce inmunidad antitumoral dependiente de linfocitos T protectora.

En resumen, hasta la fecha, se han usado vacunas de ADN que expresan diversos antígenos para inducir respuestas inmunes. En muchos casos esta respuesta es polarizada o subóptima para fines de vacunación prácticos. La presente invención demuestra que combinaciones de vacunas de ADN que contienen diferentes formas de antígenos, así como administración de las vacunas de ADN a diferentes sitios de inmunización, aumentan la respuesta inmune y por lo tanto, se espera que proporcionen procedimientos de vacunación de ADN prácticos.

III. Sumario de la invención

La invención proporciona una composición que comprende uno o más vectores que expresan:

- 5 (i) una construcción de ácido nucleico que contiene secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos desestabilizante que dirige la proteína a la ruta de degradación de proteasoma-ubiquitina unida covalentemente a un antígeno, en la que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizante y
- 10 (ii) una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión secretada que comprende una secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3 unida covalentemente al antígeno, en la que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3.

15 La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende uno o más vectores de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica de la invención para su uso en la inducción de anticuerpos en un mamífero en la que están presentes construcciones de ácido nucleico expresadas por uno o más vectores de la invención en dicha composición en una cantidad que es eficaz para inducir dichos anticuerpos en dicho mamífero. La invención también proporciona una

20 composición farmacéutica de la invención para su uso en la inducción de linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en un mamífero en el que dichas construcciones de ácido nucleico expresadas por uno o más vectores de la invención están presentes en dicha composición en una cantidad que es eficaz para inducir linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en dicho mamífero.

25 La invención proporciona adicionalmente una composición de vacuna para su uso en la inducción de inmunidad en un mamífero contra infección por VIH que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más vectores de la invención en la que la secuencia de antígeno es una secuencia de antígeno de VIH y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 La invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende partículas virales que contienen uno o más vectores de la invención. La invención también proporciona una composición farmacéutica de la invención para su uso en la estimulación de una respuesta inmune contra un antígeno.

35 La invención proporciona adicionalmente una composición de la invención para su uso en la vacunación de un mamífero para inducir anticuerpos en el mamífero, en la que el uno o más vectores están presentes en una cantidad que es eficaz para inducir dichos anticuerpos en dicho mamífero. La invención proporciona adicionalmente una composición de la invención para su uso en la vacunación de un mamífero induciendo linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en el mamífero, en la que en algunos vectores están presentes en una cantidad que es eficaz para inducir linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en dicho mamífero.

40 La invención también proporciona un kit que comprende uno o más vectores de la invención.

45 La invención proporciona adicionalmente un primer vector para su uso en un método para vacunar a un mamífero induciendo anticuerpos o linfocitos citotóxicos y/o inductores auxiliares, en el que dicho método comprende adicionalmente administración de un segundo vector, en el que uno de los vectores expresa una construcción de ácido nucleico que contiene secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos desestabilizante que dirige la proteína a la ruta de degradación de proteasoma-ubiquitina unida covalentemente a un antígeno en el que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizante; y

50 el otro vector expresa una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión secretada que comprende una secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3 unida covalentemente al antígeno, en la que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3.

55 También se describen en este documento ácidos nucleicos (incluyendo, pero sin limitación, plásmidos de inmunización de ADN), que codifican proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos desestabilizante unida covalentemente a una secuencia de aminoácidos heteróloga de interés, en los que la inmunogenicidad de la secuencia de aminoácidos de interés aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizante.

60 Se describen además en este documento ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión secretadas que comprenden una secuencia de aminoácidos secretora, tales como los que contienen quimiocinas o citocinas, unidos covalentemente a una secuencia de aminoácidos heteróloga de interés, en los que la inmunogenicidad de la secuencia de aminoácidos de interés aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos secretora.

65 También se describen en este documento productos producidos por los ácidos nucleicos, por ejemplo, ARNm, polipéptidos y partículas virales así como vectores y sistemas de vectores que comprenden estos ácidos nucleicos. Adicionalmente se describen células hospedadoras que comprenden estos ácidos nucleicos, vectores, sistemas de

vector y/o sus productos.

La presente descripción también se refiere a composiciones que comprenden estos ácidos nucleicos, vectores, sistemas de vector, productos y/o células hospedadoras y métodos para usar estas composiciones, solas o en combinación, para estimular una respuesta inmune mejorada.

5 Se describen adicionalmente métodos para usar los mismos o diferentes ácidos nucleicos, vectores, sistemas de vector, productos y/o células hospedadoras, o composiciones de los mismos, en diferentes sitios para potenciar la respuesta inmune.

10 Se describen además usos de estos ácidos nucleicos, vectores, sistemas de vector, células hospedadoras y/o composiciones para producir ARNm, polipéptidos y/o partículas virales infecciosas y/o para inducir anticuerpos y/o linfocitos T citotóxicos y/o auxiliares.

15 La presente descripción también se refiere al uso de estos ácidos nucleicos, vectores, sistemas de vector, productos y/o células hospedadoras, o composiciones de los mismos, en terapia génica o como vacunas.

20 Por ejemplo, se describe en este documento el uso de estas construcciones de ácido nucleico, vectores, sistemas de vector y/o células hospedadoras para su uso en inmunoterapia e inmunoprofilaxis, por ejemplo, como una vacuna, o en terapia genética después de expresión, en mamíferos, preferentemente en seres humanos. Las construcciones de ácido nucleico pueden incluir o incorporarse en vectores lentivirales, vectores vaccinia, vectores de adenovirus, vectores de herpesvirus u otros vectores de expresión o pueden también inyectarse directamente en células tisulares dando como resultando expresión eficaz de la proteína codificada o fragmento proteico. Estas construcciones también pueden usarse para reemplazo génico *in vivo* o *in vitro*, por ejemplo, por recombinación homóloga con un gen diana *in situ*. También pueden usarse para transfectar células *ex vivo*.

25

IV. Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Respuestas proliferativas (mostradas como índice de estimulación, SI) en ratones inyectados con los vectores o combinaciones indicados. Los vectores son como se describe en los ejemplos.

30 Figura 2. Respuestas proliferativas (mostradas como índice de estimulación, SI) en ratones inyectados dos veces con los plásmidos de expresión de VIS o combinaciones indicados. Juntos = inyección de 3 ADN en los mismos sitios; 3 sitios = inyecciones de los mismos ADN en sitios separados. Los vectores son como se describe en los ejemplos.

35 Figura 3. Respuesta de anticuerpo en monos. Se inyectó a dos animales (Nº 585.587) 4x con 5 mg por vía intramuscular ("i.m.") de vector de expresión MCP3p37gag. Se proporcionó a dos animales (Nº 626.628) el mismo ADN por vía mucosal como preparaciones de ADN-liposoma. Titulaciones representadas como diluciones en suero recíprocas con puntuación positiva en ensayos de ELISA de p24 de VIH.

40 Figura 4. Porcentaje de células IFN gamma + en población de CD8 después de estimulación *in vitro* con grupo de péptidos gag en macacos después de tres vacunaciones con WT + MCP3; WT + MCP3 + CATE; WT o sin vacunación ("vírgenes"). (Nota: WT significa gag de tipo silvestre, también denominado gag convencional (St-gag) en este documento; MCP3 significa fusiones de MCP3-gag; CATE significa fusiones de β-catenina-gag).

45 Figura 5. Porcentaje de células IFNgamma + en población de CD8 después de estimulación *in vitro* con un grupo de péptido env en macacos después de tres vacunaciones con WT + MCP3; + WT + CATE; WT + MCP3 + CATE; WT; o sin inyección ("vírgenes"). (Nota: WT significa env de tipo silvestre; MCP3 significa fusión MCP3-env; CATE significa fusiones β-catenina-env).

Figura 6. Diagrama esquemático del vector que codifica la envoltura de VIS CMVkan/R-R-SIVgp160CTE.

Figura 7. Secuencia de ADN del vector que codifica la envoltura de VIS CMVkan/R-R-SIVgp160CTE que contiene un gen env de VIS mutado.

50 Figura 8. Secuencia de nucleótidos y aminoácidos de fusión de MCP3-gp160 env (VIH).

Figura 9. Secuencia de nucleótidos y proteína de la fusión beta-catenina-gp160 env (VIH).

55 Figura 10. Transferencia de Western de vectores de expresión de env de VIH. Se muestran vectores optimizados para secuencia de tipo silvestre de gp160 (carriles 1, 2, 3) o las fusiones con MCP-3 (carril 6, 9), péptido líder tPA (carril 4, 7) y beta-catenina (carril 5, 8). Se realizaron transfecciones con ADN plasmídico purificado en células humanas 293 y se cargaron extractos celulares (intracelular) o sobrenadantes celulares (extracelular) en geles de SDS-acrilamida, se realizó transferencia y se exploraron con anticuerpos anti-env de VIH. Se muestran las posiciones de gp120 y gp41. La flecha abierta indica productos de degradación detectados en el carril 5. CTE y RTE indican elementos de control post-transcripcional adicionales respectivos presentes en algunos vectores.

60

V. Modos para llevar a cabo la invención

65 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son solamente ilustrativos y explicativos y no son limitantes de la invención, como se reivindica. Los dibujos adjuntos, que se incorporan en y constituyen una parte de la memoria descriptiva, ilustran una realización de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la invención.

Se describen en este documento ácidos nucleicos (incluyendo, pero sin limitación, plásmidos de inmunización de ADN), que codifican proteínas de fusión que comprenden una secuencia de aminoácidos desestabilizante unida covalentemente a una secuencia de aminoácidos heteróloga de interés, en la que la inmunogenicidad de la secuencia de aminoácidos de interés aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizante.

5 También se describen ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión secretadas que comprenden una secuencia de aminoácidos secretora, tales como las que contienen quimiocinas o citocinas, unidas covalentemente a una secuencia de aminoácidos heteróloga de interés, en los que la inmunogenicidad de la secuencia de aminoácidos de interés aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos secretora.

10 La presente descripción se refiere adicionalmente a ácidos nucleicos que tienen secuencias que codifican proteínas de fusión que contienen secuencias de aminoácidos desestabilizantes que aumentan la inmunogenicidad de una secuencia de aminoácidos unida y a métodos para usar composiciones que comprenden estos ácidos nucleicos, o combinaciones de los mismos, para aumentar la inmunogenicidad de la proteína o las proteínas codificadas. Se describen además en este documento ácidos nucleicos que codifican una proteína de fusión que contiene secuencias de aminoácidos MCP-3 y gag o env de VIH, o gag o env de VIS y proteínas adicionales relacionadas con vacunaciones contra antígenos no asociados con tumores, tales como antígenos patógenos. También se describen métodos para usar diferentes sitios de inmunización para aumentar la inmunogenicidad de la proteína o las proteínas codificadas.

20 Un aspecto de la presente descripción se refiere a una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión que comprende una secuencia de desestabilización unida covalentemente a una secuencia de aminoácidos que contiene uno o más antígenos asociados con enfermedad. Son secuencias de desestabilización preferidas las que dirigen la proteína de fusión a la ruta de degradación proteosómica de ubiquitina. Más preferentemente, la secuencia de desestabilización está presente en las secuencias de aminoácidos seleccionadas entre el grupo que consiste en c-Myc aa2-120; Ciclina A aa13-91; Ciclina B aa13-91; IkBa aa20-45; β -catenina aa19-44; c-Jun aa1-67; y c-Mos aa1-35 y fragmentos funcionales de las mismas.

30 En una realización, la presente descripción se refiere a ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican polipéptidos que contienen una secuencia de aminoácidos desestabilizante que aumenta la inmunogenicidad de una secuencia de aminoácidos unida covalentemente que contiene un antígeno clínicamente relevante, tal como un antígeno asociado a enfermedad, en comparación con su inmunogenicidad en ausencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizante.

35 En otra realización, la presente descripción se refiere a ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión secretadas, tales como las que contienen quimiocinas inmunoestimuladoras, tales como MCP-3 o IP-10 o citocinas, tales como GM-CSF, IL-4 o IL-2. En una realización preferida, la invención se refiere a proteínas de fusión que contienen secuencias de aminoácidos de MCP-3 y antígenos virales tales como gag y env de VIH o gag o env de VIS.

40 Las secuencias de ácido nucleico de las construcciones descritas en el presente documento pueden ser sintéticas (por ejemplo, sintetizadas por síntesis química), semisintéticas (por ejemplo, una combinación de ADN genómico, ADNc o ADN amplificado por PCR y ADN sintético), o producidas de forma recombinante. Las secuencias de ácido nucleico también pueden opcionalmente no contener intrones. La secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos desestabilizante se une preferentemente en fase con el extremo N terminal de una secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos de interés, o epítipo o epítopos inmunogénicos de los mismos. Estas secuencias pueden opcionalmente unirse por otra secuencia que codifica uno o más aminoácidos enlazadores.

50 Además, las secuencias de ácido nucleico que codifican más de un antígeno de interés, pueden opcionalmente unirse operativamente en fase o mediante un sitio de entrada al ribosoma interno (IRES), por ejemplo, de ARN de picornavirus. Un IRES se usará en circunstancias en las que se desea expresar dos proteínas (o antígenos) del mismo promotor. Usando un IRES la expresión de las dos proteínas está coordinada. También puede estar presente una secuencia que codifica polipéptido adicional bajo el control de un promotor separado. Una secuencia tal puede codificar, por ejemplo, un marcador seleccionable, o antígeno o antígenos adicionales de interés. La expresión de esta secuencia puede ser constitutiva; por ejemplo en el caso de un marcador seleccionable esto puede ser útil para seleccionar células de empacquetamiento transfectadas de forma exitosa, o células de empacquetamiento que producen titulaciones particularmente altas de partículas de vector. Como alternativa o adicionalmente, el marcador seleccionable puede ser útil para seleccionar células que se han infectado de forma exitosa con secuencia de ácido nucleico y tienen la secuencia integrada en su propio genoma.

65 Las construcciones descritas en este documento también pueden codificar moléculas de inmunoestimulación adicionales, tales como la quimiocina MCP-3 ilustrada en este documento y fragmentos funcionales de las mismas. Estas moléculas de inmunoestimulación pueden codificarse por secuencias de ácido nucleico como parte de la unidad de expresión de proteína de fusión o pueden codificarse por secuencias de ácido nucleico como parte de una unidad de expresión separada. Estas moléculas también pueden codificarse por secuencias presentes en diferentes

construcciones de ácido nucleico, vectores, etc. Se conocen bien en la técnica moléculas inmunoestimuladoras tales como citocinas, quimiocinas o linfocinas. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.100.387. Véase, también, por ejemplo, Biragyn y Kwack (1999) (referencia 34).

5 Cuando se codifican antígenos de VIH o VIS, los ácidos nucleicos también pueden contener fragmentos independientes de Rev de genes que conservan la función deseada (por ejemplo, para antigenicidad de Gag o Pol, formación de partículas (Gag) o actividad enzimática (Pol)), o pueden contener también variantes independientes de Rev que se han mutado de modo que la proteína codificada pierda una función que no se desea en ciertas circunstancias. En el último caso, por ejemplo, el gen puede modificarse para codificar mutaciones (al nivel de aminoácidos) en el sitio activo de las proteínas de transcriptasa inversa o integrasa para evitar transcripción inversa o integración. Se describen fragmentos independientes de Rev del gen gag y gen env en las Patentes de Estados Unidos N° 5.972.596 y 5.965.726. Véase también, documento PCT/US00/34985 presentado el 22 de diciembre 2000 (publicado como el documento WO 01/46408 el 28 de junio de 2001) para el gen gag y las Figuras 6 y 7 en este documento para el gen env de VIS.

15 La expresión de las proteínas codificadas por estas construcciones o vectores de ácido nucleico después de transfección en células puede controlarse tanto en el nivel de ARN como de producción de proteínas. Los niveles de ARN se cuantifican por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transferencias de Northern, cartografía de S1 o métodos de PCR. Los niveles de proteína también pueden cuantificarse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, transferencia de Western o ELISA o métodos de detección fluorescente. Puede usarse un protocolo de ELISA no radiactivo rápido para detectar proteína gag (ensayo de captura de antígeno gag de DUPONT o COULTER).

20 Se conocen diversos vectores en la técnica. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.100.387. Son vectores preferidos considerados útiles en terapia génica y/o como vectores de vacuna, lentivirus que tienen, dependiendo de las circunstancias deseadas,

- a) ninguna ronda de replicación (es decir, un sistema de replicación cero)
- b) una ronda de replicación, o
- 30 c) un sistema completamente replicante

Tales vectores se describen, por ejemplo, en el documento PCT/US00/34985 presentado el 22 de diciembre de 2000 (publicado como documento WO 01/46408 el 28 de junio de 2001); y N° de Serie de Estados Unidos 09/872.733, presentado el 1 de junio de 2001.

35 En una realización preferida, un sistema de lentivirus basado en VIH o VIS útil en este documento comprende los siguientes tres componentes.

- 40 1) un vector de empaquetamiento que contiene secuencias de ácido nucleico que codifican los elementos necesarios para empaquetamiento de vector tales como proteínas estructurales (excepto *env* de VIH) y las enzimas requeridas para generar partículas de vector, el vector de empaquetamiento que comprende al menos un gen *gag/pol* de VIH o VIS independiente de Rev mutado;
- 45 2) un vector de transferencia que contiene secuencias de acción en cis genéticas necesarias para que el vector infecte la célula diana y para transferencia del gen o los genes terapéuticos, indicadores u otros de interés, comprendiendo el vector de transferencia la señal de encapsidación y el gen o los genes de interés o un sitio de clonación para insertar el gen o los genes de interés; y
- 50 3) un vector que contiene secuencias que codifican un elemento necesario para dirigir la partícula viral a la célula receptora pretendida, preferentemente el gen que codifica la glucoproteína G del virus de estomatitis vesicular (VSG-G) o MuLV amfotrófico o *envs* lentiviral.

En tales vectores, cuando el promotor de CMV u otro promotor fuerte, de alta eficacia, se usa en lugar del promotor LTR de VIH-1 en el vector de empaquetamiento, puede conseguirse alta expresión de *gag*, *pol* o *gag/pol* en ausencia total de cualquier otra proteína viral. El intercambio de promotor LTR de VIH-1 es beneficioso en el vector de empaquetamiento u otros vectores si se desea expresión constitutiva y también para expresión de células de mamífero distintas de células humanas, tales como células de ratón, en las que el promotor de VIH-1 es débil. En ciertas realizaciones, también se deseará la presencia de promotores heterólogos en el vector de transferencia y el vector que codifica la envoltura, cuando se usan tales vectores.

60 Los antígenos de interés, en particular, antígenos clínicamente relevantes se seleccionan de acuerdo con el efecto que se busca conseguir. Preferentemente, el antígeno induce anticuerpos o linfocitos T auxiliares o linfocitos T citotóxicos.

Se describen aminoácidos o antígenos de interés útiles en las construcciones de ácido nucleico de la presente descripción, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5.891.432 (véase, por ejemplo, Col. 13, In. 20 a Col. 17, In. 67). Estos antígenos incluyen, pero sin limitación, antígenos asociados con enfermedad tales como antígenos asociados con tumor, antígenos asociados con enfermedad autoinmune, antígenos asociados con enfermedad

5 infecciosa, antígenos virales, antígenos parasitarios y antígenos bacterianos. Los antígenos asociados con tumor incluyen, pero sin limitación, p53 y mutantes del mismo, Ras y mutantes del mismo, un péptido de punto de ruptura Bcr/Abl, HER-2/neu, HPV 2, E6, HPV E7, antígeno carcinoembrionario, MUC-1, MAGE-1, MAGE-3, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p15, gp100, MART-1/MelanA, tirosinasa, Trip-1, beta-catenina, MUM-1 y CDK-4, N-acetilglucosaminiltransferasa-V, p15, gp100, MART-1/MelanA, tirosinasa, TRP-1, beta-catenina, MUM-1 y CDK-4. Los antígenos de VIH o VIS incluyen, pero sin limitación, Gag, Env, Pol, Nef, Vpr, Vpu, Vif Tat y Rev. En una realización preferida de la invención, los antígenos de VIH Gag-Pol-Tat-Rev-Nef o Tat-Rev-Env-Nef se unen entre sí, pero no son activos como componentes de VIH.

10 Las construcciones de ácido nucleico descritas en este documento, así como vectores, sistemas de vector o partículas virales que contienen tales construcciones de ácido nucleico, o las proteínas codificadas pueden usarse para terapia génica *in vivo* (por ejemplo, inoculación parenteral de vector de titulación alta) o *ex vivo* (por ejemplo, transducción *in vitro* de células del paciente seguida de reinfusión en el paciente de las células transducidas). Estos procedimientos ya se han usado en diferentes protocolos de terapia génica aprobados.

15 Un modo de realizar terapia génica es extraer células de un paciente, infectar las células extraídas con un vector, tal como un vector lentiviral, o una partícula viral y reintroducir las células de nuevo en el paciente. Un marcador seleccionable puede usarse para proporcionar un medio para enriquecer células infectadas o transducidas o seleccionar de forma positiva solamente las células que se han infectado o transducido, antes de reintroducir las células en el paciente. Este procedimiento puede aumentar las posibilidades de éxito de la terapia. Los marcadores seleccionables pueden ser por ejemplo genes de resistencia a fármaco, genes de enzimas metabólicas o cualquier otro marcador seleccionable conocido en la técnica. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras sustancias tóxicas, por ejemplo, histidinol, puromicina, higromicina, neomicina, metotrexato, etc. y marcadores de superficie celular.

20 Sin embargo, resultará evidente que para muchas aplicaciones de terapia génica de vectores, tales como vectores lentivirales, la selección de expresión de un gen marcador puede no ser posible o necesaria. De hecho la expresión de un marcador de selección, aunque es conveniente para estudios *in vitro*, podría ser nociva *in vivo* debido a la inducción inapropiada de linfocitos T citotóxicos (CTL) dirigidos contra la proteína marcadora ajena. Además, es posible que para aplicaciones *in vivo*, se prefieran vectores sin ningún promotor interno. La presencia de promotores internos puede afectar por ejemplo a las titulaciones de transducción obtenibles a partir de una línea células de empaquetamiento y la estabilidad del vector integrado. Por lo tanto, los vectores de unidad de transcripción sencilla, que pueden ser bi-cistrónicos o poli-cistrónicos, que codifican uno, dos o más genes terapéuticos, pueden ser el vector preferido diseñado para su uso *in vivo*. Véase, por ejemplo, el documento WO 98/17816.

25 También se describen en este documento vacunas y composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una de las secuencias de ácido nucleico, polipéptidos, partículas virales, sistemas de vectores o células huésped transducidas o transfectadas de la presente descripción y un vehículo fisiológicamente aceptable.

30 Como se usa en este documento, el término "transducción" generalmente se refiere a la transferencia de material genético al huésped mediante infección, por ejemplo, en este caso por el vector lentiviral. El término "transfección" se refiere en general a la transferencia de material genético aislado a células mediante el uso de agentes de transfección específicos (por ejemplo, fosfato cálcico, DEAE Dextrano, formulaciones lipídicas, partículas de oro y otras micropartículas) que cruzan la membrana citoplasmática y suministran parte del material genético al núcleo celular.

Composiciones Farmacéuticas

35 Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento contienen una cantidad farmacéuticamente y/o terapéuticamente eficaz de al menos una construcción de ácido nucleico, polipéptido, vector, sistema de vector partícula viral/cepa de virus, o célula hospedadora (es decir, agentes) de la presente descripción. Si se desea, las construcciones de ácido nucleico, polipéptidos, partículas virales, vectores, sistemas de vector, partícula viral/cepa de virus, o células hospedadoras descritos en este documento pueden aislarse y/o purificarse por métodos conocidos en la técnica.

40 En una realización de la invención, la cantidad eficaz de un agente de la invención por dosis unitaria es una cantidad suficiente para provocar la expresión detectable del antígeno de interés. En otra realización de la invención, la cantidad eficaz de agente por dosis unitaria es una cantidad suficiente para prevenir, tratar o proteger contra efectos nocivos (incluyendo gravedad, duración o alcance de los síntomas) de la afección que se trate. La cantidad eficaz de agente por dosis unitaria depende, entre otras cosas, de la especie de mamífero inoculada, el peso corporal del mamífero y el régimen de inoculación seleccionado, como se conoce bien en la técnica. La dosificación de los agentes terapéuticos que serán más adecuados para profilaxis o tratamiento también variará con la forma de administración, el agente particular seleccionado y las características fisiológicas del paciente particular en tratamiento. La dosis se administra al menos una vez. Pueden administrarse dosis posteriores según se indique.

65

Para controlar la respuesta de individuos a los que se administraron las composiciones de la invención, pueden determinarse los niveles de expresión de proteínas o ARNm. En muchos casos será suficiente evaluar el nivel de expresión en suero o plasma obtenido de un individuo tal. Las decisiones sobre si administrar otra dosis o cambiar la cantidad de la composición administrada al individuo pueden basarse al menos parcialmente en los niveles de expresión.

La expresión "dosis unitaria" en relación con los inóculos se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo (por ejemplo, ácido nucleico, reserva de virus o célula hospedadora) calculada para producir el efecto deseado en asociación con el diluyente requerido. Las titulaciones de las reservas de virus para administrar a una célula o animal dependerán de la aplicación y el tipo de suministro (por ejemplo, *in vivo* o *ex vivo*). Las reservas de virus pueden concentrarse usando métodos tales como centrifugación. Las titulaciones para administrar *ex vivo* están preferentemente en el intervalo de 0,001 a 1 unidad infecciosa/célula. Otro método para generar reservas virales es co-cultivar líneas celulares estables que expresan el virus con las células diana. Este método se ha usado para conseguir mejores resultados cuando se usan vectores retrovirales tradicionales debido a que las células pueden infectarse durante un periodo de tiempo más largo y tienen la posibilidad de infectarse con múltiples copias del vector.

Para administración *in vivo* de construcciones de ácido nucleico, vectores, sistemas de vector, cepas de virus o células que se han transducido o transfectado *ex vivo*, la dosis debe determinarse por aumento de dosis, limitándose la dosis superior por la aparición de efectos adversos inaceptables. Las dosis de partida preliminares pueden extrapolarse de experimentos usando vectores lentivirales en modelos animales, por métodos conocidos en la técnica, o pueden extrapolarse a partir de comparaciones con dosis retrovirales conocidas (por ejemplo adenovirales). En general, se usarán inicialmente dosificaciones pequeñas y, si es necesario, se aumentarán en incrementos pequeños hasta que se alcance el efecto óptimo según las circunstancias. Las dosificaciones ilustrativas están dentro del intervalo de 10^8 hasta aproximadamente 5×10^{15} partículas.

Para vacunaciones se administrará ADN IM en PBS como se ha descrito previamente en liposomas, con inoculación intradérmica, electro-inyección u otros métodos. Como ejemplo, se descubrió que 5 mg por dosis IM en macacos (ADN a 1 mg/ml) inyectados en varios sitios diferentes producían una buena respuesta inmune.

Los inóculos se preparan típicamente como una solución en un vehículo fisiológicamente aceptable tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato y similares para formar una composición farmacéutica acuosa.

Los agentes descritos en este documento generalmente se administran con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable para los mismos. Un vehículo fisiológicamente aceptable es uno que no provoca una reacción física adversa tras su administración y en el que los ácidos nucleicos u otros agentes de la invención son suficientemente solubles para conservar su actividad para suministrar una cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz del compuesto. La cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz y método de administración de un agente puede variar basándose en el paciente individual, la indicación que se esté tratando y otros criterios evidentes para un experto habitual en la materia. Una construcción de ácido nucleico descrita en este documento está preferentemente presente en una cantidad que es capaz de expresar la proteína codificada en una cantidad que es eficaz para inducir anticuerpos y/o linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un ácido nucleico es una suficiente para evitar, o atenuar la gravedad, alcance o duración de los efectos nocivos de la afección que se esté tratando sin provocar efectos secundarios adversos significativos. La vía o las vías de administración útiles en una aplicación particular son evidentes para un experto habitual en la materia.

Las vías de administración de los agentes descritos en este documento incluyen, pero sin limitación, parenteral, e inyección directa en un sitio afectado. Las vías parenterales de administración incluyen pero sin limitación intravenosa, intramuscular, intraperitoneal y subcutánea. La vía de administración de los agentes es típicamente parenteral y es preferentemente en la médula ósea, en el LCR, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraocular, intracraneal, intranasal y similares. Véase, por ejemplo, documento WO 99/04026 para ejemplos de formulaciones y vías de administración.

La presente descripción incluye composiciones de los agentes descritos anteriormente, adecuados para administración parenteral incluyendo, pero sin limitación, soluciones isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables. Tales soluciones incluyen, pero sin limitación, solución salina y solución salina tamponada con fosfato para inyección nasal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea o directa en una articulación u otra área.

Al proporcionar los agentes a un mamífero receptor, preferentemente un ser humano, la dosificación administrada variará dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, condición médica general, historial médico previo del mamífero y similares.

La administración de las composiciones farmacéuticas de la invención puede ser para fines “profilácticos” o “terapéuticos”. Cuando se proporcionan de forma profiláctica, las composiciones se proporcionan antes de cualquier síntoma. La administración profiláctica de la composición actúa para evitar o aliviar cualquier efecto nocivo posterior (incluyendo gravedad, duración o alcance de los síntomas) de la afección que se esté tratando. Cuando se proporciona de forma terapéutica, la composición se proporciona en el momento de (o poco después de) la aparición de un síntoma de la afección que se esté tratando.

Para todos los usos terapéuticos, profilácticos y diagnósticos, uno o más de los agentes, así como anticuerpos y otros reactivos necesarios y dispositivos y accesorios apropiados, pueden proporcionarse en forma de kit para que esté fácilmente disponible y se use fácilmente.

Cuando están implicados inmunoensayos, tales kits pueden contener un soporte sólido, tal como una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa), una perla, una esfera, tubo de ensayo, varilla y así sucesivamente, a los que se unirá un receptor tal como un anticuerpo específico para la molécula diana. Tales kits también pueden incluir un segundo receptor, tal como un anticuerpo marcado. Tales kits pueden usarse para ensayos de tipo sándwich para detectar toxinas. También se prevén kits para ensayos competitivos.

VI. Aplicabilidad industrial

Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden expresarse en la célula u organismo hospedador nativo o en una célula u organismo diferente. Los genes mutados pueden introducirse en un vector tal como un plásmido, cósmido, fago, virus o minicromosoma e insertarse en una célula u organismo hospedador por métodos bien conocidos en la técnica. En general, las construcciones pueden utilizarse en cualquier célula, eucariota o procariota, incluyendo células de mamífero (por ejemplo, células humanas (por ejemplo, HeLa), de mono (por ejemplo, Cos), de conejo (por ejemplo, reticulocitos de conejo), rata, hámster (por ejemplo, CHO y células de riñón de cría de hámster) o células de ratón (por ejemplo, células L), células vegetales, células de levadura, células de insecto o células bacterianas (por ejemplo, *E. coli*). Los vectores que pueden utilizarse para clonar y/o expresar secuencias de ácido nucleico descritas en este documento son los vectores que son capaces de replicar y/o expresar las secuencias codificantes en la célula hospedadora en la que las secuencias codificantes se desean replicar y/o expresar. Véase, por ejemplo, F. Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (1992) y Sambrook *et al.* (1989) para ejemplos de vectores apropiados para diversos tipos de células hospedadoras. Los promotores nativos para tales secuencias codificantes pueden remplazarse con promotores fuertes compatibles con el hospedador en el que se insertan las secuencias codificantes. Estos promotores pueden ser inducibles. Las células hospedadoras que contienen estas secuencias codificantes pueden usarse para expresar grandes cantidades de la proteína útil en preparaciones enzimáticas, compuestos farmacéuticos, reactivos de diagnóstico, vacunas y compuestos terapéuticos.

Las construcciones descritas en este documento también pueden usarse para terapia génica *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, una construcción producirá un ARNm *in situ* para aumentar en última instancia la cantidad de polipéptido expresado. Tales polipéptidos incluyen antígenos virales y/o antígenos celulares. Se espera que tales construcciones y sus productos de expresión sean útiles, por ejemplo en el desarrollo de una vacuna y/o terapia génica.

Las construcciones y/o productos preparados usando construcciones que codifican antígenos de interés podrían usarse, por ejemplo, en la producción de reactivos de diagnóstico, vacunas y terapias para enfermedades, tales como SIDA y enfermedades relacionadas con SIDA.

Por ejemplo, pueden usarse vectores que expresan niveles altos de Gag en inmunoterapia e inmunoprofilaxis, después de expresión en seres humanos. Tales vectores incluyen vectores retrovirales y también incluyen inyección directa de ADN en células musculares u otras células receptoras, dando como resultado la expresión eficaz de gag, usando la tecnología descrita, por ejemplo, en Wolff *et al.*, Science 247: 1465-1468 (1990), Wolff *et al.*, Human Molecular Genetics 1(6): 363-369 (1992) y Ulmer *et al.*, Science 259: 1745-1749 (1993). Además, las construcciones de gag podrían usarse en la inhibición transdominante de expresión de VIH después de la introducción en seres humanos. Para esta aplicación, por ejemplo, se modificarían vectores de expresión o moléculas de ADN que expresen altos niveles de p55^{gag} o p37^{gag} para generar mutantes de gag transdominante, como se describe, por ejemplo, en Trono *et al.*, Cell 59: 113-120 (1989). Los vectores se introducirían en seres humanos, dando como resultado la inhibición de producción de VIH debido a los mecanismos combinados de inhibición transdominante de gag y de innoestimulación por la proteína gag producida. Además, las construcciones que codifican gag podrían usarse en la generación de nuevos vectores retrovirales basándose en la expresión de proteínas gag lentivirales. Los lentivirus tienen características únicas que pueden permitir la dirección e infección eficaz de células que no se dividen. Se esperan aplicaciones similares para vectores que expresen altos niveles de env.

Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones de la presente invención, pero no deberían interpretarse con limitantes de su alcance de ninguna manera. Ciertas modificaciones y variaciones resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de las enseñanzas de la descripción anterior y los ejemplos posteriores.

Ejemplo 1

Vectores

5 Se usan vectores de ADN que expresan antígenos de VIH-1 o VIS en los ejemplos de este documento.

Tres tipos diferentes de plásmidos que codifican formas de Gag de VIH ejemplificados en este documento son como sigue:

- 10 1) plásmidos que expresan gag completa (p55) o partes de gag (p37) o gag y proteasa (p55gagpro). P55 produce partículas de gag que se liberan parcialmente a partir de la célula. P37 se libera parcialmente a partir de la célula pero no a partir de partículas. P55gagpro también produce proteasa, de este modo la gag se procesa para formar p17, p24, p6 y p7;
- 15 2) plásmidos que expresan la quimiocina MCP-3 fusionada con el extremo N terminal de p55gag. Puesto que MCP-3 es una proteína secretada, la proteína de fusión producida también se secreta a partir de las células de mamífero después de la escisión del péptido señal; y
- 3) plásmidos que expresan fusiones de gag con secuencias que confieren degradación proteasómica eficaz.

20 Se produjeron vectores de expresión de ADN similares para proteína env de VIH (véase, por ejemplo, Figuras 8-9), así como para proteínas gag y env de VIS. Los plásmidos de env de VIH se construyeron basándose en una secuencia de env de clade B de VIH y se ensayaron con respecto a expresión. La expresión fue alta en ausencia de Rev. (Véase Figura 10). Se describen vectores específicos y combinaciones de los mismos, en más detalle posteriormente. Los inventores también tienen variaciones de los vectores que no contienen aminoácidos enlazadores, o contienen menos aminoácidos para CATENINA, etc., que no se ejemplifican específicamente en este

25 documento. Se sabe que existen fragmentos más pequeños de las secuencias secretoras o la secuencia de estabilización, que los ejemplificados en este documento, que mantienen la función deseada, en algunos casos, o pueden identificarse por experimentación rutinaria. Estas secuencias también son útiles en este documento.

30 P37gag = plásmido de VIH descrito previamente

MCP3p37gag = como anteriormente y también contiene la secuencia líder de ip10.

Lo siguiente es un ejemplo para MCP3p37gag:

35 El vector pCMVkanMCP3gagp37M1-10 expresa la siguiente proteína de fusión de MCP3-gag (SEC ID N° 1):

M N P S A A V I F C L I L L G L S G T Q
 (IP10)
 G I L D (enlazador)
 M A Q P V G I N T S T T C C Y R F I N K K I P K
 Q R L E S Y R R T T S S H C P R E A V I F K T K
 L D K E I C A D P T Q K W V Q D F M K H L D K
 K T Q T P K L (MCP-3)
 A S A G A (enlazador)
 G A R A S V L S G G E L D R W E K I R L R P G G
 K K K Y K L K H I V W A S R E L E R F A V N P G
 L L E T S E G C R Q I L G Q L Q P S L Q T G S E E
 L R S L Y N T V A T L Y C V H Q R I E I K D T K
 E A L D K I E E E Q N K S K K K A Q Q A A A D T
 G H S N Q V S Q N Y P I V Q N I Q G Q M V H Q A
 I S P R T L N A W V K V V E E K A F S P E V I P
 M F S A L S E G A T P Q D L N T M L N T V G G H
 Q A A M Q M L K E T I N E E A A E W D R V H P
 V H A G P I A P G Q M R E P R G S D I A G T T S
 T L Q E Q I G W M T N N P P I P V G E I Y K R W
 I I L G L N K I V R M Y S P T S I L D I R Q G P K
 E P F R D Y V D R F Y K T L R A E Q A S Q E V K
 N W M T E T L L V Q N A N P D C K T I L K A L G
 P A A T L E E M M T A C Q G V G G P G H K A R
 V L E F • (p37gag HIV)

CYBp37gag = contiene secuencias desestabilizadoras de ciclina B

CATEp37gag = contiene secuencias desestabilizadoras de beta catenina

5 MOSp37gag = contiene secuencias desestabilizadoras de mos

SIVMCP3p39= como anteriormente para VIH

10 SIVCATEp39= como anteriormente para VIH

SIVgagDX es un clon molecular de gag de VIS independiente de Rev. Este vector se describe en el documento PCT/US00/34985 presentado el 22 de diciembre de 2000 (publicado como documento WO 01/46408 el 28 de junio de 2001). P39 indica una secuencia de ADN que codifica Gag p39 de VIS (p17 + p25 de VIS). P57 indica una secuencia de ADN que codifica la Gag p57 de VIS completa.

15 "Gag" indica secuencia de ADN que codifica la proteína Gag, que genera componentes del núcleo del virión, "Pro" indica "proteasa". Los genes de proteasa, transcriptasa inversa e integrasa comprenden el gen de "pol". En estas construcciones "MCP3" indica aminoácidos de MCP-3 33-109 unidos a péptido secretor IP-10 al que se ha hecho referencia anteriormente (como alternativa, puede unirse a su propio péptido secretor natural o cualquier otra señal secretora funcional tal como la señal de tPA mencionada anteriormente), "CYB" indica los aminoácidos 10-95 de Ciclina B, "MOS" indica los aminoácidos 1-35 de C-mos y "CATE" indica los aminoácidos β-catenina.

20 Secuencias de ácido nucleico de Ciclina B y aminoácidos codificados usados en las construcciones ilustradas en este documento:

ATGTCCAGTGATTTGGAGAATATTGACACAGGAGT
 TAATTCTAAAGTTAAGAGTCATGTGACTATTAGGC
 GAACTGTTTTAGAAAGAAATTGGAAATAGAGTTAC
 AACCAGAGCAGCACAAAGTAGCTAAGAAAGCTCAG
 AACACCAAAGTTCCAGTTCAACCCACCAAAACAA
 CAAATGTCAACAAACAACCTGAAACCTACTGCTTCT
 GTCAAACCAGTACAGATGGAAAAGTTGGCTCCAA
 AGGGTCCTTCTCCACACCTGTCGACAGAGAGATG
 GGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAAT
 TAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGG
 GGGAAAGAAGAAGTACAAGCTAAAGCACATCGTA
 TG (SEC ID N°: 2)

MetSerSerAspLeuGluAsnIleAspThrGlyValAsnSerLysVal
 LysSerHisValThrIleArgArgThrValLeuGluGluIleGlyAsnAr
 gValThrThrArgAlaAlaGlnValAlaLysLysAlaGlnAsnThrLy
 sValProValGlnProThrLysThrThrAsnValAsnLysGlnLeuLy

sProThrAlaSerValLysProValGlnMetGluLysLeuAlaProLys
 GlyProSerProThrProValAspArgGlu (SEC ID N°: 3)

25 Secuencias de ácido nucleico de c-Mos y aminoácidos codificados usados en las construcciones ilustradas en este documento:

30 ATGCCCGATCCCCTGGTCGACAGAGAG (SEC ID N° 4)

MetProAspProLeuValAspArgGlu (SEC ID N° 5)

Ejemplo 2

5 Construcción de Vectores

Para diseñar construcciones “desestabilizadas de Gag”, una búsqueda de la bibliografía de secuencias caracterizadas capaces de dirigir proteínas a la ruta de degradación de proteasoma-ubiquitina proporcionó la siguiente lista, no necesariamente representativa:

10

c-Myc	aa2-120
Ciclina A	aa13-91
Ciclina B	aa13-91 *los inventores usaron 10-95 en los ejemplos de este documento
IkBa	aa20-45
b-Catenina	aa19-44 * los inventores usaron 18-47 en los ejemplos de este documento
c-Mos	aa1-35

Los inventores clonaron un subconjunto de las secuencias de degradación de ADNc de Jurkat, concretamente las señales de ciclina B, β -catenina y c-Mos, usando PCR. Los cebadores tanto de ciclina como de catenina proporcionaron fragmentos de la longitud esperada, que se cortaron y clonaron en el sitio Sall de los vectores pCMV37(M1-10)kan o pCMV55(M1-10)kan y (versión Bam) en el sitio BamHI de pFREDlacZ. (los plásmidos p37 y p55 tienen las mismas secuencias de p37 y p55 descritas en las patentes que contienen secuencias de INS-gag (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.972.596 y Patente de Estados Unidos N° 5.965.726) pero tienen una cadena principal de plásmido diferente que expresa kanamicina. pFREDlacZ contiene el promotor IE de CMV que expresa beta galactosidasa de *E coli*.)

15

20

Los plásmidos correspondientes se llaman:

pCMV37(M1-10)kan con secuencia de ciclina B en el sitio Sall	pS194
pCMV37(M1-10)kan con secuencia de β -catenina en el sitio Sall	pS195
pCMV55(M1-10)kan con secuencia de ciclina B en el sitio Sall	pS199
pCMV55(M1-10)kan con secuencia de β -catenina en el sitio Sall	pS200
pFREDlacZ con secuencia de ciclina B en el sitio BamHI	pS201
pFREDlacZ con secuencia de β -catenina en el sitio BamHI	pS202

25

En el caso de Mos, la señal de degradación consiste en cinco aminoácidos N-terminales y una lisina a aproximadamente 30 aminoácidos de distancia. Una lisina localizada de forma similar está presente en gag de VIH, pero no en lacZ. Por esa razón, se sintetizaron oligos que abarcaban los cinco aminoácidos desestabilizadores (ambas cadenas), se hibridaron y se ligaron al extremo N-terminal de gag, pero no lacZ. Hubo tres versiones de la secuencia de MOS:

MOSN5wtUP y MOSN5wtDN	tiene serina que se ha mostrado que provoca degradación cuando se fosforila
MOSN5aspUP	y tiene sustitución de Ser por Asp, que limita la fosforilación para acción constitutiva
MOSN5aspDN	
MOSN5argUP	y tiene sustitución de Ser por Arg, supuestamente marcando señal de degradación
MOSN5argDN	inactiva

30

De los seis plásmidos planeados, los inventores solamente examinaron los siguientes:

pS191 que tiene pCMV37(M1-10)kan con la secuencia Mos de tipo silvestre (“WT”), pero el inserto es más largo de lo pretendido, con una copia adicional de la secuencia sintética a la inversa;

35

pS192 que tiene pCMV37(M1-10)kan con secuencia de Mos “Asp” en el sitio de Sall; y

pS197 con pCMV55(M1-10)kan con secuencia de Mos “Asp” en el sitio de Sall.

40

Ejemplo 3

Caracterización Preliminar de las Señales de Degradación en los Vectores

45

Se realizaron los siguientes experimentos para caracterización preliminar de las señales de degradación en las construcciones de ácido nucleico descritas anteriormente.

Se midió la actividad β -galactosidasa en células HeLa y 293 transfectadas de forma transitoria después de transfección con pFREDlacZ o sus versiones modificadas con ciclina B o β -catenina (pS201 y 202). La aparente

pérdida de actividad lacZ se interpretó como indicativa de degradación proteica inducida por señal de ubiquitinación.

Con Gag modificada se realizaron los siguientes experimentos para confirmar que las señales de degradación también actúan en el contexto de gag. En primer lugar se midió p24-gag por ELISA en extractos celulares y sobrenadantes de células transfectadas con las construcciones de Gag modificadas. Aunque los inventores obtuvieron pruebas de desestabilización, en varios casos este experimento que mide el nivel total de antígeno p24 no fue conclusivo. Esto fue probablemente debido a que, como se ha mostrado previamente, los fragmentos de gag aún pueden puntuar de forma positiva en el procedimiento de ensayo de captura de antígenos. Por lo tanto los inventores investigaron lo intactas que estaban las proteínas producidas.

Se procesaron extractos proteicos de células HeLa o 293 transfectadas de forma transitoria con diferentes plásmidos de gag en gel de acrilamida tris-glicina, se transfirieron a membrana Immobilon P y se tiñeron con anticuerpos anti-VIH para revelar Gag. Estos experimentos no mostraron ninguna señal de degradación en células HeLa, sin embargo las células 293 transformadas con las versiones modificadas por ciclina o β -catenina de Gag claramente demostraron a presencia de bandas prominentes teñidas con Gag de peso molecular más pequeño que la Gag modificada de longitud completa. Tales bandas de longitud completa no se observaron con las células transfectadas con Gag de tipo silvestre. Estos hallazgos son coherentes con la degradación de Gag inducida por señal.

Para examinar adicionalmente si las modificaciones N-terminales inducen degradación de Gag, los inventores realizaron experimentos de seguimiento de pulso con células 293 transfectadas de forma transitoria. Un día después de la transfección las células se incubaron en medio sin metionina para agotar los grupos celulares, se marcaron con ^{35}S -metionina en el mismo medio y se siguieron mediante la adición de un exceso de 1.000 veces de la metionina fría. Se han realizado dos experimentos. Uno con pulso de ~1 hora y seguimiento de 12 horas y otro con pulso de 30 minutos y seguimiento de 1,5 horas. Los experimentos mostraron que la gag modificada degrada más rápidamente que la Gag de tipo silvestre. Las señales derivadas tanto de ciclina B como β -catenina actuaron en la desestabilización de Gag en un grado similar. Se analizaron experimentos adicionales con las fusiones de construcciones de env-beta catenina y verificaron que las fusiones eran mucho más inestables después de expresión en células humanas.

30 Ejemplo 4

Respuestas Proliferativas de Vectores y Combinaciones de Vectores

Estos vectores se ensayaron con respecto a expresión proteica *in vitro* después de transfecciones en células de mamífero y con respecto a inmunogenicidad en ratones y primates (macacos).

Métodos:

Se purificó ADN usando el kit de purificación de ADN sin endotoxinas Qiagen. Los niveles de endotoxinas se midieron de forma rutinaria y fueron muy bajos (ensayo de QCL cinético, Bio-Whittaker proporcionó aproximadamente una unidad de endotoxina/mg de ADN en estas preparaciones).

Se inyectó a los ratones por vía intramuscular 100 μg de ADN en 100 μl de PBS. Se proporcionaron tres inyecciones de ADN los días 0, 14 y 28. El día 35 los ratones se sacrificaron y sus esplenocitos se ensayaron con respecto a proliferación en presencia de antígeno de gag específico. Además, se evaluaron las respuestas citotóxicas realizando ensayos de citotoxicidad convencionales. La respuesta de anticuerpo de los ratones vacunados también se está evaluando usando sueros obtenidos de estos animales.

Para experimentos con monos, se inyectaron 5 mg de ADN de VIH MCP3gag en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) en varios puntos por vía intramuscular en macacos Rhesus, después de sedar a los animales. Se proporcionaron cuatro inyecciones a las 0, 2, 4 y 8 semanas. Los animales se siguieron por varios ensayos para evaluar la respuesta inmune celular y humoral. Inmunizaciones previas con gag p37M1-10, descritas en la patente anterior de los inventores proporcionaron solamente niveles bajos de anticuerpo. La construcción gag previa estimuló bien la inmunidad celular, pero no los anticuerpos.

La Figura 1 muestra las respuestas proliferativas (mostradas como índice de estimulación, SI) en ratones a los que se han inyectados los vectores indicados o combinaciones de los siguientes vectores que contienen secuencias de ADN que codifican polipéptidos de VIH, o controles polipeptídicos:

60 p37gag
MCP3p37gag
CYBp37gag
CATEp37gag

MOSp37gag = *los inventores usaron Mos WT en el ejemplo de este documento

65 CATE+MCP3 =*2 construcciones, véase anteriormente; estos son los mismos plásmidos usados solos o en combinaciones

CATE+MCP3+p37 = *3 construcciones, véase anteriormente

La Figura 2 muestra respuestas proliferativas (mostradas como índice de estimulación, SI) en ratones a los que se inyectaron dos veces los plásmidos de expresión de VIS o combinaciones. Juntos = inyección de 3 ADN en los mismos sitios; 3 sitios = inyecciones de los mismos ADN en sitios separados. Cuando se usaron los "mismos sitios", todos los ADN se mezclaron e inyectaron en los mismos sitios corporales en el músculo. Cuando se usaron sitios separados, los ADN se mantuvieron por separado y se inyectaron en sitios anatómicos que están separados. Esto se produjo cada vez que los inventores inmunizaron a los ratones, es decir, los 3 ADN se mantuvieron por separado y se inyectaron en sitios diferentes entre sí y se usaron diferentes sitios de inyección para cada vacunación.

SIVgagDX
SIVMCP3p39
SIVCATEp39
MCP3+CATE+P57 (juntos)
MCP3+CATE+P57 (3 sitios)

La Figura 3 muestra las respuestas de anticuerpo en monos. Se inyectó a dos animales (Nº 585, 587) 4x con 5 mg IM de vector de expresión de MCP3p37gag. Se proporcionó a dos animales (Nº 626, 628) el mismo ADN por vía mucosal que las preparaciones de ADN-liposoma. Las titulaciones se representan como diluciones en suero recíprocas con puntuación positiva en ensayos de ELISA anti p24 de VIH.

Resultados

Los inventores descubrieron que las fusiones de MCP-3 con gag redujeron drásticamente la respuesta inmune a gag, en comparación con los vectores de gag no modificados (tipo 1 como se ha descrito anteriormente), véase figuras. Esta propiedad puede ser en parte el resultado de secreción de gag más eficaz de las células, puesto que los inventores han mostrado recientemente que gag secretado que tenía la secuencia líder de tPA era más eficaz en la secreción e inmunogenicidad (Qiu *et al*, J. Virol. 2000).

Además, este efecto puede mediarse por la función de la molécula de MCP-3. La magnitud de la respuesta sugiere efectos adicionales de MCP-3, de acuerdo con los efectos notificados de MCP-3 en la inducción de inmunogenicidad contra un antígeno tumoral. La inyección intramuscular de este MCP3p37gag en macacos condujo a la producción de anticuerpos anti-gag de titulación alta. Este no fue el caso con un vector de expresión de gag previamente ensayado, lo que indica que es posible inducir una respuesta de anticuerpo eficaz en primates solamente por vacunación de ADN. Además, estos resultados sugieren que la inmunogenicidad mejorada en ratones era un método satisfactorio para predecir la inmunogenicidad aumentada en primates. Los inventores ensayaron por lo tanto varios vectores y combinaciones de vectores en ratones, en un intento de identificar las mejores combinaciones para experimentos posteriores en primates.

Los inventores también estudiaron la expresión e inmunogenicidad de vectores que dirigen los antígenos de VIH expresados a degradación por proteasoma y presentación eficaz en la superficie celular mediante la clase de moléculas de MHC-I. Se sabe que la inmunidad restringida por MHC-I es importante para defensas anti-virales. La presentación de MHC-I de forma intracelular produjo péptidos cortos en la superficie celular. Un cambio en la composición de los péptidos expuestos por una célula, indica al sistema inmune que la célula es anómala (por ejemplo infectada por virus) y debería destruirse. Los péptidos expuestos a MHC-I se originan de degradación proteasómica de proteínas celulares. Los inventores ensayaron la hipótesis de que proporcionar fuertes señales de ubiquitinación adicionales a antígenos de VIH que lo dirigen a degradación proteasómica aumentaría sus posibilidades de procesarse para presentación en superficie.

Los inventores ensayaron varias señales de ubiquitinación dentro de proteínas conocidas para conferir degradación rápida después de unir las al extremo N-terminal de Gag de VIH. En paralelo, las mismas señales de ubiquitinación se fusionaron con beta-galactosidasa para comprobar la eficacia de degradación por la caída en su actividad enzimática. Este ensayo mostró que todas las señales seleccionadas potenciaron la degradación de beta-galactosidasa.

La secuencia más eficaz identificada por estos experimentos corresponde a los aminoácidos 18-47 de beta-catenina, una proteína implicada en la señalización de Wnt y adhesión célula-célula, cuya abundancia se controla por degradación.

30 aa de Beta-catenina (18-47):

R K A A V S H W Q Q Q S Y L D S G I H S G A T T
T A P S L S (SEC ID Nº: 6)

Beta-catenina (18-47) añadida en el extremo N-terminal de antígenos de VIH con iniciador AUG Met:

M R K A A V S H W Q Q S Y L D S G I H S G A
T T T A P S L S (SEC ID N°: 7)

5 La inyección en ratones de construcciones de ADN que expresan Gag de VIH-1, o Gag fusionada con dominio de desestabilización de beta-catenina mostró que la segunda construcción era más inmunogénica. En comparación con Gag sola, la fusión de beta-catenina-Gag indujo respuestas proliferativas específicas de VIH más altas, respuesta de CTL elevada y nivel más alto de células secretoras de IFNgamma+ CD8+.

10 Las comparaciones directas con otras secuencias de desestabilización mostraron una potencia global más alta de fusión de beta-catenina-Gag. Por lo tanto, una conclusión sorprendente es que, aunque varias secuencias aumentaron el procedimiento de proteasoma y desestabilización de proteína las secuencias de beta-catenina eran mucho mejores en la inducción de una respuesta inmune aumentada. Puesto que el resultado práctico de estos estudios son procedimientos de vacunación mejorados, los inventores proponen el uso de preferentemente las secuencias de beta-canina identificadas aquí para su uso en dirección de antígenos a degradación.

15 Otra importante conclusión vino de estudios de combinaciones de vectores que expresaban diferentes formas de antígenos. Se descubrió que las combinaciones mostraban inmunogenicidad mejorada especialmente cuando se inyectaban en diferentes sitios en el mismo ratón, en comparación con una mezcla de vectores de ADN inyectados en el mismo sitio.

20 Los inventores proponen que diferentes formas de los antígenos desencadenan respuestas inmunes cualitativamente diferentes. Por lo tanto, las combinaciones de antígenos aplicadas en diferentes sitios y también en diferentes momentos, pueden aumentar respuesta inmune protectora. Los resultados hasta la fecha apoyan la conclusión de que usar diferentes formas de ADN de forma secuencial o en combinaciones pero aplicadas en diferentes sitios puede reproducir la buena inmunogenicidad obtenida con otras combinaciones de vacuna de sensibilización-refuerzo. Esta será una mejora drástica sobre los procedimientos existentes para vacunación de ADN en primates, que se ha mostrado que es ineficaz, especialmente para estimular la inmunidad humoral.

EJEMPLO 5

Inmunogenicidad de Vectores de ADN de Env de VIS y Gag de VIS en Macacos

30 Basándose en los datos anteriores que sugieren que las formas modificadas de los antígenos de VIH y VIS mostraron diferentes respuestas inmunes después de vacunación con ADN, los inventores estudiaron la inmunogenicidad de tres vectores de vacuna de ADN diferentes para gag de VIS y env de VIS en 12 macacos. Los ADN usados se muestran en la Tabla 1, a continuación:

Tabla 1

Vectores de ADN de VIS

	<u>gag</u>	nombre completo	
1	p57gag	SIVgagDX	WT
3	MCP3gag	SIVMCP3p39	extracelular
5	CATEgag	SIVCATEp39	intracelular
	<u>env</u>		
2	gp160env	pCMVkan/R-R-SIVgp160CTE	WT
4	MCP3env	pCMVkan/MCP3/SIVgp160CTE	extracelular
6	CATEenv	pCMVkan/CATE/SIVgp160CTE	intracelular

40 Los vectores de gag de VIS son los mismos que los usados en los experimentos con ratones descritos en los ejemplos previos anteriores. El vector parental SIVenv se ha descrito en la Solicitud de Patente N° de Serie 09/872.733, presentada el 1 de junio de 2001 como un ejemplo de un vector con altos niveles de expresión. El diagrama esquemático y la secuencia de este vector se exponen en las Figuras 6 y 7 en este documento, respectivamente. Los vectores de fusión en MCP3 y CATE contienen las mismas secuencias de MCP3 y CATE descritas para los vectores de gag.

50 Se inmunizaron tres grupos de cuatro macacos vírgenes (grupos 1, 2, 3) por vía intramuscular con preparaciones de ADN purificado en PBS como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2

Inmunización con ADN				
semana	0	4	12	24
Grupo 1:	1, 2, 3, 4	1, 2, 3, 4	1, 2, 3, 4	1, 2, 3, 4
Grupo 2:	1, 2, 5, 6	1, 2, 5, 6	1, 2, 5, 6	1, 2, 5, 6
Grupo 3:	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6	1, 2, 3, 4, 5, 6
Grupo 4:	5, 6	5, 6	3, 4	3, 4
Grupo 5:	1, 2	1, 2	1, 2	1, 2

5 Se inyectaron a los animales los ADN indicados. La cantidad total de ADN inyectado cada vez por animal se mantuvo constante a 3 mg para gag y 3 mg para env. Se inyectó a los animales en sitios diferentes con los diferentes ADN. Las inyecciones fueron por vía intramuscular con el ADN suministrado en PBS a 1 mg/ml. Los sitios de inyecciones fueron anatómicamente separados para los diferentes ADN.

10 Además, se inmunizaron cuatro animales (grupo 4) en primer lugar con ADN 5 y 6 (es decir, gag de CATE de VIS y env de CATE de VIS) y posteriormente en las semanas 12 y 24 con los ADN 3 y 4 (es decir, gag de MCP3 de VIS y env de MCP3 de VIS). Dos animales del grupo 5 recibieron los ADN que expresaban antígenos de tipo silvestre no modificados para gag y env (1 y 2). Los animales de los grupos 4 y 5 se habían expuesto previamente a ADN de VIH, pero eran vírgenes para antígenos de VIS, lo que se verificó por ensayos inmunológicos (mediciones de anticuerpos y respuestas linfoproliferativas a estimulación con antígeno específico). A pesar de esto, los animales de los grupos 4 y 5 mostraron respuestas tempranas a inyección con ADN de VIS, lo que indica una respuesta anamnésica a antígenos de VIS. Por lo tanto, el experimento para los grupos 4 y 5 necesita repetirse con animales vírgenes para las conclusiones finales.

20 En momentos secuenciales durante la vacunación se obtuvieron muestras de sangre y se analizaron con respecto a la presencia de anticuerpos, respuestas linfoproliferativas y linfocitos T citotóxicos.

Las titulaciones de anticuerpo obtenidos para gag son como se muestra en la Tabla 3. Se muestra la recíproca de la dilución más alta con mutación positiva en ensayos de ELISA. Las células vacías indican reactividad de anticuerpos por debajo de dilución 1:50.

25 Estos resultados mostraron que la administración de vector MCP3gag se asocia con respuesta de anticuerpo fuerte, debido a que 8/8 (100%) de los animales que recibieron MCP3gag (en los Grupos 1 y 3) desarrollaron anticuerpos gag altos. Por el contrario, 3/6 (50%) de los animales no recibieron anticuerpos desarrollados con MCP3gag (en los Grupos 2 y 5).

30 Las respuestas de linfocitos T citotóxicos específicos contra gag y env se evaluaron midiendo el número de células CD8 que producen IFN γ o TNF α intracelular en presencia de grupos de péptidos sintéticos gag o env (15 unidades solapantes). Los valores obtenidos después de tres vacunaciones con ADN se muestran en las Figuras 4 y 5. Resulta interesante que la combinación de tres vectores aumentó el número de células productoras de IFN γ específicas tras estimulación con péptidos. Se concluyó que los animales que recibieron las tres formas de antígeno mostraron respuesta de anticuerpo aumentada sin reducir la respuesta inmune celular. De hecho la respuesta inmune celular también mostró respuesta inmune celular aumentada y los resultados mostraron diferencias estadísticas significativas.

40 Estos datos indican el desarrollo de una respuesta inmune más equilibrada que lo que se anticipaba previamente por vacunación con ADN en macacos, mediante la combinación de diferentes formas antigénicas.

Las respuestas del grupo 4 (no mostrado anteriormente) también fueron elevadas (el 1,11% y el 0,88% para gag y env, respectivamente), pero esto necesita repetirse vacunando animales vírgenes.

45 El mecanismo de esta inmunogenicidad aumentada por la combinación de vectores de ADN necesita examinarse adicionalmente. La expresión y secreción de quimeras de antígeno de MCP-3 puede conducir a aumento de los niveles de proteínas que estimulan eficazmente las respuestas inmunes humorales. La combinación de diferentes formas de antígeno también puede promover mejor activación y coordinación de células efectoras.

50 La Tabla 3 muestra respuesta de anticuerpo de gag de VIS para todos los grupos desde el momento de la primera inmunización.

También se detectaron cantidades bajas de enzima indicadora en otros tejidos (hígado, bazo, piel, pulmón, cerebro y sangre) inyectados con los vectores de ARN y ADN. También se ha demostrado que ADN plasmídico inyectado por vía intramuscular se expresa de forma estable en músculo de primate no humano. S. Jiao *et al.*, Hum. Gene Therapy 3: 21-33 (1992).

5 Se ha propuesto que la transferencia directa de genes en músculo humano *in situ* puede tener varias aplicaciones clínicas potenciales. El músculo es potencialmente un tejido adecuado para la expresión heteróloga de un transgen que modificaría las patologías en las que no está implicado de forma principal el músculo, además de en las que sí. Por ejemplo, el tejido muscular podría usarse para la expresión heteróloga de proteínas que pueden inmunizar, secretarse en la sangre o eliminar un metabolito tóxico en circulación. El uso de ARN y un tejido al que puede accederse de forma repetitiva podría ser útil para un tipo reversible de transferencia génica, administrada de forma muy parecida a los tratamientos farmacéuticos convencionales. Véase .A. Wolff, *et al.*, Science 247: 1465-1468 (1990) y S. Jiao *et al.*, Hum. Gene Therapy 3: 21-33 (1992).

15 Se ha propuesto por J.A. Wolff *et al.*, mencionado anteriormente, que la expresión intracelular de genes que codifican antígenos podría proporcionar enfoques alternativos al desarrollo de vacunas. Esta hipótesis se ha apoyado por un informe reciente de que el ADN transgénico que codifica nucleoproteína de gripe A inyectado en el cuádriceps de ratones BALB/c dio como resultado la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos de nucleoproteína de gripe A y protección de una presentación posterior con una cepa heteróloga de virus de la gripe A, como se mide por titulaciones virales en pulmón reducidas, inhibición de pérdida de masa y aumento de la supervivencia. J. B. Ulmer *et al.*, Science 259: 1745-1749 (1993).

25 Por lo tanto, parece que la inyección directa de vectores de ARN o ADN que codifican el antígeno viral puede usarse para expresión endógena del antígeno para generar el antígeno viral para presentación al sistema inmune sin necesidad de agentes de auto-replicación o adyuvantes, dando como resultado la generación de CTL específicos del antígeno y protección de una presentación posterior con una cepa homóloga o heteróloga de virus.

30 Los CTL tanto en ratones como en seres humanos son capaces de reconocer epítopos derivados de proteínas virales internas conservadas y se cree que son importantes en la respuesta inmune contra virus. Por reconocimiento de epítopos a partir de proteínas virales conservadas, los CTL pueden proporcionar protección entre cepas. Los CTL específicos para antígenos virales conservados pueden responder a diferentes cepas de virus, a diferencia de los anticuerpos, que son generalmente específicos de cepa.

35 Por lo tanto, la inyección directa de ARN o ADN que codifica el antígeno viral tiene la ventaja de no tener algunas de las limitaciones de los vectores virales o de suministro peptídico directo. Véase J.A. Ulmer *et al.*, anteriormente mencionado y los análisis y referencias en la misma. Además, la generación de anticuerpos de titulación alta para proteínas expresadas después de inyección de ADN indican que este puede ser un medio fácil y eficaz para preparar vacunas basadas en anticuerpo dirigidas hacia antígenos conservados o no conservados, de forma separada o en combinación con vacunas de CTL dirigidas a antígenos conservados. Estas también pueden usarse con vacunas peptídicas tradicionales, para la generación de vacunas de combinación. Además, debido a que la expresión proteica se mantiene después de la inyección de ADN, la persistencia de memoria de linfocitos B y T puede potenciarse, suscitando de este modo inmunidad mediada por células y tumoral de larga duración.

45 Vectores para la inmunoprofilaxis o inmunoterapia contra VIH-1

En una realización descrita en este documento los ácidos nucleicos de la invención se insertarán en vectores de expresión que contienen casetes de expresión independiente de REV usando un promotor constitutivo fuerte tal como CMV o RSV, o un promotor inducible tal como VIH-1.

50 El vector se introducirá en animales o seres humanos en un vehículo farmacéuticamente aceptable usando una de varias técnicas tales como inyección de ADN directamente en tejidos humanos; electroporación (*in vivo* o *ex vivo*) o transfección del ADN en células humanas primarias en cultivo (*ex vivo*), selección de células con respecto a propiedades deseadas y reintroducción de tales células en el cuerpo (dicha selección puede ser para la recombinación homóloga exitosa del ADN entrante a una región genómica preseleccionada apropiada); generación de partículas infecciosas que contienen el gen *gag*, infección de células *ex vivo* y reintroducción de tales células en el cuerpo; o infección directa por dichas partículas *in vivo*.

60 Se producirán niveles de proteína sustanciales (y se degradarán rápidamente en situaciones en las que sean parte de la proteína codificada secuencias de desestabilización) lo que conduce a una estimulación eficaz del sistema inmune.

65 En otra realización descrita en este documento, las construcciones descritas se modificarán para expresar proteínas Gag mutadas que son incapaces de participar en la formación de partículas virales. Se espera que tales proteínas Gag estimulen el sistema inmune en el mismo grado que la proteína Gag de tipo silvestre, pero sean incapaces de contribuir a producción de VIH-1 aumentada. Esta modificación debería dar como resultado vectores más seguros para inmunoterapia e inmunoprofilaxis.

VII. Referencias

- 5 1. Borrow, P., H. Lewicki, B.H. Hahn, G.M. Shaw y M.B. Oldstone. 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type I infection. *J. Virol.* 68: 6103-6110.
- 10 2. Koup, R.A., J. T. Safrit, Y. Cao, C.A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing y D. D. Ho. 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type I syndrome. *J. Virol.* 68: 4650-4655.
- 15 3. Pantaleo, G., J. F. Demarest, H. Soudeyns, C. Graziosi, F. Denis, J. W. Adelsberger, P. Borrow, M. S. Saag, G. M. Shaw, R. P. Sekaly, *et al.* 1994. Major expansion of CD8+ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. *Nature* 370: 463-467.
- 20 4. Musey, L., J. Hughes, T. Schacker, T. Shea, L. Corey y M.J. McElrath. 1997. Cytotoxic-T-cell reponses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N. Engl. J. Med.* 337: 1267-1274.
- 25 5. Ogg, G.S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P.R. Dunbar, M.A. Nowak, S. Monard, J.P. Segal, Y. Cao, S.L. Rowland-Jones, V. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D.D. Ho, D.F. Nixon y A.J. McMichael. 1998. Quantiation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* 279: 2103-2106.
- 30 6. Aldhous, M.C., K.C. Watret, J.Y. Mok, A. G. Bird y K.S. Froeber. 1994. Cytotoxic T lymphocyte activity and CD8 subpopulations in children at risk of HIV infection. *Clin. Exp. Immunol.* 97: 61-67.
- 35 7. Langlade-Demoyen, P., N. Ngo-Giang-Huong, F. Ferchal y E. Oksenhendler. 1994. Human immunodeficiency virus (HIV) Nef-specific cytotoxic T lymphocytes in noninfected heterosexual contact of HIV-infected patients. *J. Clin. Investig.* 93: 1293-1297.
- 40 8. Rowland-Jones, S.L., D.F. Nixon, M.C. Aldous, F. Gotch, K. Ariyoshi, N. Hallam, J. S. Kroll, K. Froebel y A. McMichael. 1993. HIV-specific cytotoxic T-cell activity in an HIV-exposed but uninfected infant. *Lancet* 341: 860-861.
- 45 9. Rosenberg, E.S., J.M. Billingsley, A.M. Caliendo, S.L. Boswell, P.E. Sax, S. A. Kalamas y B.D. Walker. 1997. Vigorous HIV-1-specific CD4+ T cell responses associated with control of viremia. *Science* 278: 1447-1450.
- 50 10. Schwartz, D., U. Sharma, M. Busch, K. Weinhold, T. Matthews, J. Lieberman, D. Birx, H. Farzedagen, J. Margolick, T. Quinn, *et al.* 1994. Absence of recoverable infectious virus and unique immune responses in an asymptomatic HIV+ long-term survivor. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10: 1703-1711.
- 55 11. Durali, D., J. Morvan, F. Letourneur, D. Schmitt, N. Guegan, M. Dalod, S. Saragosti, D. Sicard, J.P. Levy y E. Gomard. 1998. Cross-reactions between the cytotoxic T-lymphocyte responses of human immunodeficiency virus-infected African and European patients. *J. Virol.* 72: 3547-3553.
- 60 12. McAdam, S., P. Kaleebu, P. Krausa, P. Goulder, N. French, B. Collin, T. Blanchard, J. Whitworth, A. McMichael y F. Gotch. 1998. Cross-clade recognition of p55 by cytotoxic T lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS* 12: 571-579.
- 65 13. Qiu, J.T., R. Song, M. Dettenhofer, C. Tian, T. August, B.K. Felber, G.N. Pavlakis y X.F. Yu. 1999. Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses. *J. Virol.* 73: 9145-9152.
14. Schneider, R., M. Campbell, G. Nasioulas, B.K. Felber y G.N. Pavlakis. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* 71: 4892-4903.
15. Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B.K. Felber y G.N. Pavlakis. 1992. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J. Virol.* 66: 7176-7182.
16. Schwartz S., B.K. Felber y G.N. Pavlakis. 1992. Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein. *J. Virol.* 66: 150-159.
17. Donnelly, J.J., J.B. Ulmer, J.W. Shiver y M.A. Liu. 1997. DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648.

18. Ulmer, J.B., R.R. Deck, C.M. Dewitt, J.I. Donnelly y M.A. Liu. 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology*. 89: 59-67.
- 5 19. Qui, J-T., B. Liv, C. Tian, G.N. Pavlakis y X.F. Yu. Enhancement of primary and secondary cellular immune responses against human immunodeficiency virus type 1 Gag by using DNA expression vectors that target Gag antigen to the secretory pathway. *J. Virol.* 74:5997-6005.
- 10 20. Lu, S., J.C. Santoro, D.H. Fuller, J.R. Haynes y H.L. Robinson. 1995. Use of DNAs expressing HIV-1 Env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody responses in mice. *Virology* 209: 147-154.
- 15 21. Chapman, B.S., R.M. Thayer, K.A. Vincent y N.L. Haigwood. 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19: 3979-3986.
- 20 22. Li, Z., A. Howard, C. Kelley, G. Delogu, F. Collins y S. Morris. 1999. Immunogenicity of DNA vaccines expressing tuberculosis proteins fused to tissue plasminogen activator signal sequences. *Infect. Immun.* 67: 4780-4786.
- 25 23. Lewis, P.J., S. van Drunen Little-van den Hurk y L.A. Babiuk. 1999. Altering the cellular location of an antigen expressed by a DNA-based vaccine modulates the immune response. *J. Virol.* 73: 10214-10223.
24. Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Felgner, V.J. Dwarki, S.H. Gromkowski, R.R. Deck, C.M. DeWitt, A. Friedman, *et al.* 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-1749.
- 30 25. Schneider, J., S.C. Gilbert, T.J. Blanchard, T. Hanke, K.J. Robson, C.M. Hannan, M. Becker, R. Sinden, G.L. Smith y A.V. Hill. 1998. Enhanced immunogenicity for CD8+ T cell induction and complete protective efficacy of malaria DNA vaccination by boosting with modified vaccinia virus Ankara. *Nat. Med.* 4: 397-402.
- 35 26. Sedegah, M., T.R. Jones, M. Kaur, R. Hedstrom, P. Hobart, J.A. Tine y S.L. Hoffman. 1998. Boosting with recombinant vaccinia increases immunogenicity and protective efficacy of malaria DNA vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7648-7653.
- 40 27. Hanke, R., R.V. Samuel, T.J. Blanchard, V.C. Neumann, T.M. Allen, J.E. Boyson, S.A. Sharpe, N. Cook, G.L. Smith, D.I. Watkins, M.P. Cranage y A.J. McMichael. 1999. Effective induction of simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes in macaques by using a multiepitope gene and DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost vaccination regimen. *J. Virol.* 73: 7524-7532.
- 45 28. Robinson, H.L., D.C. Montefiori, R.P. Johnson, K.H. Manson, M.L. Kalish, J.D. Lifson, T.A. Rizvi, S. Lu, S.L. Hu, G.P. Mazzara, D.L. Panicali, J.G. Herndon, R. Glickman, M.A. Candido, S.L. Lydy, M.S. Wyand y H.M. McClure. 1999. Neutralizing antibody-independent containment of immunodeficiency virus challenges by DNA priming and recombinant pox virus booster immunizations. *Nat. Med.* 5: 526-534.
- 50 29. Bianchi, A., Massaia M. Idiomatic vaccination in B-cell malignancies. *Mol. Med. Today.* 1997. 3: 435-441
30. Chen TT, Tao MH, Levy R. Idiotype-cytokine fusion proteins as cancer vaccines. Relative efficacy of IL-2, IL-4, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.* 1994. 153: 4775-4787.
- 55 31. Kwak LW, Young HA, Pennington RW, Week, SD. Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. 93: 10972-10977.
32. Biragyn A., Tani K, Grimm, MC, Weeks, SD, Kwak LW. Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat. Biotechnol.* 1999. 17: 253-258.
- 60 33. Kwak, LW, Campbell, MJ, Czerwinski, DK, Hart, S, Miller RA, Levy R. Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N. Engl. J. Med.* 1992. 327: 1209-1215.
34. Biragyn A, Kwak LW. B-cell malignancies as a model for cancer vaccines: from prototype protein to next generation genetic chemokine fusions. *Immunol. Rev.* 1999. Aug; 170: 115-126.
- 65 35. Tobery, T. y R.F. Siliciano. Cutting Edge: induction of enhanced CTL-dependent protective immunity in vivo by N-end rule targeting of a model tumor antigen. *J. Immunol.* 1999. 162: 639-642.

36. Tobery, T.W. y R.F. Siliciano. Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization. 1997. *J. Exp. Med.* 185: 909-920.
- 5 37. Goth, S., V. Nguyen y N. Shastri. 1996. Geneartion of naturally procesed peptide/MHC class I complexes is independent of the stability of endogenously synthesized precursors. *J. Immunol.* 157: 1894.
38. Mineev, B.R., B.J. McFarland, P.J. Spiess, S.A. Rosenberg y N.P. Restifo. 1994. Insertion signal sequence fused to minimal peptides elicits specific CD8+ T-cell responses and prolongs survival of thymoma-bearing mice. *Cancer Res.* 54: 4155.
- 10 39. Rogers, W.O., K. Gowda y S.L. Hoffman. 1999. Construction and immunogenicity of DNA vaccine encoding four *Plasmodium vivax* candidate vaccine antigens. *Vaccine* 17: 3136-3144.
- 15 Patente de Estados Unidos N° 5.972.596 expedida el 26 de octubre de 1999 (Pavlakis y Felber)
- Patente de Estados Unidos N° 5.965.726 expedida el 12 de octubre de 1999 (Pavlakis y Felber)
- 20 Patente de Estados Unidos N° 5.891.432 expedida el 6 de abril de 1999 (Hoo).
- Patente de Estados Unidos N° 6.100.387 expedida el 8 de agosto de 2000 (Hermann y Swanberg)
- Documento WO 98/17816 Lentiviral Vectors (Kingsman & Kingsman) (Oxford Biomedica Ltd)
- 25 Documento WO 98/34640 (Shiver, J.W., Davies, M-E M., Freed, D.C., Liu, M.A. y Perry, H.C. - Merck & Co., Inc.)
- Documento WO 98/46083 Use of Lentiviral Vectors for Antigen Presentation in Dendritic Cells (Wong-Staal, Li; Kan-Mitchell) (Univ. of Cal.)
- 30 Documento WO 99/04026 Lentiviral Vectors (Chen, Gasmi, Yee y Jolly) (Chiron)
- Documento WO 99/15641 Non-Primate Lentiviral Vectors and Packaging Systems (Poeschla, Looney y Wong-Staal) (Univ. of Cal.)
- 35 Documento WO 99/30742 Therapeutic Use of Lentiviral Vectors (Naldini y Song)
- Documento WO 99/51754 Infectious Pseudotyped Lentiviral Vectors Lacking Matrix Protein and Uses Thereof (Goettlinger, Reil y Bukovsky) (Dana Farber Cancer Inst Inc)
- 40 PCT/US99/11082 Post-Transcriptional Regulatory Elements and Uses Thereof (Pavlakis y Nappi), presentada el 22 de mayo de 1999
- 45 Akkina, R.K., Walton, R.W., Chen, M.L., Li, Q-X, Planelles, V y Chen, I.S.Y., "High-efficiency gene transfer into CD34+ cells with a human immunodeficiency virus type 1-based retroviral vector pseudotyped with vesicular stomatitis virus envelope glycoprotein G", *J. Virol.* 70: 2581-2585 (1996)
- Amado, R.G. & Chen, I.S.Y., "Letiviral vectors-the promise of gene therapy within reach", *Science* 285: 674-676 (July 1999)
- 50 Donahue, R.E., An, D.S., Wersto, R.P., Agricola, B.A., Metzger, M.E. y Chen, I.S.Y., "Transplantation of immunoselected CD34+ cells transduced with a EGFP-expressing lentiviral vector in non-human primates", *Blood* 92(suppl. 1): 383b, Abstract N° 4648.5 (1998)
- 55 Fox, J.L., "Researchers wary of fear-based ban on lentivirus gene therapy", *Nature Biotechnology* 16: 407-408 (1998)
- 60 Goldman, M.J., Lee, P.S., Yang, J.S. & Wilson, J.M., "Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis", *Hum Gene Ther.* 8, 2261-2268 (1997)
- Hartikka J, Sawdey M, CorNefert-Jensen F, Margalith M, Barnhart K, Nolasco M, Vahlsing HL, Meek J, Marquet M, Hobart P, Norman J y Manthorpe M., "An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle", *Hum Gene Ther.* 7: 1205-17 (1996)
- 65 Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D.A., Gage, F.H. & Verma, I.M., "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors", *Nat Genet.* 17, 314-317 (1997)

- Kafri, T., van Praag, H., Ouyang, L., Gage, F.G. y Verma, I.M., "A packaging cell line for lentivirus vectors", *J Virol.* 73: 576-584 (1999)
- 5 Kim, V.N., Mitrophanous, K., Kingsman, S.M. y Kingsman, A.J., "Minimal Requirement for a Lentivirus Vector Based on Human Immunodeficiency Virus Type 1", *J. Virol.* 72: 811-816 (1998)
- Klimatcheva, E., Rosenblatt, J.D. y Planelles, V., "Lentiviral vectors and gene therapy", *Frontiers in Bioscience* 4: d481-496 (June 1999)
- 10 Miyoshi, H., Takahashi, M., Gage, F.H. & Verma, I.M., "Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector", *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 10319-10323 (1997)
- Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F.H. y Verma, I.M., "Development of self-inactivating lentivirus vector," *J Virol.* 72: 8150-8157 (1998)
- 15 Miyoshi, H., Smith, K.A., Mosier, D.E., Verma, I.M. y Torbett, B.E., "Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors", *Science* 283: 682-686 (1999)
- 20 Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M. & Trono, D., "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector", *Science.* 272, 263-267 (1996)
- Naviaux, R.K, Costanzi, E., Haas, M. y Verma, I., "The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses", *J. Virol.* 70: 5701-5705 (1996)
- 25 Pavlakis, G.N., Schneider, R.; Song, S., Nasioulas, G., Zolotukhin, A., Felber, B.K., Trauger, R., Cox, J. y Manthorpe, M., "Use of simple Rev-independent HIV-1 gag expression vectors in gene therapy and gene vaccine applications", *Natl Conf Hum Retroviruses Relat Infect (2^a), 29 de Ene-2 Feb (1995); 91.*
- 30 Poeschla, E.M., Wong-Staal, F. & Looney, D.J., "Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors", *Nature Med* 4: 354-357 (1998)
- Qiu, J. T., R. Song, M. Dettenhofer, C. Tian, T. August, B. K. Felber, G. N. Pavlakis y X. F. Yu, "Evaluation of novel human immunodeficiency virus type 1 Gag DNA vaccines for protein expression in mammalian cells and induction of immune responses", *J Virol.* 73: 9145-52 (Nov. 1999)
- 35 Reynolds, P.N. y Curiel, D.T., "Viral vectors show promise in Colorado", *Nature Biotechnology* 16: 422-423 (1998)
- Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K. y Pavlakis, G.N., "Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation", *J. Virol.* 71: 4892-4903 (1997)
- 40 Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B. K. Felber y G. N. Pavlakis, "Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type-1 results in Rev-independent gag expression", *J. Virol.* 66: 7176-7182 (1992)
- 45 Shiver, J.W., Yasutomi, Y., Free, D.C., Davies, M.-E., Perry, H.C., Pavlakis, G.N., Letvin, N.L. y Liu, M.A., "DNA Vaccine-Mediated Cellular Immunity Against HIV-1 gag and env", presentada en la Conferencia sobre Avances y Desarrollo de Vacuna del Sida: 8º Encuentro Anual de los Grupos de Desarrollo de Vacuna para el SIDA Cooperativos Nacionales (NCVDG) del 11-15 de febrero de 1996.
- 50 Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ransdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M. y Kingsman, A.J., "A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors", *Nuc. Acids Res.* 23: 628-633 (1995).
- 55 Srinivasakumar, N., Chazal, N., Helga-Maria, C., Prasad, S., Hammarskjöld, M.-L. y Rekosh, D., "The Effect of Viral Regulatory Protein Expression on Gene Delivery by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vectors Produced in Stable Packaging Cell Lines", *J. Virol.*, 71: 5841-5848 (1997)
- 60 Sutton, R.E., Wu, H.T., Rigg, R., Bohnlein, E. & Brown, P.O., "Human immunodeficiency virus type 1 vectors efficiently transduce human hematopoietic stem cells", *J Virol.* 72, 5781-5788 (1998)
- 65 Tabemero, C., A. S. Zolotukhin, J. Bear, R. Schneider, G. Karsenty y B. K. Felber, "Identification of an RNA sequence within an intracisternal-A particle element able to replace Rev-mediated posttranscriptional regulation of human immunodeficiency virus type 1," *J Virol.* 71:95-101 (1997).. (véase también mi mensaje de correo electrónico)

Takahashi, M.; Miyoshi, H.; Verma, I.M.; Gage, F.H., "Rescue from photoreceptor degeneration in the rd mouse by human immunodeficiency virus vector-mediated gene transfer" *J. Virol.* 73: 7812-7816 (Sept. 1999)

5 Uchida, N., Sutton, R.E., Frieria, A.M., He, D., Reitsma, M.J., Chang, W.C., Veres, G., Scollay, R. & Weissman, I.L., "HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated G0/G1 human hematopoietic stem cells", *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 95, 11939-11944 (1998)

10 Valentin, A., W. Lu, M. Rosati, R. Schneider, J. Albert, A. Karlsson and G. N. Pavlakis. "Dual effect of interleukin 4 on HIV-1 expression: Implications for viral phenotypic switch and disease progression," *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 95: 8886-91 (1998)

15 White, S.M., Renda, M, Nam, N-Y, Klimatcheva, E., Hu, Y, Fisk, J, Halterman, M, Rimel, B.J., Federoff, H, Pandya, S., Rosenblatt, J.D. y Planelles, V, "Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements", *J. Virol.* 73: 2832-2840 (Abr 1999)

Wolff, J.A. y Trubetskoy, V.S., "The Cambrian period of nonviral gene delivery", *Nature Biotechnology* 16: 421-422 (1998)

20 Zolotukhin, J., Valentin, A., Pavlakis, G. N. y Felber, B. K. "Continuous propagation of RRE(-)and Rev(-)RRE(-) human immunodeficiency virus type 1 molecular clones containing a cis-acting element of Simian retrovirus type 1 in human peripheral blood lymphocytes", *J Virol.* 68: 7944-7952 (1994)

25 Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L. y Trono, D., "Multiply Attenuated Lentiviral Vector Achieves Efficient Gene-Delivery In Vivo", *Nature Biotechnology* 15: 871-875 (1997)

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L. & Trono, D., "Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery" *J Virol.* 72: 9873-9880 (1998)

30 Los expertos en la materia reconocerán que cualquier gen que codifique un ARNm que contenga una secuencia o secuencias de inestabilidad/inhibidoras puede modificarse de acuerdo con los métodos ejemplificados o sus equivalentes funcionales.

35 Se pretende que las modificaciones de los modos anteriormente descritos para llevar a cabo la invención que sean obvios para los expertos en los campos de ingeniería genética, virología, inmunología, medicina y campos relacionados estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende uno o más vectores que expresan:
 - 5 (i) una construcción de ácido nucleico que contiene secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos desestabilizante que dirige la proteína a la ruta de degradación de proteasoma-ubiquitina unida covalentemente a un antígeno, en la que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizadora, y
 - 10 (ii) una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión secretada que comprende una secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3 unida covalentemente al antígeno, en la que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3.
2. Una composición de la reivindicación 1, en la que la secuencia de aminoácidos desestabilizadora de (i) está presente en una secuencia de aminoácidos que se selecciona entre el grupo que consiste en c-Myc aa2-120; Ciclina A aa13-91; Ciclina B 10-95; Ciclina B aa13-91; IkBa aa20-45; β -Catenina aa19-44; c-Jun aa1-67 y c-Mos aa1-35.
3. Una composición de la reivindicación 1, en la que la secuencia desestabilizadora se selecciona entre el grupo que consiste en c-Mos aa1-35; ciclina B aa 10-95; β -catenina 19-44 y β -catenina 18-47.
- 20 4. Una composición de la reivindicación 1, en la que la secuencia desestabilizadora se selecciona entre β -catenina 19-44 y β -catenina 18-47.
5. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3 es los aminoácidos de MCP-3 33-109 ó 1-109.
- 25 6. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el antígeno es un antígeno asociado a enfermedad.
7. Una composición de la reivindicación 6, en la que el antígeno asociado a enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en antígeno asociado a tumor, antígeno asociado a enfermedad autoinmune, antígeno asociado a enfermedad infecciosa, antígeno viral, antígeno parasitario y antígeno bacteriano.
- 30 8. Una composición de la reivindicación 7, en la que el antígeno viral es un antígeno de VIH.
- 35 9. Una composición de la reivindicación 8, en la que dicho antígeno de VIH se selecciona entre el grupo que consiste en Gag, Env, Pol, Nef, Vpr, Vpu, Vif, Tat y Rev.
10. Una composición de la reivindicación 6, en la que el antígeno asociado a enfermedad comprende fragmentos antigénicos de Gag-Pol-Tat-Rev-Nef o Tat-Rev-Env-Nef de VIH unidos entre sí, no necesariamente en ese orden.
- 40 11. Una composición de la reivindicación 1, en la que la construcción de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión secretada se selecciona entre el grupo que consiste en (a) una construcción que comprende una secuencia que codifica p37 gag de VIH, una secuencia de quimiocina MCP-3 y una secuencia de IP10 y (b) una construcción que comprende una secuencia que codifica p39 gag de VIS, una secuencia de quimiocina MCP-3 y una secuencia líder de IP10.
- 45 12. Una composición de la reivindicación 1 que comprende:
 - 50 (i) uno o más vectores que codifican Gag de tipo silvestre, Gag unido a los aminoácidos 33-19 de MCP-3 unidos a péptido secretor IP-10 MNPSAAVIFCLILLGLSGTQ y Gag unido a los aminoácidos 18-47 de β -catenina; o
 - (ii) uno o más vectores que codifican Env de tipo silvestre, Env unida a los aminoácidos 33-109 de MCP-3 unidos a péptido secretor IP-10 MNPSAAVIFCLILLGLSGTQ y Env unido a los aminoácidos 18-47 de β -catenina.
- 55 13. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el uno o más vectores están contenidos en partículas virales.
14. Una composición farmacéutica que comprende uno o más vectores como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 15. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14 para su uso en la inducción de anticuerpos en un mamífero en la que dichas construcciones de ácido nucleico están presentes en dicha composición en una cantidad que es eficaz para inducir dichos anticuerpos en dicho mamífero.
- 65

16. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14 para su uso en la inducción de linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en un mamífero en el que dichas construcciones de ácido nucleico están presentes en dicha composición en una cantidad que es eficaz para inducir linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en dicho mamífero.
- 5
17. Una composición de vacuna para su uso en inducción de inmunidad en un mamífero contra infección por VIH que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más vectores como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10
18. Una composición farmacéutica que comprende partículas virales como se define en la reivindicación 13.
19. Una composición farmacéutica de la reivindicación 14 ó 18 para su uso en la estimulación de una respuesta inmune contra un antígeno.
- 15
20. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en la vacunación de un mamífero induciendo anticuerpos en el mamífero, en la que dichos vectores están presentes en una cantidad que es eficaz para inducir dichos anticuerpos en dicho mamífero.
- 20
21. Una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para su uso en la vacunación de un mamífero induciendo linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en el mamífero, en la que dichos vectores están presentes en una cantidad que es eficaz para inducir linfocitos T citotóxicos y/o inductores auxiliares en dicho mamífero.
- 25
22. Un kit que comprende uno o más vectores como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
23. Un primer vector para su uso en un método para vacunar a un mamífero induciendo anticuerpos, o linfocitos citotóxicos y/o inductores auxiliares, en el que dicho método comprende adicionalmente administración de un segundo vector,
- 30
- en el que uno de los vectores expresa una construcción de ácido nucleico que contiene secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos desestabilizadora que dirige la proteína a la ruta de degradación de proteasoma-ubiquitina unida covalentemente a un antígeno en el que la inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos desestabilizadora; y el otro vector expresa una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión secretada que comprende una secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3 unida covalentemente al antígeno, en la que la
- 35
- inmunogenicidad del antígeno aumenta por la presencia de la secuencia de aminoácidos de quimiocina MCP-3.
24. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23, en el que en dicho vector que expresa una construcción de ácido nucleico que contiene secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos desestabilizadora, dicha secuencia de aminoácidos desestabilizadora se selecciona entre el grupo que consiste en c-Myc aa2-120; Ciclina A aa13-91; Ciclina B 10-95; Ciclina B aa13-91; IkBa aa20-45; β -Catenina aa19-44; c-Jun aa1-67; y c-Mos aa1-35.
- 40
25. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23 ó 24 en el que dicho vector se administra en el mismo sitio que el segundo vector.
- 45
26. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23 ó 24 en el que dicho vector se administra en un sitio diferente del segundo vector.
- 50
27. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23 ó 24 en el que dicho vector se administra a la vez que el segundo vector.
28. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23 ó 24 en el que dicho vector se administra en un momento diferente del segundo vector.
- 55
29. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23 ó 24 en el que el antígeno es un antígeno de VIH.
30. El primer vector para su uso en el método de la reivindicación 23 ó 24 en el que el antígeno es gag de VIH.

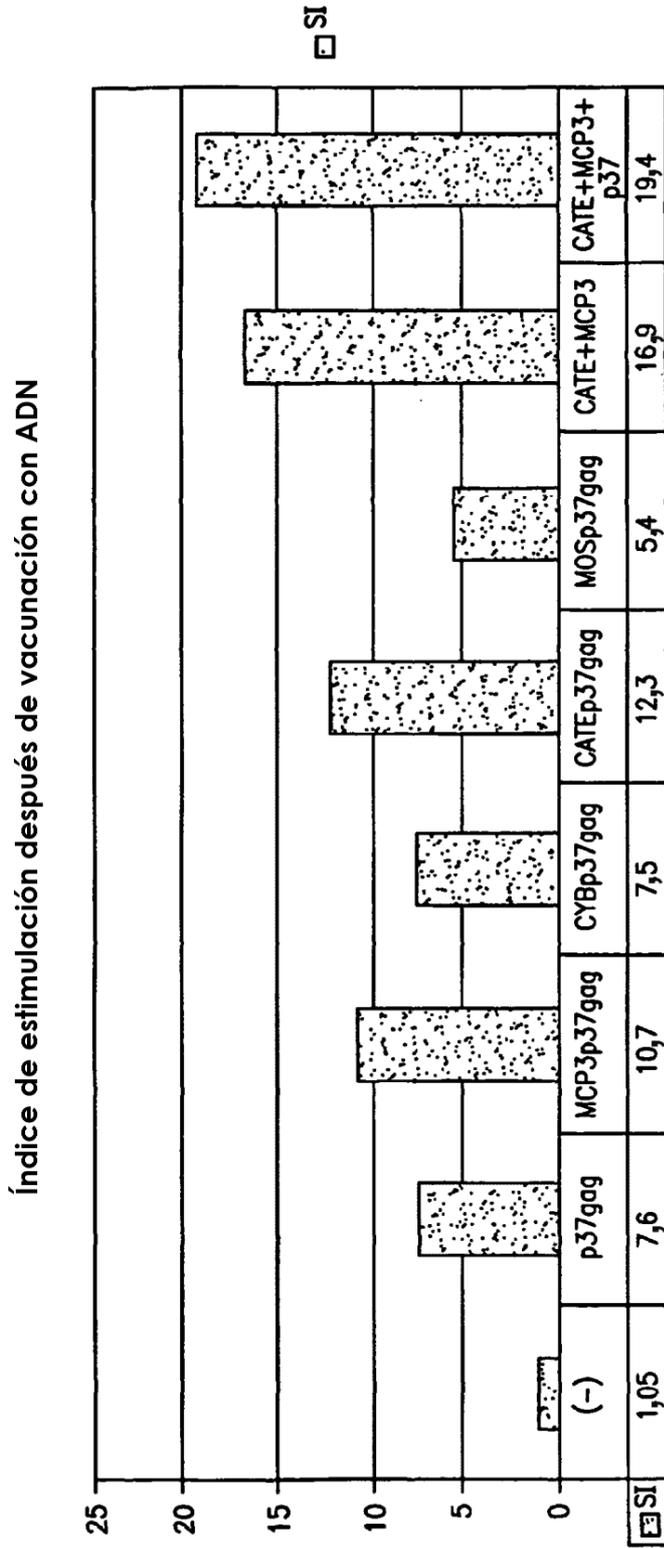


FIG. 1

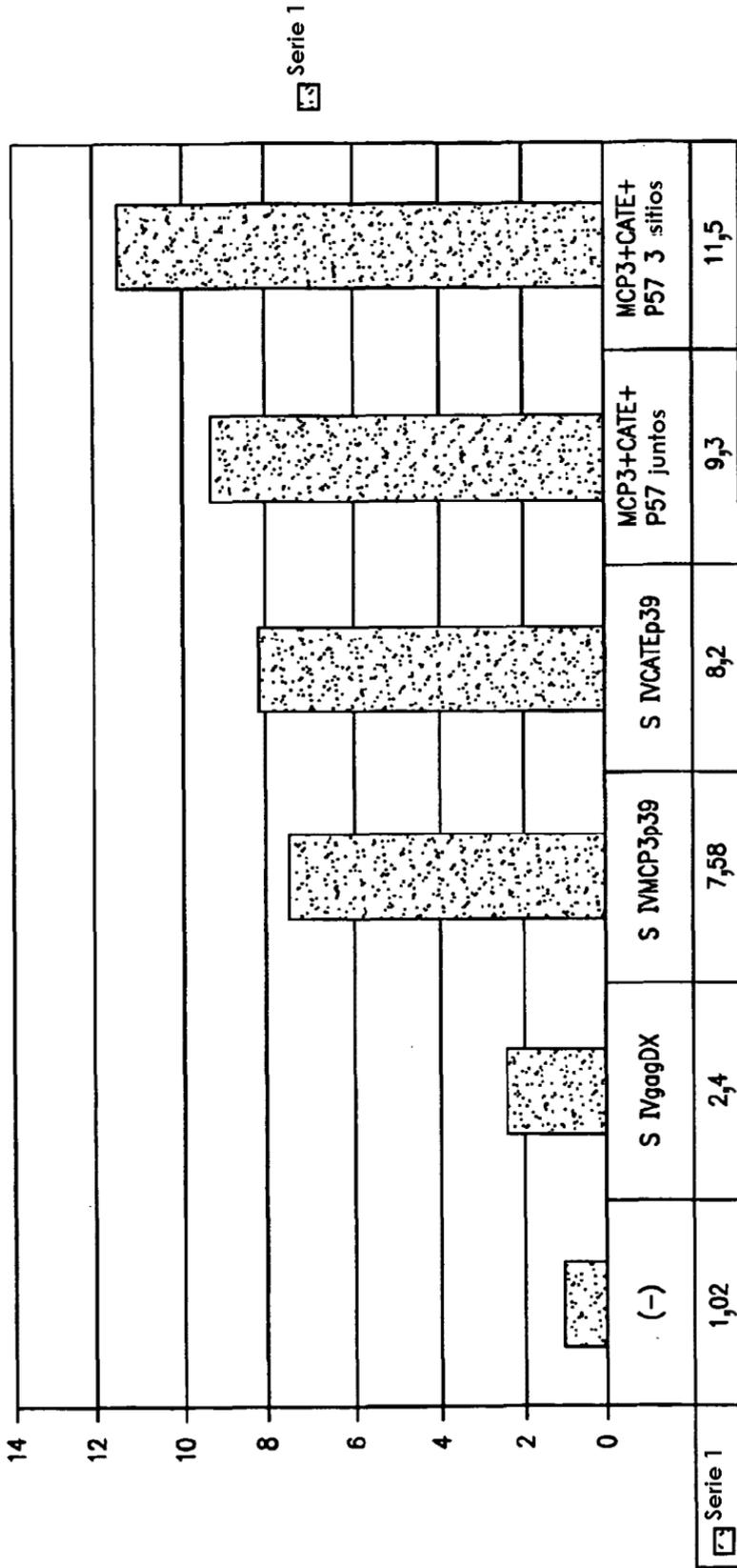


FIG. 2

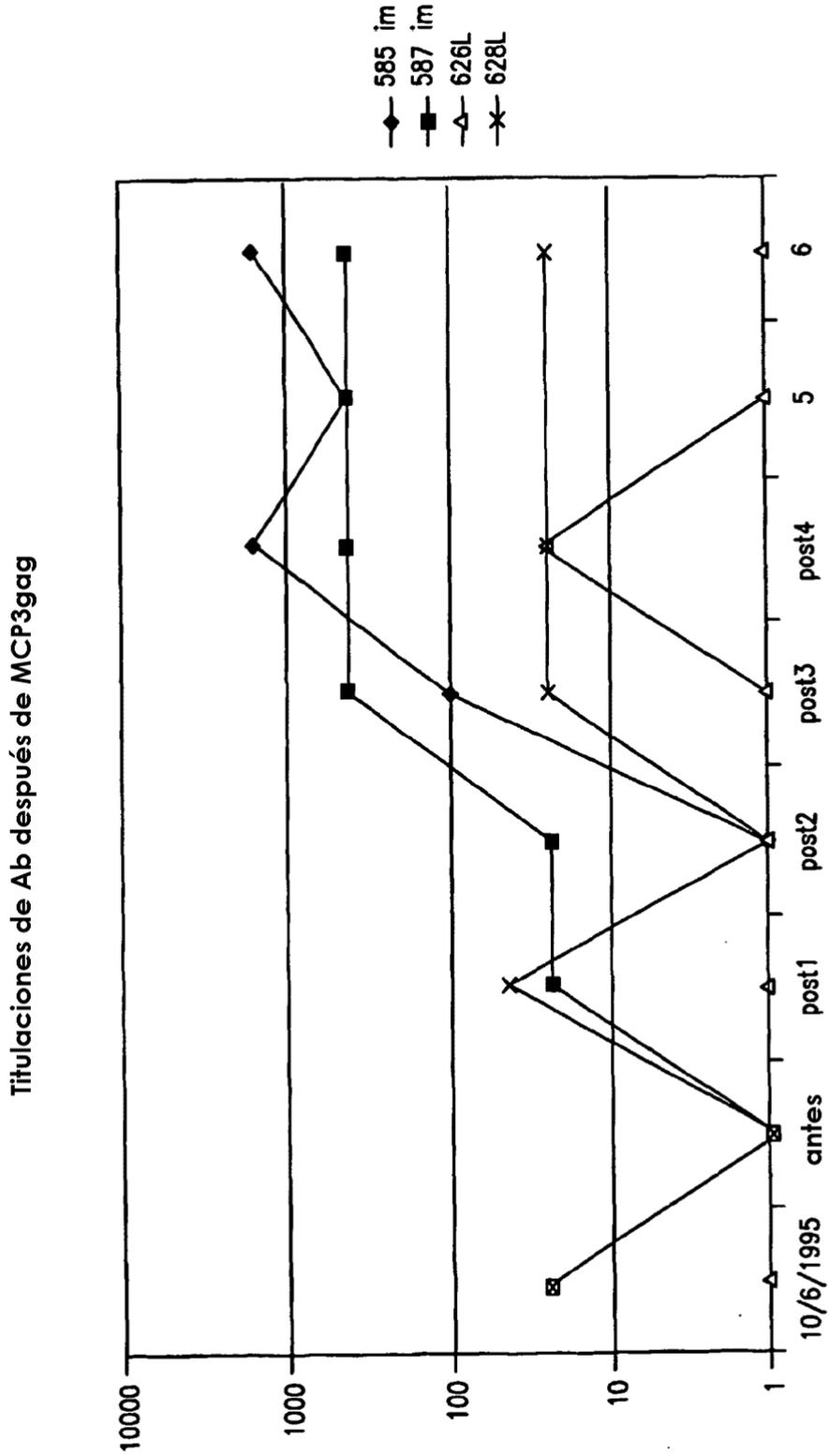


FIG. 3

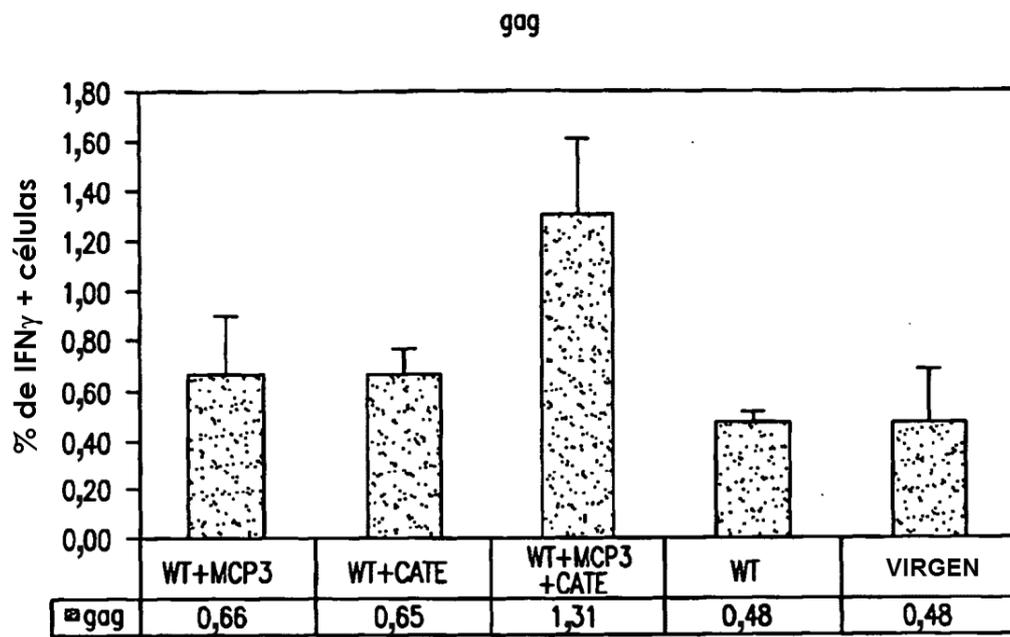


FIG. 4

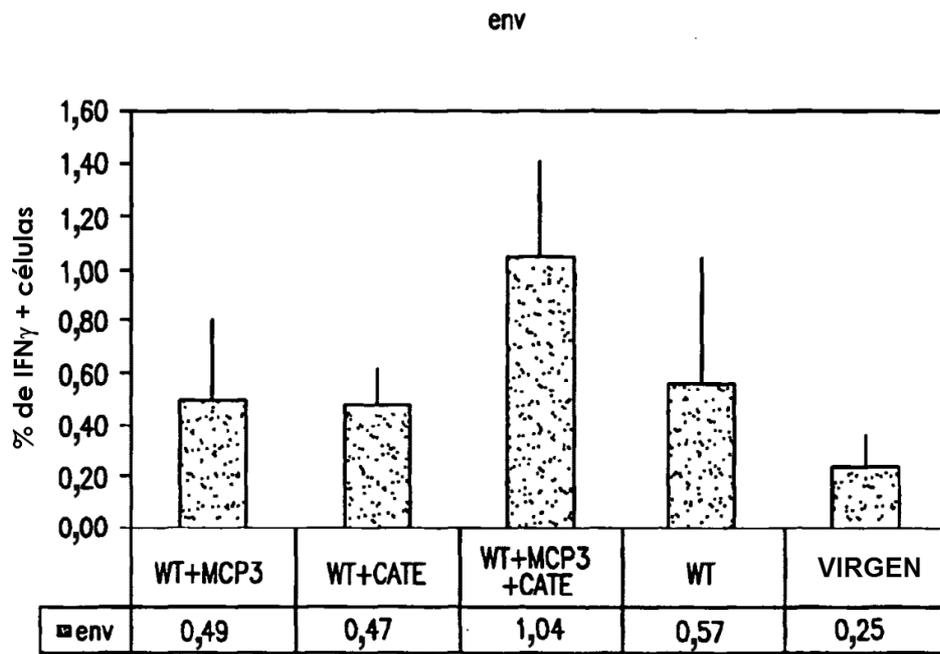


FIG. 5

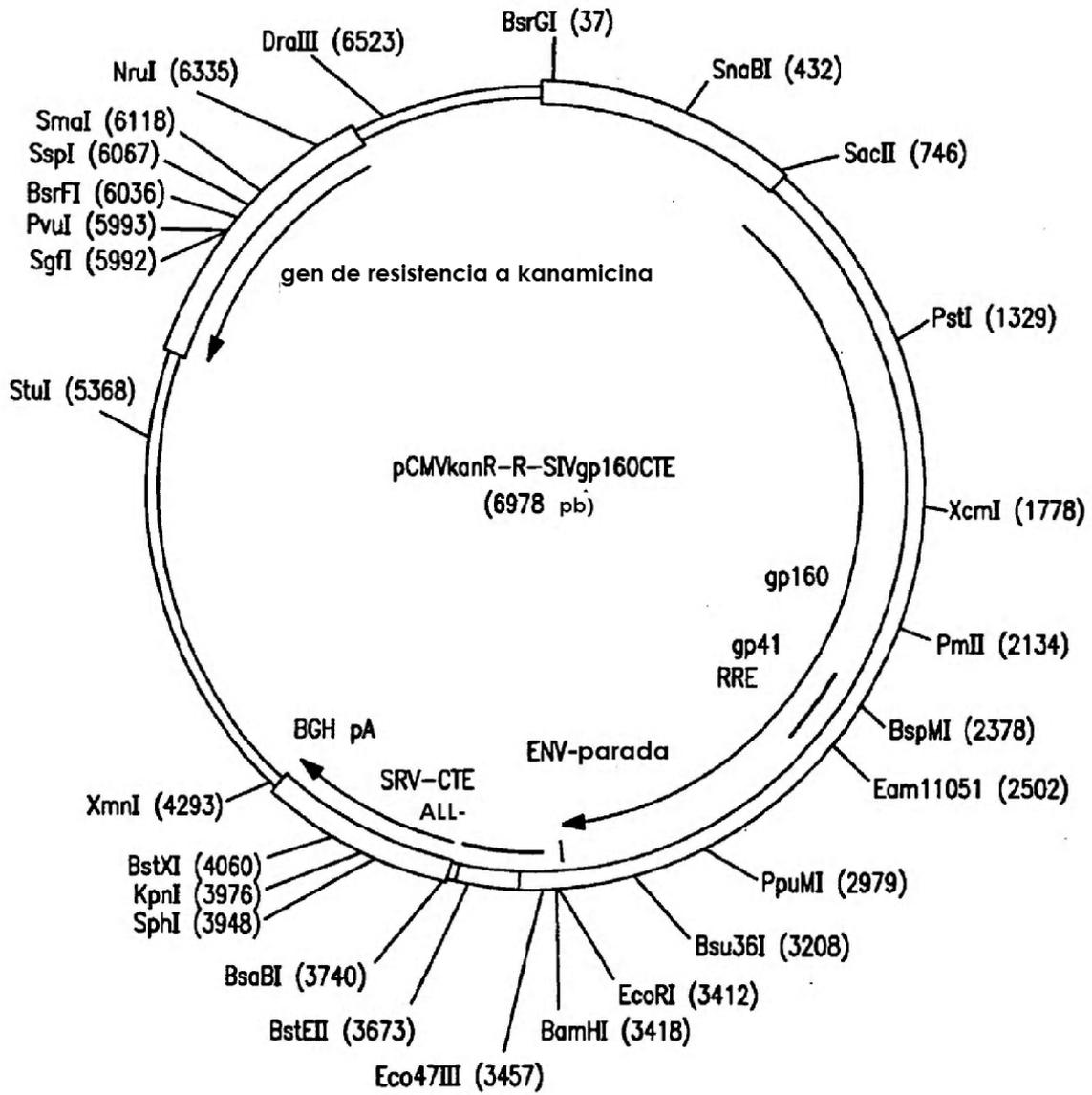


FIG. 6

BsrGI (37)

1 CCTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACGGCCATGTTGA
 81 CATTGATTATTGACTAGTTATAAAGTAAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTAC
 161 ATAACCTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGAGTATGTTCCCA
 241 TAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCACTTGGCAGTACATCAA
 321 GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTAATGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGAC

SnaBI (432)

401 CTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACA
 481 TCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGCGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGG
 561 CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTGTAACTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGTAGCGGTGTAACGGTG
 641 GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTCACCTCCATA

SacII (746)

721 GAAGACACGGGACOGATCCAGCCTCCGGCGGCGCGCTAAGTATGGGATGCTTGGGAATCAGCTGCTTATGCCATCT

1 Met Gl yCysLeu Gl yAsn Gl nLeuLeu Ile Al a Ile L

801 TGCTTTTAAGTGTCATGGGATCTATTGTACTCTATATGTCACAGTCTTTTATGGTGTACCAGCTTGGAGGAATGCGACA

13 euLeuLeuSer Val Tyr Gl y Ile Tyr Cys Thr Leu Tyr Val Thr Val Phe Tyr Gl y Val Pro Al a Trp Arg Asn Al a Thr

881 ATTCOCTCTTTTGTGCAACCAAGAATAGGGATACTTGGGGAACAACCTCAGTGCCTACCAGATAATGGTGATTATTCAGA

40 Ile ProLeuPheCysAl aThr LysAsnArgAspThr Trp Gl yThr Thr Gl nCysLeuProAspAsn Gl y Asp Tyr Ser Gl

961 AGTGGCCCTTAATGTTACAGAAAGCTTTGATGCTGGAATAATACAGTACAGAACAGGCAATAGAGGATGTATGGCAAC

66 uVal Al aLeuAsnVal Thr Gl uSer PheAspAl aTrpAsnAsnThr Val Thr Gl uGl nAl a Ile Gl uAspVal Trp Gl nL

1041 TCTTTGAGACCTCAATAAAGCCTTGTGTAATAATTATCCCATATGCATTACTATGAGATGCAATAAAGTGAGACAGAT

93 euPhe Gl uThr Ser IleLysProCysVal LysLeuSer ProLeuCys IleThrMet ArgCysAsnLysSer Gl uThrAsp

1121 AGATGGGATTGCAAAATCAATAACAACAACAGCATCAACAACATCAACGACAGCATCAGCAAAAGTAGACATGGTCAA

120 ArgTrp Gl yLeuThr LysSer IleThr Thr Thr Al aSer Thr Thr Ser Thr Thr Al aSer Al aLysVal AspMet Val As

1201 TGAGACTAGTCTTGTATAGCCAGGATAATGACAGGCTTGGAAACAAGGCAAAATGATAAGCTGTAATTCACATGA

146 nGl uThr Ser Ser Cys IleAl aGl nAspAsnCysThr Gl yLeu Gl uGl nGl uGl nMet IleSer CysLysPheAsnMet T

PstI (1329)

1281 CAGGGTTAAAAAGACAAAGAAAAGAGTACAATGAAACTTGGTACTCTGCAGATTGGTATGTGAACAAGGGAATAAC

173 hr Gl yLeuLysArgAspLysLysLys Gl uTyrAsn Gl uThr TrpTyrSer Al aAspLeuVal Cys Gl uGl nGl yAsnAsn

1361 ACTGGTAATGAAAGTAGAATGTTACATGAACCACTGTAACACTTCTGTTATCCAAGAGTCTTGTGACAAACATTATTGGGA

200 Thr Gl yAsn Gl uSer ArgCysTyrMetAsnHisCysAsnThr Ser Val IleGl nGl uSer CysAspLysHisTyrTrpAs

1441 TGCTATTAGATTAGGTAATTGTGCACCTCCAGGTTATGCTTTGCTTAGATGTAATGACACAAATATTACAGGCTTTATGC

226 pAl aIleArgPheArgTyrCysAl aProPro Gl yTyrAl aLeuLeuArgCysAsnAspThrAsnTyrSer Gl yPheMet P

1521 CTAATGTTCTAAGGTGGTGGTCTCTTCATGCACAAGGATGATGGAGACACAGACTTCTACTTGGTTTGGCTTTAATGGA

253 r oLysCysSer LysVal Val Val Ser Ser CysThr ArgMetMet Gl uThr Gl nThr Ser Thr TrpPhe Gl yPheAsn Gl y

1601 ACTAGACGAAAATAGAACTTATATTTACTGGCATGGTAGGGATAATAGGACTATAAATTAGTTTAAATAGTATTATAA

280 Thr ArgAl a Gl uAsnArgThr Tyr IleTyrTrpHis Gl yArgAspAsnArgThr IleIleSer LeuAsnLysTyrTyrAs

1681 TCTAACAATGAAATGTAGAAGACCAGGAAATAAGACAGTTTTACCAGTCACCATTATGCTGGATTGGTTTTCCACTCAC

306 nLeuThrMet LysCysArgArgPro Gl yAsnLysThr Val LeuProVal Thr IleMetSer Gl yLeuVal PheHisSer G

XcmI (1778)

1761 AACCAATCAATGATAGGCCAAGCAGGCATGGTGTGGTTTGGAGGAAAATGGAAGGATGCAATAAAGAGGTGAGGCAG

333 InProIleAsnAspArgProLys Gl nAl aTrpCysTrpPhe Gl yGl yLysTrpLysAspAl aIleLys Gl uVal Lys Gl n

1841 ACCATTGTCAAACATCCAGGTACTGGAACTAACAATACTGATAAAATCAATTTGACGGCTCCTGGAGGAGGATOC

360 Thr IleVal LysHisProArgTyrThr Gl yThrAsnAsnThrAspLys IleAsnLeuThr Al aPro Gl yGl yAspPr

1921 GGAAGTTACCTCATGTGGACAAATGACAGGAGAGTTCCTCTACTGTAAAAATGAATGGTTTCTAAATGGGTAGAA

386 o Gl uVal Thr PheMet TrpThrAsnCysArg Gl y Gl uPheLeuTyrCysLysMetAsnTrpPheLeuAsnTrpVal Gl uA

2001 ATAGGAATACAGCTAACCGAAGCCAAAGGACAGCATAAAGGAATTAAGTGGCATGTCAATTAACAAATAATCAAC

413 spArgAsnThr Al aAsn Gl nLysProLys Gl uGl nHisLysArgAsnTyrVal ProCysHis IleArg Gl nIleIleAsn

FIG. 7-1

(2134)

2081 ACTTGGCATAAAGTAGGCCAAAATGTTTATTGCTOCCAAGAGAGGGAGACCTCADGTGTAACCTCCACAGTGACCAGTCT

440 Thr TrpHisLysValGlyLysAsnValTyrLeuProProArgGluGlyAspLeuThrCysAsnSerThrValThrSerLeu
 2161 CATAGCAAACATAGATTGGATTGATGGAAACCAAACTAATATCACCATGAGTGCAGAGGTGGCAGAACTGTATCGATTGG

466 u l l e A l a A s n l l e A s p T r p l l e A s p G l y A s n G l n T h r A s n l l e T h r M e t S e r A l a G l u V a l A l a G l u L e u T y r A r g L e u G
 2241 AATTGGGAGATTATAAATTAGTAGAGATCACTCCAATTGGCTTGGCCCCACAGATGTGAGAGGTACACTACTGGTGGC

493 l u L e u G l y A s p T y r L y s L e u V a l G l u l l e T h r P r o l l e G l y L e u A l a P r o T h r A s p V a l L y s A r g T y r T h r T h r G l y G l y
 BspMI (2378)

2321 ACCTCAAGAAATAAAGAGGGGCTCTTGTGCTAGGGTCTTGGGTTTCTCGCAACGGCAGGTTCTGCAATGGGAGCCGC

520 Thr Ser ArgAsnLysArgGlyValPheValLeuGlyPheLeuAlaThrAlaGlySerAlaMetGlyAlaAla
 2401 CAGCCTGACCCTCACGGCACAGTCCCGAACTTATTGGCTGGGATAGTCCAACAGCAGCAACAGCTGTTGGACGTGTCTA

546 a S e r L e u T h r L e u T h r A l a G l n S e r A r g T h r L e u L e u A l a G l y l l e V a l G l n G l n G l n G l n L e u L e u A s p V a l V a l L
 Eam1105I (2502)

2481 AGAGACAACAAGAATTGTTGGGACTGACCGTCTGGGGAACAAGAACCTCCAGACTAGGGTCACTGCCATCGAGAAGTAC

573 y s A r g G l n G l n G l u L e u L e u A r g L e u T h r V a l T r p G l y T h r L y s A s n L e u G l n T h r A r g V a l T h r A l a l l e G l u L y s T y r
 2561 TTAAAGGACCAGGCGCAGCTGAATGCTTGGGGATGTGCGTTTACACAAGTCTGCCACTACTGTAOCATGGCCAAATGC

600 LeuLysAspGlnAlaGlnLeuAsnAlaTrpGlyCysAlaPheArgGlnValCysHisThrThrValProTrpProAsnAla
 2641 AAGTCTAACACCAAGTGAACAATGAGACTTGGCAAGAGTGGGAGCGAAGGTTGACTTCTTGAAGAAAATAACACG

626 a S e r L e u T h r P r o L y s T r p A s n A s n G l u T h r T r p G l n G l u T r p G l u A r g L y s V a l A s p P h e L e u G l u G l u A s n l l e T h r A
 2721 CCTCCTAGAGGAGGCACAAATTCACAAGAGAAGAACATGTATGAATTACAAAAGTTGAATAGCTGGGATGTGTTGGC

653 l a L e u L e u G l u G l u A l a G l n l l e G l n G l n G l u L y s A s n M e t T y r G l u L e u G l n L y s L e u A s n S e r T r p A s p V a l P h e G l y
 2801 AATTGGITTGACCTTGCTTCTTGGATAAAGTATATACAATATGGAGTTTATATAGTTGTTAGGAGTAACTGTTAAGAAT

680 AsnTrpPheAspLeuAlaSerTrpIleLysTyrIleGlnTyrGlyValTyrIleValValGlyValIleLeuLeuArgIle
 2881 AGTGATCTATA TAGTACAAATGCTAGCTAAGTTAAGGCAGGGTATAGCCAGTGTCTCTTCCOCCOCCCTCTTATTTC

706 e V a l l e T y r l l e V a l G l n M e t L e u A l a L y s L e u A r g G l n G l y T y r A r g P r o V a l P h e S e r S e r P r o P r o S e r T y r P h e G
 PpuMI (2979)

2961 AGCAGAACCATATCCAACAGGACCCGGCACTGCCAACCCAGAGAAGGCAAAGAAAGAGACCGTGGAGAAGCCGGTGGCAAC

733 l n G l n T h r H i s l l e G l n G l n A s p P r o A l a L e u P r o T h r A r g G l u G l y L y s G l u A r g A s p G l y G l y G l u G l y G l y A s n
 3041 AGCTCCTGGCCTGGCAGATAGAAATATATCCACTTCTTATTGTCAGCTTATTAGACTCTTGACTTGGCTATTTCAGTAA

760 SerSerTrpProTrpGlnIleGluTyrIleHisPheLeuIleArgGlnLeuIleArgLeuLeuThrTrpLeuPheSerAsn
 3121 CTGTAGGACTTTGCTATCGAGAGTATACCAGATCCOCCAACAATACTOCAGAGGCTCTCTGGACCCTACAGAGGATTC

786 n C y s A r g T h r L e u L e u S e r A r g V a l T y r G l n l l e L e u G l n P r o l l e L e u G l n A r g L e u S e r A l a T h r L e u G l n A r g l l e A
 Bsu36I (3208)

3201 GAGAAGTCTCAGGACTGAACCTGACCTACCTACAATATGGGTGGAGCTATTTCCATGAGGGGTTCCAGGCGCTCTGGAGA

813 r g G l u V a l L e u A r g T h r G l u L e u T h r T y r L e u G l n T y r G l y T r p S e r T y r P h e H i s G l u A l a V a l G l n A l a V a l T r p A r g
 3281 TCTGCGACAGAGACTCTTGGGGGGCGTGGGGAGACTTATGGGAGACTCTTAGGAGAGGTGGAAGATGGATACTGCAAT

840 SerAlaThrGluThrLeuAlaGlyAlaTrpGlyAspLeuTrpGluThrLeuArgArgGlyGlyArgTrpIleLeuAlaIle
 BamHI (3418)

EcoRI (3412)

3361 CCCAGGAGGATTAGACAAGGGCTTGAGCTCACTCTCTTGTGAGGGACAGAGAATTCCGATCCactagttctagaCTOGA

866 e P r o A r g A r g l l e A r g G l n G l y L e u G l u L e u T h r L e u L e u . . .
 Eco47III (3457)

3441 GGGGGGGCCGGTACGAGCGCTTAGCTAGCTAGAGACCACTOCCCTGGGAGCTAAGCTGGACAGCCAATGAOCCGTAAG

3521 AGAGTGACATTTTCACTAACCTAAGACAGGAGGGCGCTCAGAGCTACTGCTAATCCAAAGAGCGGTAAAAGTGATAAA

BstEII (3673)

3601 AATGTATCACTCCAACCTAAGACAGGCGCAGCTCCGAGGGATTGTGCTGCTGTTTATAIATATTTAAAAGGGTCACT

FIG. 7-2

BsaBI (3740)

3681 GTCGGAGCGCTGCTGCCOOGATGATGCTTGGTCTAGACTOGAGGGGGGCCOOGTACGATCCAGATCTGCTGTGCCTT

3761 CTAGTTGCCAGCCATCTGTGTGTTGCOOCTCCOOCGTGCTTCTTGACCOCTGGAAGGTGCCACTOCCACTGTCCCTTCC

3841 TAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGCAGCACAGCAA

SphI (3948) KpnI (3976)

3921 GGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGOGGTGGGCTCTATGGGTACCCAGGTGCTGAAGAATTGAC

BstXI (4060)

4001 CCGGTTCCTCTGGGCAGAAAGAAGCAGGCACATCCOCTTCTCTGTGACACACCOCTGTCCACGCCOCTGGTTCCTTAGTT

4081 CCAGCCOACTCATAGGACTCATAGCTCAGGAGGGCTCCGCTTCAAATCCACCCOCTAAAGTACTTGGAGCGGTCTC

4161 TCCCTCCCTCATCAGCCACCAAAACCAACCTAGCCTCCAAGAGTGGGAAGAAATTAAGCAAGATAGGCTATTAAGTGC

XmnI (4293)

4241 AGAGGGAGAGAAAATGCTCCAACATGTGAGGAAGTAATGAGAGAAATCATAGRAATTTCTTCGGCTTCCTCGCTCACTGA

StuI (5368)

4321 CTCGTGGCTGGTGGTGGCTGGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGGGTAATAOGGTTATOCACAGAATCAG

4401 GGGATAACGCAGGAAAGACATGTGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCOCTGTGGCGTTT

4481 TTCCATAGGCTCCGCCOCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGGGAAACCCGACAGGACTATA

4561 AAGATACCAGGCGTTTCCOCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCTGTTCCGACCOCTGCCGCTTACCGGATACTGTCCG

4641 CCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAOCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGGTTCGGCTCC

4721 AAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGCTCAGCCOAGCCGCTGGCCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAAACC

4801 GGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAG

4881 AGTCTTGAAGTGGTGGCTACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGGCTCTGCTGAAGCCAGTTAOC

4961 TTCGAAAAGAGTGTGGTACTCTTGTATCCGGCAACAAACCCOCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAGGACGCA

5041 GATTACGGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTGTATCTTTCTACGGGGTCTGAOCTCAGTGGAAACGAAAACT

5121 CAOCTTAAAGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAOCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTAA

5201 TCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG

5281 TCTATTCGGTTCATCATAGTTCOCTGACTCCGGGGGGGGGGGCGCTGAGGTCTGCTCGTGAAGAAGTGTGTGCTGAC

5361 TCATACCAGGCTGAATGCCOCCATCATCCAGCCAGAAAGTGAGGGAGCCAGGTTGATGAGAGCTTTGTGTAGGTGGA

5441 CCAGTGGTGATTTTGAACCTTTGCTTTGCCACGGAAOCTGTGGTGTGTCGGGAAGATGCGTGTATGATCCTTCAACT

5521 CAGCAAAAGTTCGATTATCAACAAAGCCOCCGTCOCTCAAGTCAGCGTAAATGCTCTGCCAGTGTACAAACCAATTA

5601 CCAATCTGATTAGAAAACTCATOGAGCATCAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTT

PvuI (5993) SgfI (5992)

5921 TOGTCATCAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCACTGATTGGCCCTGAGCGAGAGCAAAATAGCGATCGCT

1684 IuAspAspPheAspSerAlaAspValLeuGlyAsnAsnMetArgSerGlnAlaGlnAlaLeuArgPheValArgAspSer

BsrFI (6036) SspI (6067)

6001 GTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGCCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTACCCTG

1424 AsnPheProCysAsnValProIleSerHisLeuArgArgLeuPheValAlaLeuAlaAspValIleAsnGluGlySe

SmaI (6118)

6081 AATCAGGATATTTCTAATACTGGAATGCTGTTTTCCOGGGATCGCAGTGGTGAATACCATGCATCATCAGGATTA

1154 rAspProTyrGluGluLeuValGlnPheAlaThrLysGlyProIleAlaThrThrLeuLeuTrpAlaAspAspProThrA

6161 CGGATAAAATGCTTGATGGTGGGAAGAGCCATAAATCCGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAAACATCAT

884 rGlyIlePheHisLysIleThrProLeuProMetPheGluThrLeuTrpAsnLeuArgValMetGluAspThrValAspAsn

6241 GGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACTCTGGGCACTGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCCACCTG

624 AlaValSerGlyLysGlyHisLysLeuPheLeuGluProAlaAspProLysGlyTyrLeuArgTyrIleThrAlaGlySe

NruI (6335)

6321 ATTGCCCCGACATTATCGGAGCCOCTTATACCCATATAAATCAGCATOCATGTTGGAATTTAATGCGGGCTCGAGCAA

354 rGlnGlyValAsnAspArgAlaTrpLysTyrGlyTyrLeuAspAlaAspMetAsnSerAsnLeuArgProArgSerCysS

6401 GACGTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACCCOCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTTCATGATGA

84 erThrGluArgGlnIleHisSerMet

DraIII (6523)

6481 TATATTTTATCTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGACACAACGTTGGCTTTCCOCCCCOCCCATTAATTGAAGCA

6561 TTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACA

FIG. 7-3

6641 TTTCCCGAAAAGTGCCACCTGAOGTCTAAGAAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGGGTATCAOGAG
6721 GCCCTTTGGTCTCGGGCGTTTGGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTC
6801 TGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGGGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAACTAT
6881 GGGCATCAGAGCAGATTGTAAGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCG
6961 CATCAGATTGGCTAATGG

FIG. 7-4

1 ATG AAC CCA AGT GCT GCC GTC ATT TTC TGC CTC ATC CTG CTG GGT CTG AGT GGG ACT CAA
 1▶ M N P S A A V I F C L I L L G L S G T Q

61 Ggg atc ctg gaC ATG GCG CAA CCG GTA GGT ATA AAC ACA AGC ACA ACC TGT TGC TAT CGT
 21▶ G I L D M A Q P V G I N T S T T C C Y R

121 TTC ATA AAT AAA AAG ATA CCG AAG CAA CGT CTG GAA AGC TAT CGC CGT ACC ACT TCT AGC
 41▶ F I N K K I P K Q R L E S Y R R T T S S

181 CAC TGT CCG CGT GAA GCT GTT ATA TTC AAA ACG AAA CTG GAT AAG GAG ATC TGC GCC GAC
 61▶ H C P R E A V I F K T K L D K E I C A D

241 CCT ACA CAG AAA TGG GTT CAG GAC TTT ATG AAG CAC CTG GAT AAA AAG ACA CAG ACG CCG
 81▶ P T Q K W V Q D F M K H L D K K T Q T P

301 AAA CTG ATC TGC AGC GCC GAG GAG AAG CTG TGG GTC ACG GTC TAT TAT GGC GTG CCC GTG
 101▶ K L I C S A E E K L W V T V Y Y G V P V

361 TGG AAA GAG GCA ACC ACC ACG CTA TTC TGC GCC TCC GAC GCC AAG GCA CAT CAT GCA GAG
 121▶ W K E A T T T L F C A S D A K A H H A E

421 GCG CAC AAC GTC TGG GCC ACG CAT GCC TGT GTA CCC ACG GAC CCT AAC CCC CAA GAG GTG
 141▶ A H N V W A T H A C V P T D P N P Q E V

481 ATC CTG GAG AAC GTG ACC GAG AAG TAC AAC ATG TGG AAA AAT AAC ATG GTA GAC CAG ATG
 161▶ I L E N V T E K Y N M W K N N M V D Q M

541 CAT GAG GAT ATA ATC AGT CTA TGG GAT CAA AGC CTA AAG CCA TGT GTA AAA CTA ACC CCC
 181▶ H E D I I S L W D Q S L K P C V K L T P

601 CTC TGC GTG ACG CTG AAT TGC ACC AAC GCG ACG TAT ACG AAT AGT GAC AGT AAG AAT AGT
 201▶ L C V T L N C T N A T Y T N S D S K N S

661 ACC AGT AAT AGT AGT TTG GAG GAC AGT GGG AAA GGA GAC ATG AAC TGC TCG TTC GAT GTC
 221▶ T S N S S L E D S G K G D M N C S F D V

721 ACC ACC AGC ATC GAC AAG AAG AAG AAG ACG GAG TAT GCC ATC TTC GAC AAG CTG GAT GTA
 241▶ T T S I D K K K K T E Y A I F D K L D V

781 ATG AAT ATA GGA AAT GGA AGA TAT ACG CTA TTG AAT TGT AAC ACC AGT GTC AIT ACG CAG
 261▶ M N I G N G R Y T L L N C N T S V I T Q

841 GCC TGT CCA AAG ATG TCC TTT GAG CCA ATT CCC ATA CAT TAT TGT ACC CCG GCC GGC TAC
 281▶ A C P K M S F E P I P I H Y C T P A G Y

FIG. 8-I

ES 2 386 884 T3

901 GCG ATC CTG AAG TGC AAC GAC AAT AAG TTC AAT GGA ACG GGA CCA TGT ACG AAT GTC AGC
301▶ A I L K C N D N K F N G T G P C T N V S

961 ACG ATA CAA TGT ACG CAT GGA ATT AAG CCA GTA GTG TCG ACG CAA CTG CTG CTG AAC GGC
321▶ T I Q C T H G I K P V V S T Q L L L N G

1021 AGC CTG GCC GAG GGA GGA GAG GTA ATA ATT CGG TCG GAG AAC CTC ACC GAC AAC GCC AAG
341▶ S L A E G G E V I I R S E N L T D N A K

1081 ACC ATA ATA GTA CAG CTC AAG GAA CCC GTG GAG ATC AAC TGT ACG AGA CCC AAC AAC AAC
361▶ T I I V Q L K E P V E I N C T R P N N N

1141 ACC CGA AAG AGC ATA CAT ATG GGA CCA GGA GCA GCA TTT TAT GCA AGA GGA GAG GTA ATA
381▶ T R K S I H M G P G A A F Y A R G E V I

1201 GGA GAT ATA AGA CAA GCA CAT TGC AAC ATT AGT AGA GGA AGA TGG AAT GAC ACT TTG AAA
401▶ G D I R Q A H C N I S R G R W N D T L K

1261 CAG ATA GCT AAA AAG CTG CGC GAG CAG TTT AAC AAG ACC ATA AGC CTT AAC CAA TCC TCG
421▶ Q I A K K L R E Q F N K T I S L N Q S S

1321 GGA GGG GAC CTA GAG ATT GTA ATG CAC ACG TTT AAT TGT GGA GGG GAG TTT TTC TAC TGT
441▶ G G D L E I V M H T F N C G G E F F Y C

1381 AAC ACG ACC CAG CTG TTC AAC AGC ACC TGG AAT GAG AAT GAT ACG ACC TGG AAT AAT ACG
461▶ N T T Q L F N S T W N E N D T T W N N T

1441 GCA GGG TCG AAT AAC AAT GAG ACG ATC ACC CTG CCC TGT CGC ATC AAG CAG ATC ATA AAC
481▶ A G S N N N E T I T L P C R I K Q I I N

1501 AGG TGG CAG GAA GTA GGA AAA GCA ATG TAT GCC CCT CCC ATC AGT GGC CCG ATC AAC TGC
501▶ R W Q E V G K A M Y A P P I S G P I N C

1561 TTG TCC AAC ATC ACC GGG CTA TTG TTG ACG AGA GAT GGT GGT GAC AAC AAT AAT ACG ATA
521▶ L S N I T G L L L T R D G G D N N N T I

1621 GAG ACC TTC AGA CCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG GAC AAC TGG AGG AGC GAG CTG TAC AAG
541▶ E T F R P G G G D M R D N W R S E L Y K

FIG. 8-2

ES 2 386 884 T3

1681 TAC AAG GTA GTG AGG ATC GAG CCA TTG GGA ATA GCA CCC ACC AAG GCA AAG AGA AGA GTG
561▶ Y K V V R I E P L G I A P T K A K R R V

1741 GTG CAA AGA GAG AAA AGA GCA GTG GGA ATA GGA GCT ATG TTC CTT GGG TTC TTG GGA GCA
581▶ V Q R E K R A V G I G A M F L G F L G A

1801 GCA GGA AGC ACT ATG GGC GCA GCG TCG GTG ACC CTT ACC GTG CAA GCT CGC CTG CTG CTG
601▶ A G S T M G A A S V T L T V Q A R L L L

1861 TCG GGT ATA GTG CAA CAG CAA AAC AAC CTC CTC CGC GCA ATC GAA GCC CAG CAG CAT CTG
621▶ S G I V Q Q Q N N L L R A I E A Q Q H L

1921 TTG CAA CTC ACG GTC TGG GGC ATC AAG CAG CTC CAG GCT AGA GTC CTT GCC ATG GAG CGT
641▶ L Q L T V W G I K Q L Q A R V L A M E R

1981 TAT CTG AAA GAC CAG CAA CTT CTT GGG ATT TGG GGT TGC TCG GGA AAA CTC ATT TGC ACC
661▶ Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I C T

2041 ACG AAT GTG CCT TGG AAC GCC AGC TGG AGC AAC AAG TCC CTG GAC AAG ATT TGG CAT AAC
681▶ T N V P W N A S W S N K S L D K I W H N

2101 ATG ACC TGG ATG GAG TGG GAC CGC GAG ATC GAC AAC TAC ACG AAA TTG ATA TAC ACC CTG
701▶ M T W M E W D R E I D N Y T K L I Y T L

2161 ATC GAG GCG TCC CAG ATC CAG CAG GAG AAG AAT GAG CAA GAG TTG TTG GAG TTG GAT TCG
721▶ I E A S Q I Q Q E K N E Q E L L E L D S

2221 TGG GCG TCG TTG TGG TCG TGG TTT GAC ATC TCG AAA TGG CTG TGG TAT ATA GGA GTA TTC
741▶ W A S L W S W F D I S K W L W Y I G V F

2281 ATA ATA GTA ATA GGA GGT TTG GTA GGT TTG AAA ATA GTT TTT GCT GTA CTT TCG ATA GTA
761▶ I I V I G G L V G L K I V F A V L S I V

2341 AAT CGA GTT AGG CAG GGA TAC TCG CCA TTG TCA TTT CAA ACC CGC CTC CCA GCC CCG CGG
781▶ N R V R Q G Y S P L S F Q T R L P A P R

2401 GGA CCC GAC AGG CCC GAG GGC ATC GAG GAG GGA GGC GGC GAG AGA GAC AGA GAC AGA TCC
801▶ G P D R P E G I E E G G G E R D R D R S

FIG. 8-3

2461 GAT CAA TTG GTG ACG GGA TTC TTG GCA CTC ATC TGG GAC GAT CTG CGG AGC CTG TGC CTC
821▶ D Q L V T G F L A L I W D D L R S L C L

2521 TTC TCT TAC CAC CGC CTG CGC GAC CTG CTC CTG ATC GTG GCG AGG ATC GTG GAG CTT CTG
841▶ F S Y H R L R D L L L I V A R I V E L L

2581 GGA CGC AGG GGG TGG GAG GCC CTG AAG TAC TGG TGG AAC CTC CTG CAA TAT TGG ATT CAG
861▶ G R R G W E A L K Y W W N L L Q Y W I Q

2641 GAG CTG AAG AAC AGC GCC GTT AGT CTG CTG AAC GCT ACC GCT ATC GCC GTG GCG GAA GGA
881▶ E L K N S A V S L L N A T A I A V A E G

2701 ACC GAC AGG ATT ATA GAG GTA GTA CAA AGG ATT GGT CGC GCC ATC CTC CAT ATC CCC CGC
901▶ T D R I I E V V Q R I G R A I L H I P R

2761 CGC ATC CGC CAG GGC TTG GAG AGG GCT TTG CTA TAA
921▶ R I R Q G L E R A L L .

FIG. 8-4

1 ATG AGA AAA GCG GCT GTT AGT CAC TGG CAG CAG CAG TCT TAC CTG GAC TCT GGA ATC CAT
 1▶ M R K A A V S H W Q Q Q S Y L D S G I H
 1▶ M R K A A V S H W Q Q Q S Y L D S G I H
 61 TCT GGT GCC ACT ACC ACA GCT CCT TCT CTG AGT ATC TGC AGC GCC GAG GAG AAG CTG TGG
 21▶ S G A T T T A P S L S
 21▶ S G A T T T A P S L S I C S A E E K L W
 121 GTC ACG GTC TAT TAT GGC GTG CCC GTG TGG AAA GAG GCA ACC ACC ACG CTA TTC TGC GCC
 41▶ V T V Y Y G V P V W K E A T T T L F C A
 181 TCC GAC GCC AAG GCA CAT CAT GCA GAG GCG CAC AAC GTC TGG GCC ACG CAT GCC TGT GTA
 61▶ S D A K A H H A E A H N V W A T H A C V
 241 CCC ACG GAC CCT AAC CCC CAA GAG GTG ATC CTG GAG AAC GTG ACC GAG AAG TAC AAC ATG
 81▶ P T D P N P Q E V I L E N V T E K Y N M
 301 TGG AAA AAT AAC ATG GTA GAC CAG ATG CAT GAG GAT ATA ATC AGT CTA TGG GAT CAA AGC
 101▶ W K N N M V D Q M H E D I I S L W D Q S
 361 CTA AAG CCA TGT GTA AAA CTA ACC CCC CTC TGC GTG ACG CTG AAT TGC ACC AAC GCG ACG
 121▶ L K P C V K L T P L C V T L N C T N A T
 421 TAT ACG AAT AGT GAC AGT AAG AAT AGT ACC AGT AAT AGT AGT TTG GAG GAC AGT GGG AAA
 141▶ Y T N S D S K N S T S N S S L E D S G K
 481 GGA GAC ATG AAC TGC TCG TTC GAT GTC ACC ACC AGC ATC GAC AAG AAG AAG AAG ACG GAG
 161▶ G D M N C S F D V T T S I D K K K K T E
 541 TAT GCC ATC TTC GAC AAG CTG GAT GTA ATG AAT ATA GGA AAT GGA AGA TAT ACG CTA TTG
 181▶ Y A I F D K L D V M N I G N G R Y T L L
 601 AAT TGT AAC ACC AGT GTC ATT ACG CAG GCC TGT CCA AAG ATG TCC TTT GAG CCA ATT CCC
 201▶ N C N T S V I T Q A C P K M S F E P I P
 661 ATA CAT TAT TGT ACC CCG GCC GGC TAC GCG ATC CTG AAG TGC AAC GAC AAT AAG TTC AAT
 221▶ I H Y C T P A G Y A I L K C N D N K F N
 721 GGA ACG GGA CCA TGT ACG AAT GTC AGC ACG ATA CAA TGT ACG CAT GGA ATT AAG CCA GTA
 241▶ G T G P C T N V S T I Q C T H G I K P V
 781 GTG TCG ACG CAA CTG CTG CTG AAC GGC AGC CTG GCC GAG GGA GGA GAG GTA ATA ATT CGG
 261▶ V S T Q L L L N G S L A E G G E V I I R
 841 TCG GAG AAC CTC ACC GAC AAC GCC AAG ACC ATA ATA GTA CAG CTC AAG GAA CCC GTG GAG
 281▶ S E N L T D N A K T I I V Q L K E P V E
 901 ATC AAC TGT ACG AGA CCC AAC AAC AAC ACC CGA AAG AGC ATA CAT ATG GGA CCA GGA GCA
 301▶ I N C T R P N N N T R K S I H M G P G A
 961 GCA TTT TAT GCA AGA GGA GAG GTA ATA GGA GAT ATA AGA CAA GCA CAT TGC AAC ATT AGT
 321▶ A F Y A R G E V I G D I R Q A H C N I S

FIG. 9-1

1021 AGA GGA AGA TGG AAT GAC ACT TTG AAA CAG ATA GCT AAA AAG CTG CGC GAG CAG TTT AAC
 341▶ R G R W N D T L K Q I A K K L R E Q F N
 1081 AAG ACC ATA AGC CTT AAC CAA TCC TCG GGA GGG GAC CTA GAG ATT GTA ATG CAC ACG TTT
 361▶ K T I S L N Q S S G G D L E I V M H T F
 1141 AAT TGT GGA GGG GAG TTT TTC TAC TGT AAC ACG ACC CAG CTG TTC AAC AGC ACC TGG AAT
 381▶ N C G G E F F Y C N T T Q L F N S T W N
 1201 GAG AAT GAT ACG ACC TGG AAT AAT ACG GCA GGG TCG AAT AAC AAT GAG ACG ATC ACC CTG
 401▶ E N D T T W N N T A G S N N N E T I T L
 1261 CCC TGT CGC ATC AAG CAG ATC ATA AAC AGG TGG CAG GAA GTA GGA AAA GCA ATG TAT GCC
 421▶ P C R I K Q I I N R W Q E V G K A M Y A
 1321 CCT CCC ATC AGT GGC CCG ATC AAC TGC TTG TCC AAC ATC ACC GGG CTA TTG TTG ACG AGA
 441▶ P P I S G P I N C L S N I T G L L L T R
 1381 GAT GGT GGT GAC AAC AAT AAT ACG ATA GAG ACC TTC AGA CCT GGA GGA GGA GAT ATG AGG
 461▶ D G G D N N N T I E T F R P G G G D M R
 1441 GAC AAC TGG AGG AGC GAG CTG TAC AAG TAC AAG GTA GTG AGG ATC GAG CCA TTG GGA ATA
 481▶ D N W R S E L Y K Y K V V R I E P L G I
 1501 GCA CCC ACC AAG GCA AAG AGA AGA GTG GTG CAA AGA GAG AAA AGA GCA GTG GGA ATA GGA
 501▶ A P T K A K R R V V Q R E K R A V G I G
 1561 GCT ATG TTC CTT GGG TTC TTG GGA GCA GCA GGA AGC ACT ATG GGC GCA GCG TCG GTG ACC
 521▶ A M F L G F L G A A G S T M G A A S V T
 1621 CTT ACC GTG CAA GCT CGC CTG CTG CTG TCG GGT ATA GTG CAA CAG CAA AAC AAC CTC CTC
 541▶ L T V Q A R L L L S G I V Q Q Q N N L L
 1681 CGC GCA ATC GAA GCC CAG CAG CAT CTG TTG CAA CTC ACG GTC TGG GGC ATC AAG CAG CTC
 561▶ R A I E A Q Q H L L Q L T V W G I K Q L
 1741 CAG GCT AGA GTC CTT GCC ATG GAG CGT TAT CTG AAA GAC CAG CAA CTT CTT GGG ATT TGG
 581▶ Q A R V L A M E R Y L K D Q Q L L G I W
 1801 GGT TGC TCG GGA AAA CTC ATT TGC ACC ACG AAT GTG CCT TGG AAC GCC AGC TGG AGC AAC
 601▶ G C S G K L I C T T N V P W N A S W S N
 1861 AAG TCC CTG GAC AAG ATT TGG CAT AAC ATG ACC TGG ATG GAG TGG GAC CGC GAG ATC GAC
 621▶ K S L D K I W H N M T W M E W D R E I D
 1921 AAC TAC ACG AAA TTG ATA TAC ACC CTG ATC GAG GCG TCC CAG ATC CAG CAG GAG AAG AAT
 641▶ N Y T K L I Y T L I E A S Q I Q Q E K N
 1981 GAG CAA GAG TTG TTG GAG TTG GAT TCG TGG GCG TCG TTG TGG TCG TGG TTT GAC ATC TCG
 661▶ E Q E L L E L D S W A S L W S W F D I S

FIG. 9-2

2041 AAA TGG CTG TGG TAT ATA GGA GTA TTC ATA ATA GTA ATA GGA GGT TTG GTA GGT TTG AAA
 681▶ K W L W Y I G V F I I V I G G L V G L K
 2101 ATA GTT TTT GCT GTA CTT TCG ATA GTA AAT CGA GTT AGG CAG GGA TAC TCG CCA TTG TCA
 701▶ I V F A V L S I V N R V R Q G Y S P L S
 2161 TTT CAA ACC CGC CTC CCA GCC CCG CGG GGA CCC GAC AGG CCC GAG GGC ATC GAG GAG GGA
 721▶ F Q T R L P A P R G P D R P E G I E E G
 2221 GGC GGC GAG AGA GAC AGA GAC AGA TCC GAT CAA TTG GTG ACG GGA TTC TTG GCA CTC ATC
 741▶ G G E R D R D R S D Q L V T G F L A L I
 2281 TGG GAC GAT CTG CGG AGC CTG TGC CTC TTC TCT TAC CAC CGC CTG CGC GAC CTG CTC CTG
 761▶ W D D L R S L C L F S Y H R L R D L L L
 2341 ATC GTG GCG AGG ATC GTG GAG CTT CTG GGA CGC AGG GGG TGG GAG GCC CTG AAG TAC TGG
 781▶ I V A R I V E L L G R R C W E A L K Y W
 2401 TGG AAC CTC CTG CAA TAT TGG AAT CAG GAG CTG AAG AAC AGC GCC GTT AGT CTG CTG AAC
 801▶ W N L L Q Y W I Q E L K N S A V S L L N
 2461 GCT ACC GCT ATC GCC GTG GCG GAA GGA ACC GAC AGG ATT ATA GAG GTA GTA CAA AGG ATT
 821▶ A T A I A V A E G T D R I I E V V Q R I
 2521 GGT CGC GCC ATC CTC CAT ATC CCC CGC CGC ATC CGC CAG GCC TTG GAG AGG GCT TTG CTA
 841▶ G R A I L H I P R R I R Q G L E R A L L
 2581 TAA

FIG. 9-3

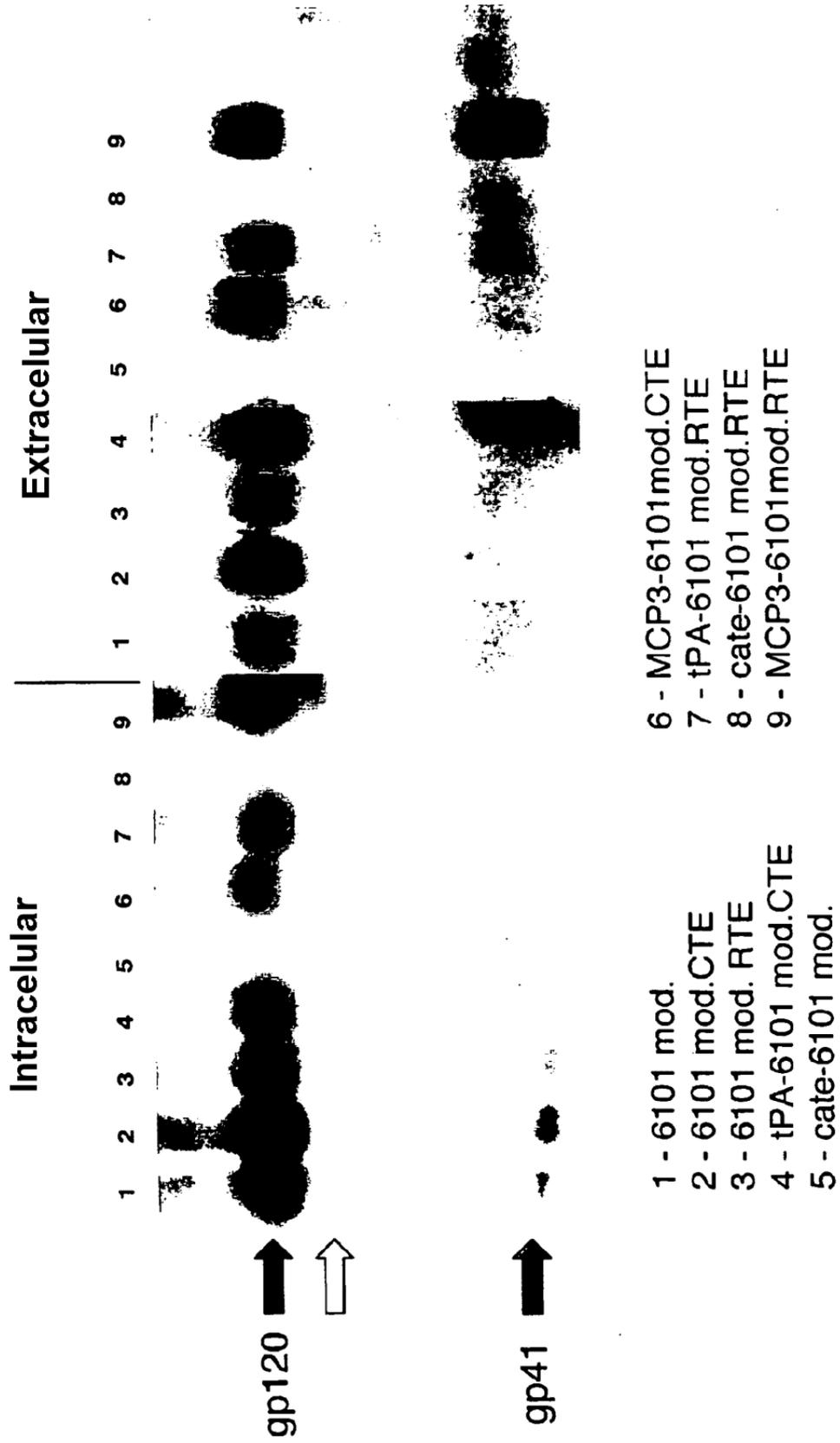


FIG. 10