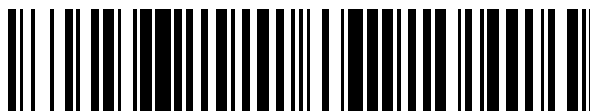


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 338**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/00** (2006.01)

**C07K 14/005** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2003** **E 10006227 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013** **EP 2311848**

54 Título: **Vacuna basada en polinucleótidos optimizados por codones contra infección por citomegalovirus humano**

30 Prioridad:

**23.12.2002 US 435549 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**14.11.2013**

73 Titular/es:

**VICAL INCORPORATED (100.0%)**  
**10390 Pacific Center Court**  
**San Diego, California 92121-4340, US**

72 Inventor/es:

**HERMANSON, GARY G.;**  
**GEALL, ANDREW J. y**  
**WLOCH, MARY KOPKE**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 429 338 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

Vacuna basada en polinucleótidos optimizados por codones contra infección por citomegalovirus humano

## Campo de la invención

El citomegalovirus humano ("HCMV") infecta entre 50% y 85% de adultos de 40 años (Gershon A. A., *et al.*, in *Viral Infections of Humans*, Evans A.S. y Kaslow, R. A, eds., Plenum Press, Nueva York, NY (1997)). Aunque la infección por HCMV es benigna en la mayoría de los adultos sanos, puede dar como resultado neumonitis letal, así como colitis, esofagitis, leucopenia y retinitis en pacientes con trasplante y otros pacientes inmunocomprometidos, especialmente aquellos con VIH. En poblaciones de trasplante de órgano sólido (TOS) o trasplante de células hematopoyéticas (TCH), la enfermedad por HCMV puede ocurrir a partir de nueva infección transmitida por el órgano donante o TCH, o puede recurrir como resultado de reactivación de virus latente en el receptor.

A pesar de las terapias autorizadas, la enfermedad asociada con HCMV permanece gravemente debilitante y con peligro para la vida en pacientes con VIH y los entornos TCH y TOS relacionados alogénicos. Además, el HCMV es la infección intrauterina más habitual en los Estados Unidos, y da como resultado la muerte o graves secuelas en más de 8.000 niños al año. Por estas razones, el HCMV se clasificó en la lista de las 10 vacunas más importantes que necesitan desarrollo en los Estados Unidos (*Vaccines for the 21st century: a tool for decision making*, National Academy of Sciences (1999)).

Las terapias existentes incluyen el uso de inmunoglobulinas y agentes antivirales tales como ganciclovir y sus derivados, que son más eficaces cuando se usan profilácticamente o de manera muy precoz durante infección en poblaciones en riesgo. Sin embargo, estas terapias se caracterizan por una toxicidad significativa y eficacia limitada, especialmente para enfermedad de aparición tardía (aparece después de los primeros 100 días) (Fillet, A. M., *Drugs Aging* 19: 343-354 (2002); von Buelzingsloewen, A., *et al*, *Bone Marrow Transplant* 12: 197-202 (1993); Winston, D. J., *et al*, *Ann. Intern. Med* 118: 179-184 (1993); Goodrich, J. M., *et al.*, *Ann. Intern. Med*: 118: 173-178 (1993); Boeckh, M, *et al.*, *Blood* 88: 4063-4071 (1996); Salzberger, B., *et al*, *Blood* 90: 2502-2508 (1997); Preiser, W., *et al*, *J. Clin. Virol.* 20: 59-70 (2001); Grangeot-Keros, L., y Cointe, D, *J. Clin. Virol.* 21: 213-221 (2001); Boeckh, M., y Bowden, R., *Cancer Treat. Res.* 76: 97-136 (1995); Zaia J. A., *et al*, *Hematology (Am. Soc. Hematol. Educ. Program)* 339-355 (2000)).

Además de desarrollar diagnóstico más rápido y sensible, los métodos biológicos moleculares permiten el desarrollo de vacunas subunitarias definidas para patógenos humanos. De hecho, vacunas subunitarias recombinantes inocuas, eficaces, reducirían significativamente, y quizás eliminarían, la necesidad de tratamientos terapéuticos. En el caso del HCMV, el control de infección se ha correlacionado con anticuerpos y reconocimiento de linfocitos T de al menos tres proteínas virales: pp65, glucoproteína B (gB) y la proteína temprana-1 inmediata (IE1).

La proteína viral pp65 de 65 kD, conocida también como ppUL83, proteína de matriz inferior, ICP27, PK68 y pp64, es una de las proteínas estructurales más abundantemente expresadas (Figura 1). Está codificada por el gen UL83 del genoma viral (nucleótidos 119352-121037 de la secuencia genómica de la cepa AD169 del HCMV, Genbank X17403). Se cree que esta proteína se procesa para la presentación de MCH poco después de la entrada viral en las células, lo que permite que se presente antes que otras proteínas virales inhabiliten la ruta de procesamiento antigénica en células infectadas. Por lo tanto, el reconocimiento de linfocitos T de esta proteína es importante para el control de la infección (Solache, *et al. J. Immunol.* 163: 5512-5518 (1999)).

La glucoproteína B (gB) es una glucoproteína de envoltura de 906 aminoácidos (Figura 4) codificada por UL55, nucleótidos 80772-83495 de Genbank X17403). Se trata de una proteína de membrana integral de tipo I que participa en la fusión de la cubierta del virión con la membrana celular, es necesaria para la infectividad, es muy inmunogénica y tiene un alto grado de conservación entre las cepas HCMV, haciendo que esta proteína sea una diana atractiva para vacunas. La proteína de longitud completa contiene un péptido señal amino terminal (aminoácidos 1-24), un dominio extracelular (aminoácidos 25-713), un supuesto dominio de anclaje transmembrana (aminoácidos 714-771) y un dominio intracelular (aminoácidos 772-906). La delección del dominio de anclaje transmembrana da como resultado la secreción de gB (Zheng *et al J. Virol* 70: 8029-8040 (1996)). Adicionalmente, la proteína de longitud completa se escinde por proteasas de furina hospedadora entre los aminoácidos 460 y 461 para formar productos de escisión gp93 y gp55 que permanecen fuertemente asociados como un heterodímero. (Mocarski E. S. y C. T. Courcelle, pág. 2629-2674, *Field's Virology*; 4ª ed., Eds. Knipe DM y Howley PM, Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia (2001)).

IE1 es una proteína de 491 aminoácidos (Figura 7) codificada por UL123 ORF HCMV (Genbank X17403, nucleótidos 171006-172765). El gen codifica un ARNm de 1,9 Kb que comprende cuatro exones traduciéndose solamente los exones 2-4. Los 85 aminoácidos N-terminal se codifican por exones 2 y 3, codificándose el resto por el exón 4. IE2 es una familia de proteínas relacionada que comparten los exones 1-3 y un exón 5, con muchas variaciones de corte y empalme. Juntas, IE1 e IE2 transactivan el promotor temprano inmediato principal del HCMV para regular la transcripción viral (Malone, CL. *et al. J. Virol* 64: 1498-1506 (1990); Mocarski, E. *Fields Virology* Ed. Field *et al*, 3ª ed., págs. 2447-2491, Lippincott-Raven Publishers, Filadelfia (1996); Chee M. S. *et al*, *Curr Topics Microbiol Immunol.* 154: 125-169 (1990)).

IE1 tiene una actividad quinasa que es dependiente de un sitio de unión al ATP codificado por los aminoácidos 173-196. IE1 puede autofosforilarse o fosforilar factores nucleares para transactivar transcripción dependiente de E2F. Ambos exones 3 y 4 son necesarios para la transactivación viral, con las regiones requeridas en el exón 4 ampliamente distribuidas a través del exón. Se sabe que la parte de la proteína codificada por el exón 4 tiene un alto grado de estructura secundaria. Aunque IE1 se transporta al núcleo, no se ha identificado señal de localización nuclear. (Pajovic, S. *et al. Mol Cell. Bio.* 17:6459-6464 (1997)). Gyulai *et al.* demostraron altos niveles de respuesta CTL *in vitro* contra células efectoras que expresan un fragmento nucleotídico que consiste en el exón 4 (Gyulai *et al J. Infectious Diseases* 181: 1537-1546 (2000)).

Actualmente no se dispone de ninguna vacuna para la HCMV. Sin embargo, se han realizado ensayos clínicos con vacunas HCMV vivas atenuadas, una vacuna basada en el virus de la viruela del canario (canarypox) y una vacuna gB recombinante (Plotkin, S. A., *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18: 313-325 (1999)). La primera vacuna contra el HCMV ensayada en seres humanos era una vacuna de virus atenuado viva fabricada a partir de la cepa adaptada en laboratorio AD169 (Elek, S. D. y Stern, H., *Lancet* 1: 1-5 (1974)). Las reacciones locales eran comunes, pero el HCMV no se aisló de ninguno de los receptores de la vacuna. Esta vacuna no se investigó más allá de estudios en Fase I iniciales.

Se han determinado respuestas inmunitarias contra HCMV mediante el estudio de infecciones agudas y crónicas de HCMV en modelos animales y en seres humanos. Los anticuerpos parecen ser críticos en la prevención de transmisión fetomaterna y se dirigen principalmente a glicoproteínas de envoltura especialmente gB (Plotkin, S. A., *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18: 313-325 (1999); Fowler, K. B., *N. Engl. J. Med.* 326: 663-667 (1992)).

Por otro lado, el control de infección por HCMV en receptores de trasplante y en personas infectadas por VIH está asociado con respuestas inmunitarias celulares preservadas, incluyendo linfocitos T CD4+, CD8+ y linfocitos citotóxicos (NK). Las respuestas de linfocitos T CD8+ se dirigen principalmente a la proteína temprana inmediata (IE) del HCMV y a la proteína pp65 tegumentaria abundante (Gyulai, Z., *et al., J. Infect. Dis.* 181: 1537-1546 (2000); Tabi, Z., *et al., J. Immunol.* 166: 5695-5703 (2001); Wills, M. R., *et al., J. Virol.* 70: 7569-7579 (1996); Frankenberg, N., *et al, Virology* 295: 208-216 (2002); Retiere, C., *et al., J. Virol.* 74: 3948-3952 (2000); Koszinowski, U. H., *et al., J. Virol.* 61: 2054-2058 (1987); Kern, F., *et al., J. Infect. Dis.* 185: 1709-1716 (2002)). Aproximadamente el 92% de las personas tienen respuestas CD8+ contra pp65 y otro 76% contra el exón 4 de IE1 (Gyulai, Z., *et al., J. Infect. Dis.* 181: 1537-1546 (2000); Kern, F., *et al., J. Infect. Dis.* 185: 1709-1716 (2002)). Además, otro tercio de los individuos infectados tienen respuestas CTL contra gB. Casi todas las personas infectadas tienen respuestas CD4+ contra el HCMV, aunque el mapeo génico y epitópico de estas respuestas no se ha investigado tan completamente como para los linfocitos T CD8+ (Kern, F., *et al., J. Infect. Dis.* 185: 1709-1716 (2002); Davignon, J. L., *et al, J. Virol.* 70: 2162-2169 (1996); He, H., *et al, J. Gen. Virol* 76: 1603-1610 (1995); Beninga, J., *et al, J. Gen. Virol.* 76: 153-160 (1995)). Las respuestas de linfocitos T auxiliares en personas infectadas, sanas es lo suficientemente fuerte para que el HCMV se use frecuentemente como un control positivo en el desarrollo de métodos para la medición de respuestas de linfocitos T CD4+ (Kern, R., *et al., J. Infect. Dis.* 185: 1709-1716 (2002); Currier, J. R., *et al, J. Immunol Methods* 260: 157-172 (2002); Picker, L. J., *et al., Blood* 86: 1408-1419(1995)).

Otros intentos para desarrollar vacunas para el HCMV se han centrado en la administración de polipéptidos virales purificados o recombinantes, tanto epítomos de longitud completa como modificados o cortos para inducir respuestas inmunitarias. En una revisión publicada por the American Society for Hematology, Zaia *et al.*, describe diversas estrategias basadas en péptidos para desarrollar vacunas contra el HCMV, incluyendo el uso de vacunas de ADN que expresan proteínas de tipo silvestre y mutadas (Zaia, J. A. *et al. Hematology 2000, Am Soc Hematoc Educ Program*, págs. 339-355, Am. Soc. Hematol. (2000)). Endresz *et al.* describen la suscitación de CTL específico de HCMV en ratones inmunizados con plásmidos que codifican gB de longitud completa de la cepa Towne del HCMV, expresados constitutivamente o bajo un promotor regulable por tetraciclina y pp65 o un gB con la delección de aminoácidos 715-772 (Endresz, V. *et al. Vaccine* 77: 50-8 (1999); Endresz, V. *et al. Vaccine* 19: 3972-80 (2001)). La Patente de Estados Unidos Nº 6.100.064 describe un método para producir polipéptidos gB segregados que carecen del dominio transmembrana pero que conservan el dominio C terminal. Las Patentes de Estados Unidos Nº 5.547.834 y 5.834.307 describen un polipéptido gB con sustituciones de aminoácidos en el sitio de escisión endoproteolítico para impedir el procesamiento proteolítico. Las Patentes de Estados Unidos 6.251.399 y 6.156.317 describen vacunas que utilizan fragmentos peptídicos cortos de pp65 que comprenden epítomos inmunogénicos. Varios otros grupos han analizado epítomos en pp65 del HCMV y gB para suscitar una fuerte respuesta inmunitaria (Liu, YN. *et al J. Gen. Virol* 74: 2207-14 (1993); Ohlin, M. *et al J. Virol.* 67: 703-10 (1993); Navarro, D. *et al. J. Med. Virol.* 52: 451-9 (1997); Khattab BA. *et al J. Med. Virol.* 52: 68-76 (1997); Diamond, DJ *et al. Blood* 90: 1751067 (1997); Solache, A. *et al J. Immunol.* 163: 5512-8 (1999)). La Patente de Estados Unidos Nº 6.162.620 se refiere a un polinucleótido que codifica un gB de tipo silvestre o un gB que carece de secuencias de membrana. La Patente de Estados Unidos Nº 6.133.433 se refiere a un nucleótido que codifica una pp65 de tipo silvestre de longitud completa o un fragmento específico de 721 nt de la misma. Cada una de las referencias citadas en este párrafo se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Durante los pasados últimos años ha habido un interés sustancial en ensayar vacunas basadas en ADN para numerosas enfermedades infecciosas en las que las que existe una necesidad de una vacuna o una vacuna mejorada. Como diversas ventajas bien reconocidas de las vacunas basadas en ADN se incluyen la velocidad y

facilidad y coste de fabricación, la versatilidad de desarrollo y ensayo de vacunas multivalentes, el hallazgo de que las vacunas de ADN pueden producir una fuerte respuesta celular en una amplia diversidad de modelos animales así como en seres humanos, y la seguridad demostrada del uso de ADN plasmídico como un vector de administración (Donnelly, J. J., *et al.*, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 617-648 (1997); Manickan, E., *et al.*, *Crit. Rev. Immunol.* 17(2): 139-154 (1997)). Las vacunas de ADN representan la siguiente generación en el desarrollo de vacunas (Nossal, G., *Nat. Med.* 4: 475-476 (1998)) y numerosas vacunas de ADN están en ensayos clínicos.

El producto inmunoterapéutico diseñado se basa en el concepto de inmunización por transferencia génica directa. Los agentes inmunoterapéuticos basados en plásmidos ofrecen los atributos positivos de estimulación inmune intrínseca a vacunas atenuadas vivas combinado con la seguridad de las vacunas de subunidad recombinantes en una formulación de adyuvante.

En la población trasplantada, el control de la enfermedad HCMV está asociado con una respuesta inmunitaria celular (Riddell, S. R., "Pathogenesis of cytomegalovirus pneumoniae in immunocompromised hosts," *Semin. Respir. Infect.* 10: 199-208 (1995)) y por lo tanto un producto eficaz debe inducir respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+. Se ha observado que el plásmido formulado induce dichas respuestas inmunitarias celulares y no tiene los problemas de seguridad asociados con el uso de vectores vivos en entornos de trasplante (Shiver, J. W., *et al.*, *Nature* 415: 331-335 (2002)).

Las regiones codificantes remodeladas que codifican polipéptidos a partir de patógenos que usan frecuencias de codón preferidas en una especie de mamífero determinada a menudo da como resultado un aumento significativo en la expresión en las células de esas especies de mamífero y un aumento simultáneo en la inmunogenicidad. Véase, por ejemplo Deml, L., *et al.*, *J. Virol* 75: 10991-11001 (2001), y Narum, DL, *et al.*, *Infect. Immun.* 69: 7250-7253 (2001), todos ellos incorporados en el presente documento por referencia en su totalidad.

Continúa existiendo una necesidad en la técnica de compuestos inmunogénicos convenientes, inocuos y eficaces para proteger a los seres humanos contra infección por el HCMV. La presente invención proporciona compuestos inmunogénicos inocuos aunque eficaces y métodos para proteger a los seres humanos, especialmente a receptores de trasplante e individuos inmunocomprometidos, contra infección por HCMV usando dichos compuestos inmunogénicos.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a mejorar la respuesta inmunitaria de un ser humano que necesita protección contra infección por HCMV administrando *in vivo*, en un tejido del ser humano, un polinucleótido que comprende una región codificante optimizada por codones que codifica un polipéptido HCMV o un fragmento de ácido nucleico de dicha región codificante que codifica un fragmento inmunogénico del mismo. Los fragmentos de ácido nucleico están modificados de su estado nativo en uno o más de las siguientes maneras. En primer lugar, un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido de HCMV puede ser parte o toda una región codificante optimizada por codones, optimizada de acuerdo con un uso de codón en seres humanos. Además, un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido de HCMV puede ser un fragmento que codifica solo una parte de un polipéptido de longitud completa y/o puede mutarse para, por ejemplo, eliminar del polipéptido codificado motivos de proteína inesperados presentes en el polipéptido codificado o factores de virulencia asociados con el péptido codificado. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede mutarse para no codificar motivos de anclaje inesperados que impidan la secreción del polipéptido. Después de la administración, el polinucleótido se incorpora en las células del ser humano *in vivo*, y se produce *in vivo* una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un polipéptido del HCMV o fragmento del mismo.

La invención proporciona composiciones de acuerdo con la reivindicación 1. Dichas composiciones pueden incluir diversos agentes facilitadores de la transfección o potenciadores de inmunidad tales como poloxámeros, lípidos catiónicos o adyuvantes.

También se describen plásmidos y otras construcciones polinucleotídicas para la administración de secuencias codificantes de ácido nucleico a un vertebrado que proporcionen expresión de polipéptidos HCMV, o fragmentos, variantes o derivados del mismo. Adicionalmente se desvelan vehículos, excipientes, agentes facilitadores de transfección, agentes potenciadores de inmunogenicidad, por ejemplo adyuvantes, u otro agente o agentes para mejorar la transfección, expresión o eficacia del gen administrado y su producto génico.

La invención proporciona adicionalmente las composiciones de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en un método de tratamiento de acuerdo con la reivindicación 14. No se reivindican métodos de tratamiento del organismo humano o animal por terapia.

La respuesta inmunitaria de un paciente humano contra infección por HCMV puede mejorarse administrando secuencialmente dos o más composiciones inmunogénicas diferentes a los tejidos del vertebrado. Dichos métodos comprenden administrar inicialmente uno o más polinucleótidos que comprendan una o más regiones codificantes optimizadas por codón que codifican polipéptidos del HCMV o fragmentos de ácido nucleico de dichas regiones codificantes que codifican fragmentos, variantes o derivados del mismo, para estimular inmunidad y después

administrar posteriormente una composición de vacuna diferente, por ejemplo, una vacuna viral recombinante, una vacuna de subunidad de proteína o una vacuna bacteriana recombinante o destruida o vacunas para reforzar la respuesta inmunitaria anti-HCMV en un ser humano.

5 Adicionalmente se describen en el presente documento métodos para mejorar la respuesta inmunitaria de un paciente humano contra el HCMV administrando a los tejidos de un ser humano uno o más polinucleótidos que comprenden uno o más regiones codificantes optimizadas por codones que codifican los polipéptidos del HCMV y también polipéptidos o fragmentos del HCMV, variantes o derivados del mismo, o uno o más polinucleótidos no optimizados que codifican polipéptidos de HCMV, fragmentos, variantes o derivados del mismo.

10 La combinación de polipéptidos HCMV o polinucleótidos que codifican polipéptidos HCMV o fragmentos, variantes o derivados del mismo, con las composiciones de ácido nucleico optimizadas por codones proporciona beneficios terapéuticos a concentraciones moderadas de dosis. Por ejemplo, respuestas inmunológicas suficientes para un efecto beneficioso terapéutico pueden conseguirse usando menos de una vacuna de tipo convencional cuando se complementa o se mejora con la cantidad apropiada de un ácido nucleico optimizado por codón.

15 Las vacunas tipo convencionales incluyen composiciones de vacuna que comprenden virus o bacterias muertos o inertes o fragmentos de ellos, o proteínas o fragmentos de proteínas bacterianos o virales, inyectadas en el paciente para suscitar acción por el sistema inmunitario. Con respecto a la presente invención, las vacunas de tipo convencional incluyen composiciones que comprenden polipéptidos inmunogénicos o nucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos, fragmentos, variantes o derivados de los mismos, y vectores que comprenden nucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos, fragmentos, variantes o derivados de los mismos, que no son  
20 productos de, o no contienen polinucleótidos optimizados por codón como se describe en el presente documento. Por tanto, se incluyen vacunas modificadas por ingeniería genética en vacunas de tipo convencional, tales como vacunas vivas modificadas genéticamente, vacunas quiméricas vivas, vacunas defectuosas en replicación vivas, vacunas subunitarias, vacunas peptídicas y diversas modificaciones de vacunas subunitarias monovalentes, multivalentes o quiméricas administradas como componentes individuales e incorporadas en partículas similares a  
25 virus para mejorar la inmunogenicidad y vacunas de polinucleótidos. Como se describe en el presente documento, los agentes auxiliares también se consideran componentes de vacunas tipo convencionales.

Por tanto, se contemplan dosis moderadas por administración de las composiciones de vacuna de polinucleótidos combinatoria de la presente invención.

30 En particular, la dosis de la vacuna de tipo convencional puede reducirse al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 70% cuando se administra en combinación, o antes que, o posterior a, las composiciones de ácido nucleico optimizadas por codón de la invención.

35 De manera similar, un nivel deseable de una respuesta inmunogénica conseguida por compuestos farmacéuticos basados en ADN solo, puede conseguirse con menos ADN incluyendo una vacuna de ADN de tipo convencional. Además, usando una combinación de vacuna de tipo convencional y una vacuna basada en ADN optimizada por codón puede permitir que ambos materiales se usen en menores cantidades aunque consiguiendo al mismo tiempo el nivel deseado de respuesta inmunitaria que surge de la administración de un componente en solitario en cantidades más elevadas (por ejemplo puede usarse menos de uno de los productos inmunológicos cuando se usan en combinación). Esta reducción en cantidades de materiales que van a administrarse puede ser para cada  
40 administración, además de reducir el número de administraciones en un régimen de vacunación (por ejemplo 2 frente a 3 o 4 inyecciones). Además, la combinación puede proporcionar también reducir la cinética de la respuesta inmunológica (por ejemplo se consiguen niveles de respuesta deseados en 3 semanas en lugar de 6 después de inmunización).

45 En particular, la dosis de un compuesto farmacéutico basado en ADN, puede reducirse al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 70% cuando se administra en combinación con vacunas CMV convencionales.

La determinación de las cantidades exactas de compuestos farmacéuticos basados en ADN y antígeno convencional se basa en diversos factores como se describe en el presente documento y un experto en la técnica puede determinarlo fácilmente.

50 Además de dosis moderadas, las composiciones combinatorias reivindicadas proporcionan una ampliación de la respuesta inmunitaria y/o respuestas inmunitarias beneficiosas mejoradas. Dichas respuestas inmunitarias ampliadas o mejoradas se consiguen: añadiendo ADN para mejorar respuestas celulares contra un tipo de vacuna convencional, añadir una vacuna de tipo convencional a un compuesto farmacéutico de ADN para mejorar la respuesta humoral, usando una combinación que induce epítomos adicionales (tanto humorales y/o celulares) para reconocer y/o más deseablemente responder a (ampliación epitópica); empleando una combinación de vacuna  
55 convencional de ADN diseñada para un espectro deseado particular de respuestas inmunológicas; obtener un espectro deseable usando mayores cantidades de cualquier componente. La respuesta inmunitaria ampliada puede medirse por un experto en la técnica mediante diversos ensayos inmunológicos convencionales específicos para el

espectro de respuesta deseable que se describe con más detalle en el presente documento.

Tanto la amplitud como moderación de dosis pueden obtenerse simultáneamente.

### Breve descripción de las figuras

5 La Figura 1 muestra la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre (SEC ID N°: 1) y la traducción de aminoácidos (SEC ID N°: 2) de pp65 de HCMV nativo de longitud completa (Genbank WMBE65) de la cepa AD169 del HCMV. El supuesto sitio quinasa en los aminoácidos Arg435-Lys438 se subraya.

La Figura 2 muestra una secuencia de nucleótidos completamente optimizada por codones (SEC ID N°: 3) y la traducción de aminoácidos (SEC ID N°: 4) de la pp65 de la HCMV nativa.

10 La Figura 3 muestra el alineamiento de secuencias de nucleótidos de tipo silvestre ("wt", wild type) (SEC ID N°:1) y completamente optimizada por codones ("opt") (SEC ID N°: 8) que codifican la pp65 de la HCMV nativa.

La Figura 4 muestra la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre (SEC ID N°: 11) y la traducción de aminoácidos (SEC ID N°: 12) de la cepa AD169 de gB del HCMV. La SEC ID N°: 11 contiene un fragmento de ácido nucleico que codifica la fase de lectura abierta de la gB de HCMV de longitud completa (nucleótidos 157-3125 de Genbank X04606). El sitio de escisión proteolítica del hospedador entre los aminoácidos 460 y 461 se marca con una coma.

15 La Figura 5 muestra una secuencia de nucleótidos completamente optimizada por codón (SEC ID N°: 13) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 14) de una gB del HCVM truncada, segregada. La SEC ID N°: 13 contiene un ácido nucleico que codifica una gB segregada optimizada por codones humana mínima (SEC ID N°: 14).

20 La Figura 6 muestra el alineamiento de la secuencia de nucleótidos de tipo silvestre ("wt" wild type) (SEC ID N°: 11) y completamente optimizada por codones ("opt") (SEC ID N°: 16) que codifican gB HCMV de tipo silvestre de longitud completa.

La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos de IE1 de tipo silvestre (SEC ID N°: 19) y la traducción de aminoácidos (SEC ID N°: 20) de IE1 nativa de longitud completa.

La Figura 8 muestra el protocolo para la preparación de una formulación que comprende BAK 0,3 mM, CRL 1005 7,5 mg/ml y 5 mg/ml de ADN en un volumen final de 3,6 ml, mediante el uso de termociclación.

25 La Figura 9 muestra el protocolo para la preparación de una formulación que comprende BAK 0,3 mM, CRL 1005 34 mg/ml o 50 mg/ml y ADN 2,5 mg/ml en un volumen final de 4,0 ml, mediante el uso de termociclación.

La Figura 10 muestra el protocolo para la preparación simplificada (sin termociclación) de una formulación que comprende BAK 0,3 mM, CRL 1005 7,5 mg/ml y ADN 5 mg/ml.

### Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se refiere a composiciones para mejorar la respuesta inmunitaria de un ser humano que necesita protección contra infección por HCMV administrando *in vivo*, en un tejido de un ser humano, un polinucleótido que comprende una región codificante optimizada por codón humano que codifica un polipéptido de HCMV, o un fragmento de ácido nucleico de dicha región codificante que codifica un fragmento, variante o derivado del mismo. Los polinucleótidos se incorporan en las células del ser humano *in vivo*, y se produce una cantidad  
35 inmunológicamente eficaz del polipéptido del HCMV, o fragmento o variante *in vivo*.

La presente invención proporciona vacunas basadas en polinucleótidos para la administración de secuencias codificantes de HCMV a un ser humano con expresión óptima y seguridad conferida a través de optimización por codón y/u otras manipulaciones. Estas vacunas basadas en polinucleótidos se preparan y administran de tal manera que los productos génicos codificados se expresan óptimamente en seres humanos. Como resultado, estas  
40 composiciones son útiles en la estimulación de la respuesta inmunitaria contra infección por HCMV. También se desvelan sistemas de expresión, sistemas de administración y regiones codificantes de HCMV optimizadas por codón.

Una vacuna de polinucleótidos de la presente invención puede suscitar una respuesta inmunitaria en un ser humano contra HCMV cuando se administra a un ser humano. Dichos polinucleótidos se denominan en el presente  
45 documento vacunas de polinucleótidos.

Debe observarse que el término "uno", "una" o "un" se refiere a uno o más de la entidad; por ejemplo, se entiende que "un polinucleótido" representa uno o más polinucleótidos. Como tal, los términos "un", "uno", "una" o "uno o más" y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

50 Las expresiones "ácido nucleico" o "fragmento de ácido nucleico" se refiere a uno cualquiera o más segmentos de ácido nucleico, por ejemplo fragmentos de ADN o ARN, presentes en un polinucleótido o construcción. Aunque los términos "ácido nucleico", como se usan en el presente documento, se refieren a incluir cualquier ácido nucleico, la

expresión “fragmento de ácido nucleico” se usa en el presente documento para indicar específicamente un fragmento de una región codificante optimizada por codón diseñada o sintética que codifica un polipéptido o fragmento, variante o derivado del mismo, que se ha optimizado de acuerdo con el uso de codones de una especie determinada. Como se usa en el presente documento, una “región codificante” es una parte del ácido nucleico que consiste en codones traducidos en aminoácidos. Aunque un “codón de terminación” (TAG, TGA o TAA) no se traduce en ningún aminoácido, puede considerarse que forma parte de una región codificante, pero cualquiera de las secuencias flanqueantes, por ejemplo promotores, sitios de unión a ribosoma, terminadores de la transcripción y similares, no forman parte de una región codificante. En una sola construcción de polinucleótidos puede haber dos o más ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico, por ejemplo, en un solo plásmido o en construcciones de polinucleótidos individuales, por ejemplo en plásmidos individuales. Además, cualquier ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico puede codificar un solo polipéptido, por ejemplo, un solo antígeno, citocina, o polipéptido regulador o puede codificar más de un polipéptido, por ejemplo, un ácido nucleico puede codificar dos o más polipéptidos. Además, un ácido nucleico puede codificar un elemento regulador tal como un promotor o un terminador de la transcripción o puede codificar regiones codificantes heterólogas, por ejemplo, elementos o motivos especializados tal como un péptido de señal secretor o un dominio funcional.

Los términos “fragmento”, “variante”, “derivado” y “análogo” cuando se refieren a polipéptidos HCMV incluyen cualquiera de los polipéptidos que conservan al menos alguna de la inmunogenicidad o antigenicidad del polipéptido nativo correspondiente. Los fragmentos de polipéptidos HCMV incluyen fragmentos proteolíticos, fragmentos de delección y en particular, fragmentos de polipéptidos HCMV que presentan secreción aumentada de la célula o mayor inmunogenicidad cuando se administran a un animal. Los fragmentos polipeptídicos incluyen adicionalmente cualquier parte del polipéptido que comprenda un epítipo antigénico o inmunogénico del polipéptido nativo, incluyendo epítopos lineales así como tridimensionales. Las variantes de polipéptidos HCMV incluyen fragmentos como se ha descrito anteriormente y también polipéptidos con secuencias de aminoácidos modificadas debido a sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos. Pueden producirse variantes de manera natural, tal como una variante alélica. Por una “variante alélica” se entiende formas alternas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma o genoma de un organismo o virus. *Genes II*, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985). Por ejemplo como se usa en el presente documento, variaciones en un producto génico determinado, por ejemplo pp65, entre las cepas HCMV, por ejemplo Towne y AD169, deberían considerarse “variantes alélicas”. Las variantes de origen no natural pueden producirse usando técnicas de mutagénesis conocidas en la técnica. Los polipéptidos variantes pueden comprender sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos conservativos o no conservativos. Los derivados de polipéptidos HCMV son polipéptidos que se han modificado para presentar características adicionales no encontradas en el polipéptido nativo. Los ejemplos incluyen proteínas de fusión. Un análogo es otra forma de un polipéptido HCMV. Un ejemplo es una proproteína que puede activarse escindiendo la proproteína para producir un polipéptido maduro activo.

El término “polinucleótido” pretende incluir un ácido nucleico singular o fragmento de ácido nucleico así como una pluralidad de ácidos nucleicos o fragmentos de ácido nucleico y se refiere a una molécula o construcción aislada, por ejemplo, un genoma viral (por ejemplo, un genoma viral no infeccioso), ARN mensajero (ARNm), ADN plasmídico (ADNp) o derivados de ADNp (por ejemplo minicírculos como se describe en (Darquet, A-M *et al.*, *Gene Therapy* 4: 1341-1349 (1997)) que comprende un polinucleótido. Un ácido nucleico puede proporcionarse en forma lineal (por ejemplo ARNm), circular (por ejemplo plásmido) o ramificado, así como formas bicatenarias o monocatenarias. Un polinucleótido puede comprender un enlace fosfodiéster convencional o un enlace no convencional (por ejemplo un enlace amida, tal como se encuentra en los ácidos nucleicos peptídicos (PNA)).

Se pretende que los términos “polinucleótido infeccioso” o “ácido nucleico infeccioso” incluyan polinucleótidos y/o ácidos nucleicos virales aislados que son exclusivamente suficientes para mediar la síntesis de partículas virales infecciosas completas después de la captación por células permisivas. “Aislado” significa que el ácido nucleico viral no requiere copias presintetizadas de ninguno de los polipéptidos que codifica, por ejemplo, replicasas virales para iniciar su ciclo de replicación.

Las expresiones “polinucleótido no infeccioso” o “ácido nucleico no infeccioso” como se define en el presente documento son polinucleótidos o ácidos nucleicos que no pueden, sin material añadido adicional, por ejemplo polipéptidos, mediar la síntesis de partículas virales infecciosas completas después de la captación por células permisivas. Un polinucleótido o ácido nucleico infeccioso no se hace “no infeccioso” simplemente porque lo capte una célula no permisiva. Por ejemplo, un polinucleótido viral infeccioso de un virus con un intervalo de hospedador limitado es infeccioso si este es capaz de mediar la síntesis de partículas virales infecciosas completas cuando se toman por células derivadas de un hospedador permisivo (es decir, un hospedador permisivo para el propio virus). El hecho de que la captación por células derivadas de un hospedador no permisivo no dé como resultado la síntesis de partículas virales infecciosas completas no hace que el ácido nucleico sea “no infeccioso”. En otras palabras, el término no califica la naturaleza de la célula hospedadora, el tipo de tejido o la especie.

En algunos casos, un polinucleótido o ácido nucleico infeccioso aislado puede producir partículas virales totalmente infecciosas en una población de células hospedadoras que carecen de receptores para las partículas virales, es decir, es no permisivo para la entrada del virus. Por tanto los virus producidos no infectarán células circundantes. Sin embargo, si el sobrenadante que contiene las partículas virales se transfiere a células que son permisivas para el

virus, se producirá la infección.

Las expresiones “polinucleótido replicante” o “ácido nucleico replicante” significan incluir estos polinucleótidos y/o ácidos nucleicos que, después de captarse por una célula hospedadora permisiva, son capaces de producir múltiples, por ejemplo una o más copias del mismo polinucleótido o ácido nucleico. Los polinucleótidos y ácidos nucleicos infecciosos son un subconjunto de polinucleótidos replicantes y ácidos nucleicos; los términos no son sinónimos. Por ejemplo, un genoma viral defectuoso que carece de los genes de proteínas de cubierta de virus puede replicarse, por ejemplo, producir múltiples copias de sí mismo, pero no ser infeccioso porque no es capaz de mediar la síntesis de partículas virales infecciosas completas a menos que las proteínas de cubierta u otros ácidos nucleicos que codifican las proteínas de cubierta se proporcionen de manera exógena.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido, ácido nucleico o fragmento de ácido nucleico puede ser ADN. En el caso de ADN, un polinucleótido que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido normalmente también comprende un promotor asociado operativamente con el ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una asociación operativa es cuando un ácido nucleico que codifica un producto génico, por ejemplo, un polipéptido, se asocia con una o más secuencias reguladoras de tal manera que se produce la expresión del producto génico bajo la influencia o control de la secuencia (o secuencias) reguladora. Dos fragmentos de ADN (tal como un ácido nucleico que codifica un polipéptido y un promotor asociado con el extremo 5' del ácido nucleico) están “asociados operativamente” si la inducción de la función del promotor da como resultado la transcripción del ARNm que codifica el producto génico deseado y si la naturaleza de la unión entre los dos fragmentos de ADN no (1) da como resultado la introducción de una mutación en marco de lectura, (2) interfiere con la capacidad de secuencias reguladoras de la expresión para dirigir la expresión del producto génico o (3) interfieren con la capacidad de transcribirse del molde de ADN. Por tanto, una región promotora debe asociarse operativamente con un ácido nucleico que codifica un polipéptido si el promotor es capaz de efectuar la transcripción del ácido nucleico. El promotor puede ser un promotor específico de célula que dirige la transcripción sustancial del ADN solamente en células predeterminadas. Otros elementos de control de la transcripción, además de un promotor, por ejemplo potenciadores, operadores, represores y señales de terminación de la transcripción, pueden asociarse operativamente con el polinucleótido para dirigir la transcripción específica de célula. En el presente documento se describen promotores adecuados y otras regiones de control de transcripción.

Los expertos en la técnica conocen diversas regiones de control de la transcripción. Estas incluyen, sin limitación, regiones de control de la transcripción que actúan en células de vertebrados, tales como, pero sin limitación, segmentos promotores y potenciadores de citomegalovirus (el promotor temprano inmediato, junto con el intrón A), el virus de simio 40 (el promotor temprano), retrovirus (tal como el virus de sarcoma de Rous) y picornavirus (particularmente un sitio de entrada a ribosoma interno o IRES, denominado también secuencia CITE). Otras regiones de control de la transcripción incluyen las derivadas de genes de vertebrados tal como actina, proteína de choque térmico, hormona de crecimiento bovino y beta globina de conejo, así como otras secuencias que pueden controlar la expresión génica en células eucariotas. Regiones de control de la transcripción adecuadas adicionales incluyen promotores específicos de tejido y potenciadores así como promotores inducibles por linfocinas (por ejemplo promotores inducibles por interferones o interleucinas).

Un polinucleótido de ADN puede ser un plásmido circular o linealizado u otro ADN lineal que es, por ejemplo, no infeccioso y no integrante (es decir no se integra en el genoma de las células de vertebrado). Un plásmido linealizado es un plásmido que previamente era circular pero se ha linealizado, por ejemplo, por digestión con una endonucleasa de restricción.

Como alternativa, los genomas de virus de ADN pueden usarse para administrar polinucleótidos de ADN en células de vertebrados. Un genoma de virus de ADN puede ser no infeccioso y no integrante. Los genomas de virus de ADN adecuados incluyen genomas de herpesvirus, genomas de adenovirus, genomas de adenovirus asociados y genomas de poxvirus. Las referencias que citan métodos para la inducción *in vivo* de genomas de virus no infecciosos en tejidos de vertebrados son bien conocidas por los expertos en la técnica y se han citado anteriormente.

Un polinucleótido puede ser ARN. En una realización adecuada, el ARN está en forma de ARN mensajero (ARNm). Los métodos para introducir secuencias de ARN en células de vertebrados se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.580.859.

Los polinucleótidos, ácidos nucleicos y fragmentos de ácido nucleico pueden asociarse con ácidos nucleicos adicionales que codifican péptidos secretores o de señal, que dirigen la secreción de un polipéptido codificado por un ácido nucleico o polinucleótido descrito en el presente documento. De acuerdo con la hipótesis de señal, las proteínas secretadas por células de mamífero tienen un péptido de señal o una secuencia líder secretora que se escinde de la proteína madura una vez exportada en la cadena de la proteína en crecimiento a través del retículo endoplásmico rugoso una vez que se ha iniciado el crecimiento de la cadena del retículo endoplásmico rugoso. Los expertos en la técnica son conscientes de que los polipéptidos secretados por células de vertebrados generalmente tienen un péptido de señal fusionado al extremo N del polipéptido, que se escinde del polipéptido completo o de “longitud completa” para producir una forma secretada o “madura” del polipéptido. En determinadas realizaciones, se usa la secuencia líder nativa, o un derivado funcional de esa secuencia que conserva la capacidad de dirigir la

secreción del polipéptido que está asociado operativamente con el mismo. Como alternativa, puede usarse una secuencia líder de mamífero heterólogo o derivado funcional de la misma. Por ejemplo, la secuencia líder de tipo silvestre puede sustituirse por la secuencia líder de un activador de plasminógeno tisular humano (TPA) o  $\beta$ -glucuronidasa de ratón.

5 En el presente documento se describe un plásmido para la expresión de una secuencia codificante derivada de pp65 o derivada de gB del HCMV optimizada para la expresión en células de seres humanos para administrar a un humano para tratar o inmunizar. Las secuencias codificantes derivadas de HCMV adicionales, por ejemplo que codifican IE1, también pueden incluirse en el plásmido, o en un plásmido distinto, y expresarse, usando codones nativos o codones optimizados para la expresión en seres humanos para tratar o inmunizar. Cuando se administra  
10 dicho plásmido que codifica una o más secuencias HCMV optimizadas *in vivo* en un tejido del ser humano para tratar o inmunizar, la unidad transcripcional expresará de esta manera el uno o más productos génicos codificados. El nivel de expresión del producto o los productos génicos dependerá en un grado significativo de la fuerza del promotor asociado y la presencia y activación de un elemento potenciador asociado, así como la optimización de la región codificante.

15 Como se usa en el presente documento, el término “plásmido” se refiere a una construcción preparada de material genético (es decir ácido nucleico). Típicamente un plásmido contiene un origen de replicación que es funcional en células hospedadoras bacterianas, por ejemplo *Escherichia coli*, y marcadores de selección para detectar células bacterianas que comprenden el plásmido. Los plásmidos de la presente invención pueden incluir elementos genéticos como se describe en el presente documento dispuestos de tal manera que una secuencia codificante  
20 insertada pueda transcribirse y traducirse en células eucariotas. Además, aunque el plásmido puede incluir una secuencia a partir de un ácido nucleico viral, dicha secuencia viral normalmente no produce la incorporación del plásmido en una partícula viral y el plásmido es por lo tanto un vector no viral. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, un plásmido es una molécula de ADN circular cerrada.

El término “expresión” se refiere a la producción biológica de un producto codificado por una secuencia codificante.  
25 En la mayoría de los casos una secuencia de ADN, que incluye la secuencia codificante, se transcribe para formar un ARN mensajero (ARNm). El ARN mensajero se traduce para formar un producto polipeptídico que tiene una actividad biológica importante. Además, el proceso de expresión puede implicar etapas de procesamiento adicionales para el producto de ARN de transcripción, tal como corte y empalme para retirar intrones y/o procesamiento postraducciona de un producto polipeptídico.

30 Como se usa en el presente documento, el término “polipéptido” pretende incluir un “polipéptido” singular así como “polipéptidos” plurales y comprende cualquiera cadena o cadenas de dos o más aminoácidos. Por tanto, como se usa en el presente documento, los términos que incluyen, pero sin limitación “péptido”, “dipéptido”, “tripéptido”, “proteína”, “cadena de aminoácido” o cualquier otro término usado para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, se incluyen en las definiciones de un “polipéptido” y el término “polipéptido” puede usarse  
35 en lugar de o de manera indistinta con cualquiera de estos términos. El término incluye adicionalmente polipéptidos que se han sometido a modificaciones postraduccionales, por ejemplo glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos de bloqueo protectores conocidos, escisión proteolítica o modificación por aminoácidos de origen no natural.

También se incluyen como polipéptidos fragmentos, derivados, análogos o variantes de los anteriores polipéptidos y cualquier combinación de los mismos. Los polipéptidos y fragmentos, derivados, análogos o variantes de los mismos pueden ser polipéptidos antigénicos e inmunogénicos relacionados con polipéptidos HCMV, que se usan para impedir o tratar, es decir curar, mejorar, disminuir la gravedad o prevenir o reducir el contagio de enfermedades infecciosas causadas por HCMV.

40 Como se usa en el presente documento, un polipéptido antigénico o un polipéptido inmunogénico es un polipéptido que, cuando se introduce en un ser humano, reacciona con las moléculas del sistema inmunitario del ser humano, es decir, es antigénico y/o induce una respuesta inmunitaria en el ser humano, es decir, es inmunogénico. Es bastante probable que un polipéptido inmunogénico también sea antigénico, pero un polipéptido antigénico debido a su tamaño y conformación, puede no ser necesariamente inmunogénico. Como ejemplos de polipéptidos antigénicos e inmunogénicos se incluyen, pero sin limitación, pp65 del HCMV o fragmentos o variantes del mismo, por ejemplo  
45 pp65-delArg435-Lys468; gB o fragmentos del mismo, por ejemplo, que consiste en los aminoácidos 1-713 o variantes del mismo; e IE1 o fragmentos o variantes del mismo, por ejemplo ex4-IE1-delATP y derivados del mismo, por ejemplo cualquiera de los polipéptidos anteriores fusionados a un péptido de señal TPA.

El término “epítipo”, como se usa en el presente documento, se refiere a partes de un polipéptido que tiene actividad antigénica o inmunogénica en un animal, por ejemplo un mamífero, por ejemplo un ser humano. Un  
55 “epítipo inmunogénico” como se usa en el presente documento, se define como una parte de una proteína que suscita una respuesta inmunitaria en un animal según se determina mediante cualquier método conocido en la técnica. El término “epítipo antigénico” como se usa en el presente documento, se define como una parte de una proteína a la cual un anticuerpo puede unir inmunoespecíficamente su antígeno determinado por cualquier método bien conocido en la técnica. La unión inmunoespecífica excluye unión no específica pero no necesariamente excluye reactividad cruzada con otros antígenos. Los epítipos antigénicos no necesitan ser inmunogénicos.  
60

- En la presente invención, los epítomos antigénicos contienen preferentemente una secuencia de al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25 o entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 aminoácidos contenidos dentro de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de la invención. Determinados polipéptidos que comprenden epítomos inmunogénicos o antigénicos tienen una longitud de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 restos de aminoácidos. Los epítomos antigénicos así como los inmunogénicos pueden ser lineales, es decir, estar comprendidos de aminoácidos contiguos en un polipéptido, o pueden ser tridimensionales, es decir, en los que un epítopo está comprendido de aminoácidos no contiguo que se juntan debido a la estructura secundaria o terciaria del polipéptido formando de esta manera un epítopo.
- Con respecto a la selección de péptidos o polipéptidos que portan un epítopo antigénico (por ejemplo que contienen una región de una molécula de proteína a la que se puede unir un anticuerpo o receptor de linfocitos T), es bien conocido en la técnica que los péptidos sintéticos relativamente cortos que se asemejan a parte de una secuencia de proteína son rutinariamente capaces de suscitar un antisuero que reaccione con la proteína parcialmente imitada. Véase por ejemplo Sutcliffe, J. G., *et al*, *Science* 219: 660-666 (1983).
- Los péptidos capaces de suscitar suero reactivo contra la proteína se representan frecuentemente en la secuencia primaria de una proteína, pueden caracterizarse mediante un conjunto de simples reglas químicas y no están confinados a regiones inmunodominantes de proteínas intactas (es decir, epítomos inmunogénicos) ni en los extremos amino o carboxilo. Los péptidos que son extremadamente hidrófobos y aquellos de seis o menos restos generalmente son ineficaces induciendo anticuerpos que se unen a la proteína imitada; péptidos más grandes, especialmente aquellos que contienen restos de prolina, normalmente son ineficaces. Sutcliffe *et al*, citado anteriormente, en 661. Por ejemplo, 18 de 20 péptidos diseñados de acuerdo con estas directrices, que contienen 8-39 restos que cubren el 75% de la secuencia de la cadena polipeptídica HA1 de la hemaglutinina del virus de la gripe, induce anticuerpos que reaccionan con la proteína HA1 o virus intacto; y 12/12 péptidos de la polimerasa MuLV y 18/18 de la glucoproteína de la rabia inducen anticuerpos que precipitan las proteínas respectivas. Como ejemplo no limitante de polipéptidos antigénicos o péptidos de epítomos pp65, gB e IE1 del HCMV que se sabe que suscitan respuestas inmunitarias humorales o celulares se indican en la Tabla 1.

TABLA 1 Epítomos de reconocimiento inmunitario de proteínas pp65, gB e IE1 del HCMV

| Polipéptido HCMV | Posición                                                                                                                               | Referencia                                                                                                               |
|------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| gB               | aminoácidos 178-194<br>aminoácidos 190-204<br>aminoácidos 250-264<br>aminoácidos 420-434                                               | Liu, YN. <i>et al. J. Gen. Virol.</i> 74: 2207-14(1993)                                                                  |
| gB               | aminoácidos 67-86<br>aminoácidos 549-635<br>aminoácidos 570-579<br>aminoácidos 606-619                                                 | Ohlin, M. <i>et al. J. Virol.</i> 67: 703-10. (1993).                                                                    |
| gB               | aminoácidos 548-618                                                                                                                    | Navarro, D. <i>et al. J. Med. Virol.</i> 52: 451-9(1997)                                                                 |
| pp65             | aminoácidos 361-376<br>aminoácidos 485-499                                                                                             | Khattab BA. <i>et al. J. Med. Virol.</i> 52: 68-76(1997)                                                                 |
| pp65             | aminoácidos 495-503                                                                                                                    | Diamond, DJ. <i>et al. Blood</i> 90: 1751067 (1997)                                                                      |
| pp65             | aminoácidos 14-22<br>aminoácidos 120-128<br>aminoácidos 495-503                                                                        | Solache, A. <i>et al. J. Immunol.</i> 163: 5512-8 (1999)                                                                 |
| IE1 (UL123)      | aminoácidos 199-207<br>aminoácidos 279-287<br>aminoácidos 309-317<br>aminoácidos 315-323<br>aminoácidos 378-389<br>aminoácidos 379-387 | Khan, N. <i>et al. J. Inf. Dis.</i> 185 :000-000(2002);<br>Elkington, R. <i>et al. J. Virol.</i> 77(9): 5226-5240(2003). |

| Polipéptido HCMV | Posición                                                        | Referencia                                                                                                                    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| IE1 Clase II     | aminoácidos 91-110<br>aminoácidos 162-175<br>aminoácidos 96-115 | Davignon, J. <i>et al. J. Virol.</i> 70: 2162-2169(1996);<br>Gautier, N. <i>et al. Eur. J. Immunol.</i> 26(5): 1110-7 (1996). |

Los péptidos y polipéptidos portadores de epítomos antigénicos son por lo tanto útiles para suscitar anticuerpos, incluyendo anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido. Por tanto, una alta proporción de hibridomas obtenidos por fusión de células esplénicas de donantes inmunizados con un péptido portador de epítomo antigénico generalmente secretan anticuerpos reactivos con la proteína nativa. Sutcliffe *et al.*, citado anteriormente en 663. Los anticuerpos suscitados por los péptidos portadores de epítomos antigénicos o polipéptidos son útiles para detectar la proteína imitada y anticuerpos contra diferentes péptidos puede usarse para rastrear el destino de diversas regiones de un precursor de proteína que se somete a un procesamiento postraduccional. Los péptidos y anticuerpos antipéptidos pueden usarse en diversos ensayos cualitativos o cuantitativos para la proteína imitada por ejemplo en ensayos de competencia dado que se ha demostrado que incluso péptidos cortos (por ejemplo de aproximadamente 9 aminoácidos) pueden unirse y desplazar péptidos más grandes en ensayos de inmunoprecipitación. Véase, por ejemplo, Wilson, *et al.*, *Cell* 37: 767-778 (1984) at 777. Los anticuerpos antipéptidos de la invención también son útiles para la purificación de la proteína imitada, por ejemplo, mediante cromatografía de adsorción usando métodos bien conocidos en la técnica.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a polinucleótidos que comprenden ácidos nucleicos y fragmentos de los mismos que comprenden regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos de HCMV y en particular gB o pp65 del HCMV y fragmentos, variantes o derivados del mismo, en solitario o en combinación con secuencias codificantes derivadas de HCMV optimizadas por codones o no optimizadas por codones, por ejemplo IE1 (SEC ID N°: 19).

“Optimización de codones” se define como modificación de una secuencia de ácido nucleico para mejorar la expresión en las células del vertebrado de interés, por ejemplo ser humano, sustituyendo al menos uno, más de uno, o un número significativo de codones de la secuencia nativa con codones que son más frecuentemente o lo más frecuentemente usados en los genes de ese vertebrado. Diversas especies presentan sesgos particulares de determinados codones de un aminoácido particular.

La presente invención se refiere a polinucleótidos que comprenden fragmentos de ácido nucleico de regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos HCMV o fragmentos inmunogénicos de los mismos, con el uso de codón adaptado para optimizar la expresión en células humanas. Estos polinucleótidos se preparan incorporando codones preferidos para su uso en genes de seres humanos en la secuencia de ADN. También se proporcionan construcciones de expresión de polinucleótidos, vectores y células hospedadoras que comprenden fragmentos de ácido nucleico de regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos de HCMV y fragmentos, variantes o derivados de los mismos y diversos métodos de uso de las construcciones de expresión del polinucleótido, vectores, células hospedadoras para tratar o prevenir la enfermedad por HCMV en un ser humano.

Polinucleótidos que comprenden fragmentos de ácido nucleico de regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos de citomegalovirus no humanos o fragmentos, variantes o derivados de los mismos pueden optimizarse para la expresión en las células del vertebrado que puede infectarse por el citomegalovirus no humano usando los métodos descritos en el presente documento. Una lista parcial de citomegalovirus de vertebrados conocidos incluyen CMV murino (MCMV), CMV de hámster, CMV de cobaya, CMV de rata, CMV de conejo, CMV porcino, CMV bovino, CMV equino, CMV de macaco rhesus, CMV de mono verde Africano, CMV de chimpancé, así como otros (Staczek, J., *Am Soc Microbiol* 545: 247-265 (1990)). Por ejemplo, un gen MCMV podría optimizarse para expresar en células de ratón y un gen CMV equino podría optimizarse para la expresión en células de caballo.

#### Optimización por codones

Como se usa en el presente documento la expresión “región codificante optimizada por codones” significa una región codificante de ácido nucleico que se ha adaptado para la expresión en las células de un vertebrado determinado sustituyendo al menos uno, o más de uno, o un número significativo de codones con uno o más codones que se usan más frecuentemente en los genes de ese vertebrado.

Las desviaciones en la secuencia de nucleótidos que comprende los codones que codifican los aminoácidos de cualquier cadena polipeptídica permite variaciones en la secuencia codificante para el gen. Dado que cada codón consiste en tres nucleótidos, y los nucleótidos que comprenden ADN están limitados a cuatro bases específicas, existen 64 posibles combinaciones de nucleótidos, 61 de las cuales codifican aminoácidos (los restantes tres codones codifican señales de terminación de la traducción). El “código genético” que muestra qué codones codifican qué aminoácidos se reproduce en el presente documento como Tabla 2. Como resultado, muchos aminoácidos se

designan por más de un codón. Por ejemplo, los aminoácidos alanina y prolina se codifican por cuatro tripletes, serina y arginina por seis, mientras que triptófano y metionina se codifican solo por un triplete. Esta degeneración permite que la composición de bases del ADN varíe sobre una amplia diversidad sin modificar la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por el ADN.

5

TABLA 2: El código genético convencional

|   | T                                            | C                                      | A                                            | G                                            |
|---|----------------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| T | TTT Phe (F)<br>TTC “<br>TTA Leu (L)<br>TTG “ | TCT Ser (S)<br>TCC “<br>TCA “<br>TCG “ | TAT Tyr (Y)<br>TAC “<br>TAA Ter<br>TAG Ter   | TGT Cys (C)<br>TGC<br>TGA Ter<br>TGG Trp (W) |
| C | CTT Leu (L)<br>CTC “<br>CTA “<br>CTG “       | CCT Pro (P)<br>CCC “<br>CCA “<br>CCG “ | CAT His (H)<br>CAC “<br>CAA Gln (Q)<br>CAG “ | CGT Arg (R)<br>CGC “<br>CGA “<br>CGG “       |
| A | ATT Ile (I)<br>ATC “<br>ATA “<br>ATG Met (M) | ACT Thr (T)<br>ACC “<br>ACA “<br>ACG “ | AAT Asn (N)<br>AAC “<br>AAA Lys (K)<br>AAG “ | AGT Ser (S)<br>AGC “<br>AGA Arg (R)<br>AGG “ |
| G | GTT Val (V)<br>GTC “<br>GTA “<br>GTG “       | GCT Ala (A)<br>GCC “<br>GCA “<br>GCG “ | GAT Asp (D)<br>GAC “<br>GAA Glu (E)<br>GAG “ | GGT Gly (G)<br>GGC “<br>GGA “<br>GGG “       |

Muchos organismos presentan un sesgo para su uso de particulares codones para codificar la inserción de un aminoácido particular en una cadena peptídica en crecimiento. La preferencia de codones o sesgo de codón, diferencias en uso de codón entre organismos, se consigue por la degeneración del código genético y está bien documentada entre muchos organismos. El sesgo de codones a menudo se correlaciona con la eficacia de la traducción del ARN mensajero (ARNm), que a su vez se piensa que es dependiente de, entre otros, las propiedades de los codones a traducir y de la disponibilidad de las moléculas de ARN de transferencia particular (ARNt). La predominancia de los ARNt seleccionados en una célula es generalmente un reflejo de los codones usados más frecuentemente en la síntesis peptídica. Por consiguiente, los genes pueden diseñarse para la expresión génica óptima en un organismo determinado basándose en la optimización por codones.

Dada la gran cantidad de secuencias génicas disponibles para una amplia diversidad de especies animales, vegetales y microbianas, es posible calcular la frecuencia relativa del uso de codones. Se encuentran disponibles fácilmente tablas de uso de codones por ejemplo en la “Base de Datos de Uso de Codones” disponible en <http://www.kazusa.or.jp/codon/> (visitada el 9 de julio del 2002) y estas tablas pueden adaptarse de diversas maneras. Véase Nakamura, Y., *et al.* “Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000” *Nucl. Acids Res.* 28: 292 (2000). La tabla de uso de codón para el ser humano, calculada de la GenBank Release 128.0 [15 de febrero del 2002], se reproduce más abajo en la Tabla 3. Estas tablas usan nomenclatura de ARNm y por eso en lugar de timina (T) que se encuentra en el ADN, las tablas usan uracilo (U) que se encuentra en el ARN. Las tablas se han adaptado de tal manera que se calculan frecuencias para cada aminoácido en lugar de para los 64 codones. Por comparación, en la tabla de uso de codones para el citomegalovirus humano se reproduce a continuación como Tabla 4.

## ES 2 429 338 T3

TABLA 3: Tabla de Uso de Codones para los Genes Humanos (*Homo sapiens*)

| Aminoácido | Codón | Número  | Frecuencia |
|------------|-------|---------|------------|
| Phe        | UUU   | 326146  | 0,4525     |
| Phe        | UUC   | 394680  | 0,5475     |
| Total      |       | 720826  |            |
|            |       |         |            |
| Leu        | UUA   | 139249  | 0,0728     |
| Leu        | UUG   | 242151  | 0,1266     |
| Leu        | CUU   | 246206  | 0,1287     |
| Leu        | CUC   | 374262  | 0,1956     |
| Leu        | CUA   | 133980  | 0,0700     |
| Leu        | CUG   | 777077  | 0,4062     |
| Total      |       | 1912925 |            |
|            |       |         |            |
| Ile        | AUU   | 303721  | 0,3554     |
| Ile        | AUC   | 414483  | 0,4850     |
| Ile        | AUA   | 136399  | 0,1596     |
| Total      |       | 854603  |            |
|            |       |         |            |
| Met        | AUG   | 430946  | 1,0000     |
| Total      |       | 430946  |            |
|            |       |         |            |
| Val        | GUU   | 210423  | 0,1773     |
| Val        | GUC   | 282445  | 0,2380     |
| Val        | GUA   | 134991  | 0,1137     |
| Val        | GUG   | 559044  | 0,4710     |
| Total      |       | 1186903 |            |
|            |       |         |            |
| Ser        | UCU   | 282407  | 0,1840     |
| Ser        | UCC   | 336349  | 0,2191     |
| Ser        | UCA   | 225963  | 0,1472     |
| Ser        | UCG   | 86761   | 0,0565     |
| Ser        | AGU   | 230047  | 0,1499     |
| Ser        | AGC   | 373362  | 0,2433     |
| Total      |       | 1534889 |            |
|            |       |         |            |
| Pro        | CCU   | 333705  | 0,2834     |
| Pro        | CCC   | 386462  | 0,3281     |
| Pro        | CCA   | 322220  | 0,2736     |
| Pro        | CCG   | 135317  | 0,1149     |
| Total      |       | 1177704 |            |
|            |       |         |            |
| Thr        | ACU   | 247913  | 0,2419     |
| Thr        | ACC   | 371420  | 0,3624     |
| Thr        | ACÁ   | 285655  | 0,2787     |
| Thr        | ACG   | 120022  | 0,1171     |
| Total      |       | 1025010 |            |
|            |       |         |            |
| Ala        | GCU   | 360146  | 0,2637     |
| Ala        | GCC   | 551452  | 0,4037     |
| Ala        | GCA   | 308034  | 0,2255     |

# ES 2 429 338 T3

| Aminoácido | Codón | Número  | Frecuencia |
|------------|-------|---------|------------|
| Ala        | GCG   | 146233  | 0,1071     |
| Total      |       | 1365865 |            |
|            |       |         |            |
| Tyr        | UAU   | 232240  | 0,4347     |
| Tyr        | UAC   | 301978. | 0,5653     |
| Total      |       | 534218  |            |
|            |       |         |            |
| His        | CAU   | 201389  | 0,4113     |
| His        | CAC   | 288200  | 0,5887     |
| Total      |       | 489589  |            |
|            |       |         |            |
| Gln        | CAA   | 227742  | 0,2541     |
| Gln        | CAG   | 668391  | 0,7459     |
| Total      |       | 896133  |            |
|            |       |         |            |
| Asn        | AAU   | 322271  | 0,4614     |
| Asn        | AAC   | 376210  | 0,5386     |
| Total      |       | 698481  |            |
|            |       |         |            |
| Lys        | AAA   | 462660  | 0,4212     |
| Lys        | AAG   | 635755  | 0,5788     |
| Total      |       | 1098415 |            |
|            |       |         |            |
| Asp        | GAU   | 430744  | 0,4613     |
| Asp        | GAC   | 502940  | 0,5387     |
| Total      |       | 933684  |            |
|            |       |         |            |
| Glu        | GAA   | 561277  | 0,4161     |
| Glu        | GAG   | 787712  | 0,5839     |
| Total      |       | 1348989 |            |
|            |       |         |            |
| Cys        | UGU   | 190962  | 0,4468     |
| Cys        | UGC   | 236400  | 0,5532     |
| Total      |       | 427362  |            |
|            |       |         |            |
| Trp        | UGG   | 248083  | 1,0000     |
| Total      |       | 248083  |            |
|            |       |         |            |
| Arg        | CGU   | 90899   | 0,0830     |
| Arg        | CGC   | 210931  | 0,1927     |
| Arg        | CGA   | 122555  | 0,1120     |
| Arg        | CGG   | 228970  | 0,2092     |
| Arg        | AGA   | 221221  | 0,2021     |
| Arg        | AGG   | 220119  | 0,2011     |
| Total      |       | 1094695 |            |
|            |       |         |            |
| Gly        | GGU   | 209450  | 0,1632     |
| Gly        | GGC   | 441320  | 0,3438     |
| Gly        | GGA   | 315726  | 0,2459     |
| Gly        | GGG   | 317263  | 0,2471     |

## ES 2 429 338 T3

| Aminoácido | Codón | Número  | Frecuencia |
|------------|-------|---------|------------|
| Total      |       | 1283759 |            |
| Stop       | UAA   | 13963   |            |
| Stop       | UAG   | 10631   |            |
| Stop       | UGA   | 24607   |            |

TABLA 4: Tabla de Uso de Codones para Citomegalovirus Humano (herpesvirus humano 5)

| Aminoácido | Codón | Número | Frecuencia |
|------------|-------|--------|------------|
| Phe        | UUU   | 5435   | 0,5456     |
| Phe        | UUC   | 4527   | 0,4544     |
| Total      |       | 9962   |            |
| Leu        | UUA   | 1191   | 0,0510     |
| Leu        | UUG   | 3683   | 0,1578     |
| Leu        | CUU   | 2162   | 0,0926     |
| Leu        | CUC   | 5473   | 0,2344     |
| Leu        | CUA   | 1771   | 0,0759     |
| Leu        | CUG   | 9066   | 0,3883     |
| Total      |       | 23346  |            |
| He         | AUU   | 2452   | 0,2538     |
| Ile        | AUC   | 6135   | 0,6350     |
| He         | AUA   | 1075   | 0,1113     |
| Total      |       | 9662   |            |
| Met        | AUG   | 5051   | 1,0000     |
| Total      |       | 430946 |            |
| Val        | GUU   | 2271   | 0,1167     |
| Val        | GUC   | 5082   | 0,2611     |
| Val        | GUA   | 2570   | 0,1320     |
| Val        | GUG   | 9541   | 0,4902     |
| Total      |       | 19464  |            |
| Ser        | UCU   | 2350   | 0,1234     |
| Ser        | UCC   | 3911   | 0,2054     |
| Ser        | UCA   | 1296   | 0,0681     |
| Ser        | UCG   | 4876   | 0,2561     |
| Ser        | AGU   | 1927   | 0,1012     |
| Ser        | AGC   | 4677   | 0,2457     |
| Total      |       | 19037  |            |
| Pro        | CCU   | 1817   | 0,1439     |
| Pro        | CCC   | 4425   | 0,3506     |
| Pro        | CCA   | 1391   | 0,1102     |
| Pro        | CCG   | 4990   | 0,3953     |
| Total      |       | 12623  |            |

# ES 2 429 338 T3

| Aminoácido | Codón | Número | Frecuencia |
|------------|-------|--------|------------|
| Thr        | ACU   | 2156   | 0,1368     |
| Thr        | ACC   | 5648   | 0,3584     |
| Thr        | ACÁ   | 1782   | 0,1131     |
| Thr        | ACG   | 6173   | 0,3917     |
| Total      |       | 15759  |            |
|            |       |        |            |
| Ala        | GCU   | 2559   | 0,1491     |
| Ala        | GCC   | 8013   | 0,4668     |
| Ala        | GCA   | 1386   | 0,0807     |
| Ala        | GCG   | 5209   | 0,3034     |
| Total      |       | 17167  |            |
|            |       |        |            |
| Tyr        | UAU   | 2321   | 0,2629     |
| Tyr        | UAC   | 6509   | 0,7371     |
| Total      |       | 8830   |            |
|            |       |        |            |
| His        | CAU   | 1906   | 0,2753     |
| His        | CAC   | 5018   | 0,7247     |
| Total      |       | 6924   |            |
|            |       |        |            |
| Gln        | CAÁ   | 2894   | 0,3398     |
| Gln        | CAG   | 5623   | 0,6602     |
| Total      |       | 8517   |            |
|            |       |        |            |
| Asn        | AAU   | 2268   | 0,2892     |
| Asn        | AAC   | 5574   | 0,7108     |
| Total      |       | 7842   |            |
|            |       |        |            |
| Lys        | AAA   | 3313   | 0,4408     |
| Lys        | AAG   | 4203   | 0,5592     |
| Total      |       | 7516   |            |
|            |       |        |            |
| Asp        | GAU   | 3514   | 0,3023     |
| Asp        | GAC   | 8110   | 0,6977     |
| Total      |       | 11624  |            |
|            |       |        |            |
| Glu        | GAA   | 4310   | 0,3684     |
| Glu        | GAG   | 7390   | 0,6316     |
| Total      |       | 11700  |            |
|            |       |        |            |
| Cys        | UGU   | 3059   | 0,4265     |
| Cys        | UGC   | 4113   | 0,5735     |
| Total      |       | 7172   |            |
|            |       |        |            |
| Trp        | UGG   | 2797   | 1,0000     |
| Total      |       | 2797   |            |
|            |       |        |            |
| Arg        | CGU   | 3747   | 0,2186     |
| Arg        | CGC   | 6349   | 0,3703     |

| Aminoácido | Codón | Número | Frecuencia |
|------------|-------|--------|------------|
| Arg        | CGA   | 1826   | 0,1065     |
| Arg        | CGG   | 3285   | 0,1916     |
| Arg        | AGA   | 1185   | 0,0691     |
| Arg        | AGG   | 752    | 0,0439     |
| Total      |       | 17144  |            |
|            |       |        |            |
| Gly        | GGU   | 3521   | 0,2430     |
| Gly        | GGC   | 6952   | 0,4797     |
| Gly        | GGA   | 1885   | 0,1301     |
| Gly        | GGG   | 2133   | 0,1472     |
| Total      |       | 14491  |            |
|            |       |        |            |
| Stop       | UAA   | 310    |            |
| Stop       | UAG   | 69     |            |
| Stop       | UGA   | 234    |            |

Utilizando estas tablas o similares, un experto en la técnica puede aplicar las frecuencias con respecto a cualquier secuencia polipeptídica determinada y producir un fragmento de ácido nucleico de una región codificante optimizada por codones que codifica el polipéptido, pero que usa codones más óptimos para una especie determinada. Las regiones codificantes optimizadas por codones pueden diseñarse mediante diversos métodos diferentes.

En un método, denominado “optimización uniforme”, se usa una tabla de uso de codones para encontrar el codón más frecuente usado para cualquiera aminoácido determinado y ese codón se usa cada vez que ese aminoácido particular aparece en la secuencia polipeptídica. Por ejemplo, en lo que respecta a la Tabla 3 anterior, para la leucina, el codón más frecuente es CUG, que se usa el 41% de las veces. Por tanto todos los restos de leucina en una secuencia de aminoácidos determinada deben tener asignado el codón CUG. Las secuencias de nucleótidos optimizadas por codones “uniformes” humanas que codifican la pp65 nativa de la cepa AD169 del HCMV (SEC ID N°: 2) (Figura 1) y la gB de longitud completa de la cepa AD169 (SEC ID N°: 12) (Figura 4) se presenta en el presente documento como SEC ID N°: 7 y SEC ID N°: 15, respectivamente.

En otro método, denominado “optimización completa” las frecuencias reales de los codones se distribuyen al azar a través de la región codificante. Por tanto, usando este método para optimización, si una supuesta secuencia polipeptídica tiene 100 restos de leucina, con respecto a la Tabla 3 para la frecuencia de uso en los seres humanos, aproximadamente 7 o el 7% de los codones de leucina serían UUA, aproximadamente 13 o el 13% de los codones de leucina serían UUG, aproximadamente el 13 o el 13% de los codones de leucina serían CUU, aproximadamente 20 o 20% de los codones de leucina serían CUC, aproximadamente 7 o el 7% de los codones de leucina serían CUA y aproximadamente 41, o el 41% de los codones de leucina serían CUG. Estas frecuencias se distribuirían al azar a través de los codones de leucina en la región codificante que codifica el polipéptido hipotético. Se entenderá por un experto en la técnica que la distribución de codones en la secuencia puede variar significativamente usando este método, sin embargo, la secuencia siempre codifica el mismo polipéptido. Tres secuencias nucleotídicas optimizadas por codones humanos diferentes codifican la pp65 nativa (SEC ID N°: 2) que se han optimizado usando este método se presentan en el presente documento como SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10. Tres secuencias optimizadas por codones humanos que codifican la gB nativa (SEC ID N°: 12) que se ha optimizado por completo usando este método se presentan en el presente documento como SEC ID N°: 16, SEC ID N°: 17 y SEC ID N°: 18, respectivamente.

Usando el método de “optimización completa”, una secuencia polipeptídica entera o fragmento, variante o derivado de la misma se optimiza por codones mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Se diseñan diversos fragmentos deseados, variantes o derivados y cada uno se optimiza por codones individualmente después. Como alternativa, una secuencia polipeptídica de longitud completa se optimiza por codones para una especie determinada dando como resultado una región codificante optimizada por codones que codifica todo el polipéptido y después los fragmentos de ácido nucleico de la región codificante optimizada por codones, que codifica fragmentos, variantes y derivados del polipéptido se fabrican a partir de la región codificante optimizada por codones original. Como entenderá un experto habitual en la técnica, si los codones se han asignado al azar con respecto a la región codificante de longitud completa basándose en su frecuencia de uso en una especie determinada, los fragmentos de ácido nucleico que codifican fragmentos, variantes y derivados no necesariamente se optimizarían por codones completamente para la especie determinada. Sin embargo, dichas secuencias son aún mucho más cercanas al uso de codón de las especies deseadas que el uso de codón nativo. La ventaja de esta estrategia es que sintetizar fragmentos de ácido nucleico optimizado por codones que codifican cada fragmento, variante y

derivado de un polipéptido determinado, aunque es rutinario, lleva tiempo y dará como resultado un gasto significativo.

Cuando se usa el método de “optimización completa”, el término “aproximadamente” se usa precisamente para representar porcentajes fraccionales de frecuencias de codón para un aminoácido determinado. Como se usa en el presente documento, aproximadamente se define como un aminoácido más o un aminoácido menos del valor determinado. El valor del número completo de aminoácidos se redondea sin la frecuencia fraccional de uso es 0,50 o mayor y se redondea hacia abajo si la frecuencia fraccional de uso es 0,49 o menor. Usando de nuevo el ejemplo de la frecuencia de uso de leucina en los genes humanos para un supuesto polipéptido que tiene 62 restos de leucina, la frecuencia fraccional del uso de codón se calcularía multiplicando 62 por las frecuencias de los diversos codones. Por tanto, 7,28 por ciento de 62 igual a 4,51 UUA, o “aproximadamente 5” es decir 4, 5 o 6 codones UUA, 12,66 por ciento de 62 igual a 7,85 codones UUG o “aproximadamente 8”, es decir 7, 8 o 9 codones UUG, 12,87 por ciento de 62 igual a 7,98 codones CUU, o “aproximadamente 8”, es decir 7, 8 o 9 codones CUU, 19,56 por ciento de 62 igual a 12,13 codones CUC o “aproximadamente 12”, es decir 11, 12 o 13 codones CUC, 7,00 por ciento de 62 igual a 4,34 codones CUA o “aproximadamente 4”, es decir 3, 4 o 5 codones CUA y 40,62 por ciento de 62 igual a 25,19 codones CUG o “aproximadamente 25”, es decir 24, 25 y 26 codones de CUG.

En un tercer método denominado “optimización mínima”, las regiones codificantes solamente se optimizan parcialmente. Por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico de una región codificante optimizada por codones puede codificar un polipéptido en el que al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de las posiciones de codones se han optimizado por codones para una especie determinada. Es decir, contienen un codón que se usa preferentemente en los genes de una especie deseada, por ejemplo, una especie de vertebrados, por ejemplo, seres humanos, en lugar de un codón que normalmente se usa en la secuencia de ácido nucleico nativa. Los codones que se encuentran raramente en genes humanos se cambian por codones más normalmente utilizados en regiones codificantes humanas. Para ilustrar este método, en la Tabla 5 se presenta un cuadro comparativo que muestra el uso de codón por miles de regiones codificantes humanas y HCMV. Los datos se expresan como el número de veces que se usa un determinado codón por 1000 codones. Por ejemplo, los codones marcados con asteriscos en la Tabla 5 para alanina, arginina, prolina, serina y treonina se usan frecuentemente en el genoma del HCMV, pero menos frecuentemente se usa en genes humanos. Comenzando con la región codificante nativa del gen HCMV de interés, uno o más codones que son infrecuentemente usados pueden cambiarse por codones humanos más normalmente usados sustituyendo uno de los codones más frecuentemente usados en genes humanos. De acuerdo con este método, estos codones HCMV que se usan a la misma o mayor frecuencia en genes humanos en comparación con genes HCMV se dejan sin cambios.

TABLA 5: Tabla de Uso de Codones para Genes Humanos y HCMV

| Aminoácido |   | Codón | Humano | HCMV |
|------------|---|-------|--------|------|
| Ala        | A | GCA   | 16     | 6    |
| *          |   | GCG   | 8      | 22   |
|            |   | GCC   | 19     | 34   |
|            |   | GCT   | 19     | 11   |
| Arg        | R | AGA   | 12     | 5    |
|            |   | AGG   | 11     | 3    |
|            |   | CGA   | 6      | 8    |
|            |   | CGG   | 12     | 14   |
|            |   | CGC   | 11     | 27   |
| *          |   | CGT   | 5      | 16   |
| Asn        | N | AAC   | 20     | 24   |
|            |   | AAT   | 17     | 10   |
| Asp        | D | GAC   | 26     | 34   |
|            |   | GAT   | 22     | 15   |
| Cys        | C | TGC   | 12     | 17   |
|            |   | TGT   | 10     | 13   |
| Gln        | Q | CAA   | 12     | 12   |
|            |   | CAG   | 35     | 24   |
| Glu        | E | GAA   | 30     | 18   |
|            |   | GAG   | 40     | 31   |
| Gly        | G | GGA   | 16     | 8    |
|            |   | GGG   | 16     | 9    |

| Aminoácido |   | Codón | Humano | HCMV |
|------------|---|-------|--------|------|
|            |   | GGC   | 23     | 29   |
|            |   | GGT   | 11     | 15   |
| His        | H | CAC   | 15     | 21   |
|            |   | CAT   | 11     | 8    |
| De         | I | ATA   | 7      | 5    |
|            |   | ATC   | 22     | 26   |
|            |   | ATT   | 16     | 10   |
| Leu        | L | CTA   | 7      | 8    |
|            |   | CTG   | 40     | 38   |
|            |   | CTC   | 20     | 23   |
|            |   | CTT   | 13     | 9    |
|            |   | TTA   | 7      | 5    |
|            |   | TTG   | 13     | 16   |
| Lys        | K | AAA   | 24     | 14   |
|            |   | AAG   | 33     | 18   |
| Met        | M | ATG   | 22     | 21   |
| Phe        | F | TTC   | 21     | 19   |
|            |   | TTT   | 17     | 23   |
| Pro        | P | CCA   | 17     | 6    |
| *          |   | CCG   | 7      | 21   |
|            |   | CCC   | 20     | 19   |
|            |   | CCT   | 17     | 8    |
| Ser        | S | AGC   | 19     | 20   |
|            |   | AGT   | 12     | 8    |
|            |   | TCA   | 12     | 6    |
| *          |   | TCG   | 5      | 21   |
|            |   | TCC   | 18     | 17   |
|            |   | TCT   | 15     | 10   |
| Thr        | T | ACA   | 15     | 8    |
| *          |   | ACG   | 6      | 26   |
|            |   | ACC   | 19     | 24   |
|            |   | ACT   | 13     | 9    |
| Trp        | W | TGG   | 13     | 12   |
| Tyr        | Y | TAC   | 16     | 27   |
|            |   | TAT   | 12     | 10   |
| Val        | V | GTA   | 7      | 11   |
|            |   | GTG   | 29     | 40   |
|            |   | GTC   | 15     | 21   |
|            |   | GTT   | 11     | 10   |
| Term       |   | TAA   | 1      | 1    |
|            |   | TAG   | 0,5    | 0    |
|            |   | TGA   | 1      | 1    |

Por tanto, los codones que se usan más frecuentemente en el genoma HCMV que en los genes humanos se sustituyen con los codones humanos más frecuentemente usados. La diferencia de frecuencia en la cual los codones HCMV se sustituyen puede variar basándose en diversos factores como se indica más adelante. Por ejemplo, los codones usados al menos dos veces más por mil en genes HCMV en comparación con los genes humanos se sustituyen por el codón humano más frecuentemente usado para ese aminoácido. Esta proporción debe ajustarse más o menos dependiendo de diversos factores tales como los analizados a continuación. Por consiguiente, un codón en una región codificante nativa HCMV se sustituiría con el codón usado más frecuentemente para el aminoácido en regiones codificantes humanas si el codón se usa 1,1 veces, 1,2 veces, 1,3 veces, 1,4 veces, 1,5 veces, 1,6 veces, 1,7 veces, 1,8 veces, 1,9 veces, 2,0 veces, 2,1 veces, 2,2 veces, 2,3 veces,

2,4 veces, 2,5 veces, 2,6 veces, 2,7 veces, 2,8 veces, 2,9 veces, 3,0 veces, 3,1 veces, 3,2 veces, 3,3, veces, 3,4 veces, 3,5 veces, 3,6 veces, 3,7 veces, 3,8 veces, 3,9 veces, 4,0 veces, 4,1 veces, 4,2 veces, 4,3 veces, 4,4 veces, 4,5 veces, 4,6 veces, 4,7 veces, 4,8 veces, 4,9 veces, 5,0 veces, 5,5 veces, 6,0 veces, 6,5 veces, 7,0 veces, 7,5 veces, 8,0 veces, 8,5 veces, 9,0 veces, 9,5 veces, 10,0 veces, 10,5 veces, 11,0 veces, 11,5 veces, 12,0 veces, 12,5 veces, 13,0 veces, 13,5 veces, 14,0 veces, 14,5 veces, 15,0 veces, 15,5 veces, 16,0 veces, 16,5 veces, 17,0 veces, 17,5 veces, 18,0 veces, 18,5 veces, 19,0 veces, 19,5 veces, 20 veces, 21 veces, 22 veces, 23 veces, 24 veces, 25 veces o más, más frecuentemente en regiones codificantes HCMV que en regiones codificantes humanas.

Esta optimización por codones humanos mínima para codones altamente variantes tiene diversas ventajas que incluyen pero sin limitación los siguientes ejemplos. Dado que se realizan pocos cambios en la secuencia de nucleótidos del gen de interés, se requieren pocas manipulaciones, lo que conduce a un riesgo reducido de introducir mutaciones no deseadas y un menor coste, así como permitir el uso de kits de mutagénesis dirigida disponibles en el mercado, reduciendo la necesidad de síntesis de oligonucleótidos caros. Además, la disminución del número de cambios en la secuencia de nucleótidos disminuye la posibilidad de modificar la estructura secundaria de la secuencia que puede tener un impacto significativo sobre la expresión de genes en determinadas células hospedadoras. La introducción de sitios de reacción no deseados también se reduce, facilitando la subclonación de los genes de interés en el vector de expresión plasmídico.

La asignación de codones al azar en una frecuencia optimizada para codificar una secuencia polipeptídica determinada puede realizarse manualmente calculando frecuencias de codón para cada aminoácido y después asignando los codones a la secuencia polipeptídica al azar. Adicionalmente, se dispone de diversos algoritmos y programas informáticos fácilmente disponibles por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la función "EditSeq" en el Paquete Informático Lasergene, disponible de DNASTar, Inc., Madison, WI, la función de retrotraducción en el conjunto VectorNTI disponible de InforMax, Inc., Bethesda, MD y la función "retrotraducción" en el paquete informático GCG-Wisconsin, disponible de Accelrys, Inc., San Diego, CA. Además, se encuentran disponibles al público diversos recursos para secuencias de regiones codificantes optimizadas por codones. Por ejemplo, la función "retrotraducción" en la página web <http://www.entelechon.com/eng/backtranslation.html> (visitada el 9 de julio, 2002), la función "retrotradseq" disponible en la página web <http://bioinfo.pbi.nrc.ca:8090/EMBOSS/index.html> (visitada el 15 de octubre, 2002). La construcción de un algoritmo rudimentario para asignar codones basándose en una frecuencia determinada también puede realizarse fácilmente con funciones matemáticas esenciales por un experto habitual en la técnica.

Diversas opciones se encuentran disponibles para sintetizar regiones codificantes optimizadas por codones diseñadas mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente, usando manipulaciones biológicas moleculares rutinarias y convencionales bien conocidas por los expertos habituales en la técnica. En una estrategia, una serie de pares de oligonucleótidos de 80-90 nucleótidos cada uno de longitud y que abarcan la longitud de la secuencia deseada se sintetizan mediante métodos convencionales. Estos pares de oligonucleótidos se sintetizan de tal manera que, después de hibridarse, forman fragmentos bicatenarios de 80-90 pares de bases, que contienen extremos cohesivos, por ejemplo cada oligonucleótido en el par se sintetiza para extenderse 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más bases más allá de la región que es complementaria con el otro oligonucleótido en el par. Los extremos monocatenarios de cada par de nucleótidos se diseñan para hibridarse con el extremo monocatenario de otro par de oligonucleótidos. Se permite que los pares de oligonucleótidos hibriden, y aproximadamente de cinco a seis de estos fragmentos bicatenarios se dejan después hibridar entre sí mediante extremos monocatenarios cohesivos y después se ligan entre sí y se clonan en un vector de clonación bacteriano convencional, por ejemplo, un vector TOPO® disponible de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA. La construcción se secuencía después mediante métodos convencionales. Se preparan diversas de estas construcciones que consisten en 5 a 6 fragmentos de fragmentos de 80 a 90 pares de bases ligados entre sí, es decir, fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases de tal manera que toda la secuencia deseada se representa en una serie de construcciones plasmídicas. Los insertos de estos plásmidos se cortan después con enzimas de restricción apropiadas y se ligan entre sí para formar la construcción final. Después la construcción final se clona en un vector de clonación bacteriano convencional y se secuencía. Métodos adicionales serían inmediatamente obvios para un experto en la técnica. Además, la síntesis de genes se encuentra fácilmente disponible en el mercado.

Las regiones codificantes optimizadas por codones pueden ser versiones que codifican cualquiera de los productos génicos de cualquier cepa de HCMV o fragmentos, variantes o derivados de dichos productos génicos. En el presente documento se describen fragmentos de ácido nucleico de regiones codificantes optimizadas por codones que codifican el polipéptido pp65 de HCMV y el polipéptido de la glucoproteína B (gB) del HCMV, los fragmentos de ácido nucleico que codifican el péptido completo, así como diversos fragmentos, variantes y derivados de los mismos, aunque no se excluyen otras fuentes de ácidos nucleicos que codifican pp65 o gB. Las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican otros polipéptidos de HCMV (por ejemplo IE1) o fragmentos, variantes y derivados de los mismos se incluyen dentro de la presente invención. Además, también pueden incluirse polinucleótidos no optimizados por codones que codifican polipéptidos de HCMV.

La presente invención se refiere a composiciones para potenciar la respuesta inmunitaria en un ser humano que necesita protección contra infección por HCMV administrado *in vivo*, en un tejido de un ser humano, un polinucleótido que comprende una región codificante optimizada por codones que codifica un polipéptido de HCMV,

o un fragmento de ácido nucleico de dicha región codificante que codifica un fragmento, variante o derivados de los mismos. La optimización por codones se realiza mediante métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en determinadas realizaciones, las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos de HCMV o fragmentos de ácido nucleico de dichas regiones codificantes que codifican fragmentos, variantes o derivados de los mismos se optimizan de acuerdo con el uso de codones humanos. Los polinucleótidos se incorporan en las células del ser humano *in vivo* y se produce una cantidad inmunológicamente eficaz de un polipéptido HCMV *in vivo*.

En particular, la presente invención se refiere a polipéptidos que codifican regiones codificantes optimizadas por codones de HCMV, o fragmentos de ácido nucleico de dichos fragmentos de regiones codificantes, variantes o derivados de los mismos que se han optimizado de acuerdo con el uso de codones humanos. Por ejemplo, las regiones codificantes optimizadas por codones humanos que codifican polipéptidos de HCMV o fragmentos de ácido nucleico de dichas regiones codificantes que codifican fragmentos, variantes o derivados de los mismos se preparan sustituyendo uno o más codones preferidos para su uso en genes humanos para los codones naturalmente usados en la secuencia de ADN que codifica el polipéptido HCMV. También se proporcionan polinucleótidos, vectores y otras construcciones de expresión que comprenden las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos de HCMV o fragmentos de ácido nucleico de dichas regiones codificantes que codifican fragmentos, variantes o derivados de los mismos, y diversos métodos de uso de dichos polinucleótidos, vectores y otras construcciones de expresión. Las regiones codificantes que codifican polipéptidos de HCMV pueden optimizarse uniformemente, optimizarse completamente u optimizarse mínimamente como se describe en el presente documento.

La presente invención se refiere adicionalmente a polinucleótidos que comprenden regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos de antígenos de HCMV, por ejemplo pp65, gB, de HCMV y opcionalmente junto con otros antígenos de HCMV, por ejemplo IE1. La invención también se refiere a polinucleótidos que comprenden fragmentos de ácido nucleico optimizados por codones que codifican fragmentos, variantes y derivados de estos polipéptidos.

También se describen polinucleótidos aislados que comprenden regiones codificantes optimizadas por codones de pp65 de HCMV, fragmentos, variantes o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, una región codificante optimizada por codones que codifica la SEC ID N°: 2 se optimiza de acuerdo con el uso de codones en seres humanos (*Homo sapiens*).

Las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican la SEC ID N°: 2, completamente optimizadas de acuerdo con el uso de codones en seres humanos se diseñan de la siguiente manera. La composición de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6 Composición de Aminoácidos de la pp65 del HCMV de Tipo Silvestre de la cepa AD169 (SEC ID N°: 2).

| Aminoácido |     | Número en la SEC ID N°: 2 |
|------------|-----|---------------------------|
| A          | Ala | 38                        |
| R          | Arg | 36                        |
| C          | Cys | 10                        |
| G          | Gly | 36                        |
| H          | His | 24                        |
| I          | Ile | 25                        |
| L          | Leu | 41                        |
| K          | Lys | 22                        |
| M          | Met | 16                        |
| F          | Phe | 19                        |
| P          | Pro | 38                        |
| S          | Ser | 41                        |
| T          | Thr | 37                        |
| W          | Trp | 9                         |
| Y          | Tyr | 15                        |
| V          | Val | 44                        |
| N          | Asn | 18                        |
| D          | Asp | 28                        |
| Q          | Gln | 31                        |
| E          | Glu | 33                        |

Usando la composición de aminoácidos mostrada en la Tabla 6, y la tabla de uso de codones humanos mostrada en la Tabla 3, puede diseñarse una región codificante optimizada por codones que codifica la SEC ID N°: 2 mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En la estrategia de “optimización uniforme”, cada aminoácido se asigna al codón más frecuente usado en el genoma humano para ese aminoácido como se indica en la Tabla 3. De acuerdo con este método, los codones se asignan a la región codificante que codifica la SEC ID N°: 2 de la siguiente manera: los 19 codones de fenilalanina son TTC, los 41 codones de leucina son CTG, los 25 codones de isoleucina son ATC, los 16 codones de metionina son ATG, los 44 codones de valina son GTG, los 41 codones de serina son AGC, los 38 codones de prolina son CCC, los 37 codones de treonina son ACC, los 38 codones de alanina son GCC, los 15 codones de tirosina son TAC, los 24 codones de histidina son CAC, los 31 codones de glutamina son CAG, los 18 codones de asparagina son AAC, los 22 codones de lisina son AAG, los 28 codones de ácido aspártico son GAC, los 33 codones de ácido glutámico son GAG, los 10 codones de cisteína son TGC, los 9 codones de triptófano son TGG, los 36 codones de arginina son CGG, AGA o AGG (las frecuencias de uso de estos tres codones en el genoma humano no son significativamente diferentes), y los 36 codones de glicina son GGC. La región codificante pp65 optimizada por codones diseñada por este método se expone en el presente documento como SEC ID N°: 7.

Como alternativa, una región codificante “optimizada por codones completamente” que codifica la SEC ID N°: 2 puede diseñarse asignando a cada uno de cualquier aminoácido determinado un codón basándose en la frecuencia con la que el codón se usa en el genoma humano. Estas frecuencias se muestran en la Tabla 3 anterior. Usando este último método, los codones se asignan a la región codificante que codifica la SEC ID N°: 2 de la siguiente manera: aproximadamente 9 de los 19 codones de fenilalanina son TTT, y aproximadamente 10 de los codones de fenilalanina son TTC; aproximadamente 3 de los 41 codones de leucina son TTA, aproximadamente 5 de los codones de leucina son TTG, aproximadamente 5 de los codones de leucina son CTT, aproximadamente 8 de los codones de leucina son CTC, aproximadamente 3 de los codones de leucina son CTA, y aproximadamente 17 de los codones de leucina son CTG; aproximadamente 9 de los 25 codones de isoleucina son ATT, aproximadamente 12 de los codones de isoleucina son ATC, y aproximadamente 4 de los codones de isoleucina son ATA; los 16 codones de metionina son ATG; aproximadamente 8 de los 44 codones de valina son GTT, aproximadamente 10 de los codones de valina son GTC, aproximadamente 5 de los codones de valina son GTA, y aproximadamente 21 de los codones de valina son GTG; aproximadamente 8 de los 41 codones de serina son TCT, aproximadamente 9 de los codones de serina son TCC, aproximadamente 6 de los codones de serina son TCA, aproximadamente 2 de los codones de serina son TCG, aproximadamente 6 de los codones de serina son AGT, y aproximadamente 10 de los codones de serina son AGC; aproximadamente 11 de los 38 codones de prolina son CCT, aproximadamente 12 de los codones de prolina son CCC, aproximadamente 10 de los codones de prolina son CCA y aproximadamente 4 de los codones de prolina son CCG; aproximadamente 9 de los 37 codones de treonina son ACT, aproximadamente 13 de los codones de treonina son ACC, aproximadamente 11 de los codones de treonina son ACA, y aproximadamente 4 de los codones de treonina son ACG; aproximadamente 10 de los 38 codones de alanina son GCT, aproximadamente 15 de los codones de alanina son GCC, aproximadamente 9 de los codones de alanina son GCA, y aproximadamente 4 de los codones de alanina son GCG; aproximadamente 7 de los 15 codones de tirosina son TAT y aproximadamente 8 de los codones de tirosina son TAC; aproximadamente 10 de los 24 codones de histidina son CAT y aproximadamente 14 de los codones de histidina son CAC; aproximadamente 8 de los 31 codones de glutamina son CAA y aproximadamente 23 de los codones de glutamina son CAG; aproximadamente 8 de los 18 codones de asparagina son AAT y aproximadamente 10 de los codones de asparagina son AAC; aproximadamente 9 de los 22 codones de lisina son AAA y aproximadamente 13 de los codones de lisina son AAG; aproximadamente 13 de los 28 codones de ácido aspártico son GAT y aproximadamente 15 de los codones de ácido aspártico son GAC; aproximadamente 14 de los 33 codones de ácido glutámico son GAA y aproximadamente 19 de los codones de ácido glutámico son GAG; aproximadamente 4 de los 10 codones de cisteína son TGU y aproximadamente 6 de los codones de cisteína son TGC; los 9 codones de triptófano son TGG; aproximadamente 3 de los 36 codones de arginina son CGT, aproximadamente 7 de los codones de arginina son CGC, aproximadamente 4 de los codones de arginina son CGA, aproximadamente 8 de los codones de arginina son CGG, aproximadamente 7 de los codones de arginina son AGA y aproximadamente 7 de los codones de arginina son AGG; y aproximadamente 6 de los 36 codones de glicina son GGT, aproximadamente 12 de los codones de glicina son GGC, aproximadamente 9 de los codones de glicina son GGA y aproximadamente 9 de los codones de glicina son GGG.

Como se ha descrito anteriormente, el término “aproximadamente” significa que el número de aminoácidos codificado por un determinado codón puede ser uno más o uno menos que el número determinado. Un experto en la técnica entenderá que el número total de cualquier aminoácido en la secuencia polipeptídica debe permanecer constante, por lo tanto, si hay uno “más” de un codón que codifica un aminoácido determinado, debería haber uno “menos” de otro codón que codifica el mismo aminoácido.

Las regiones codificantes de pp65 optimizadas completamente por codones representativas diseñadas por este método se presentan en el presente documento como SEC ID N°: 8-10.

Adicionalmente, una secuencia de nucleótidos optimizada mínimamente por codones que codifica la SEC ID N°: 2 puede diseñarse cambiando solamente determinados codones encontrados más frecuentemente en genes HCMV

que en genes humanos, como se muestra en la Tabla 5. Por ejemplo, si se desea sustituir codones más frecuentemente usados en seres humanos por aquellos codones que se producen al menos 2,7 veces más frecuentemente en genes HCMV, Ala CGC, que se produce 2,75 veces más frecuentemente en genes HCMV que en genes humanos, se cambia a, por ejemplo, GCC; Pro CCG, que se produce 3,0 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, CCC; Arg CGT, que se produce 3,2 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, CGC; Ser TCG, que se produce 4,2 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, TCC; y Thr ACG, que se produce 4,3 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, ACC. La región codificante de pp65 optimizada mínimamente por codones diseñada mediante este método que codifica la pp65 HCMV nativa se presenta en el presente documento como SEC ID N°: 3. Otros métodos de optimización "mínima" pueden realizarse mediante métodos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido aislado puede comprender un fragmento de ácido nucleico que codifica al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 95 o al menos 100 o más aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 2, donde el fragmento de ácido nucleico es un fragmento de una región codificante optimizada por codones que codifica la SEC ID N°: 2. La región codificante optimizada por codones humanos puede optimizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido aislado puede comprender un fragmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido con una identidad de al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la SEC ID N°: 2 y donde el fragmento de ácido nucleico es una variante de una región codificante optimizada por codones humanos que codifica la SEC ID N°: 2. La región codificante optimizada por codones humanos puede optimizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Adicionalmente se describe un polinucleótido aislado que comprende un ácido nucleico optimizado mínimamente por codones (SEC ID N°: 5) que codifica una variante polipeptídica de pp65, es decir, SEC ID N°: 6, en la que los aminoácidos 435-438 de la SEC ID N°: 2 se han delecionado. Esta delección en la secuencia de aminoácidos de pp65 elimina supuestos sustratos inesperados para la actividad quinasa presente en la secuencia de aminoácidos. Una región codificante optimizada por codones humanos que codifica esta variante puede optimizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. Como alternativa los aminoácidos 435-438 podrían sustituirse con diferentes aminoácidos, o podría realizarse una inserción para eliminar el motivo. También pueden utilizarse fragmentos, variantes o derivados adicionales de la SEC ID N°: 2.

En el presente documento también se desvelan polinucleótidos aislados que comprenden regiones codificantes optimizadas por codones humanos de gB del HCMV, o fragmentos, variantes o derivados de los mismos. En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, una región codificante optimizada por codones que codifica la SEC ID N°: 12 se optimiza de acuerdo con el uso de codones en seres humanos (*Homo sapiens*). La región codificante optimizada por codones humanos puede optimizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

Las regiones codificantes optimizadas por codones que codifican la SEC ID N°: 12, optimizadas de acuerdo con el uso de codones en seres humanos, se diseñan de la siguiente manera. La composición de aminoácidos de la SEC ID N°: 12 se muestra en la Tabla 7 y la composición de aminoácidos de gB segregado, truncado (SEC ID N°: 14) se muestra en la Tabla 8.

TABLA 7 Composición de Aminoácidos de gB de HCMV de Tipo Silvestre (SEC ID N°: 12).

| Aminoácido |     | Número en SEC ID N°: 12 |
|------------|-----|-------------------------|
| A          | Ala | 62                      |
| R          | Arg | 53                      |
| C          | Cys | 16                      |
| G          | Gly | 46                      |
| H          | His | 20                      |
| I          | Ile | 48                      |
| L          | Leu | 70                      |
| K          | Lys | 39                      |
| M          | Met | 17                      |
| F          | Phe | 34                      |
| P          | Pro | 30                      |
| S          | Ser | 87                      |

| Aminoácido |     | Número en SEC ID N°: 12 |
|------------|-----|-------------------------|
| T          | Thr | 71                      |
| W          | Trp | 8                       |
| Y          | Tyr | 51                      |
| V          | Val | 71                      |
| N          | Asn | 52                      |
| D          | Asp | 45                      |
| Q          | Gln | 37                      |
| E          | Glu | 49                      |

TABLA 8 Composición de Aminoácidos de gB HCMV secretados, aminoácidos 1-713 (SEC ID N°: 14)

| Aminoácido |     | Número en SEC ID N°: 14 |
|------------|-----|-------------------------|
| A          | Ala | 41                      |
| R          | Arg | 43                      |
| C          | Cys | 15                      |
| G          | Gly | 27                      |
| H          | His | 18                      |
| I          | Ile | 41                      |
| L          | Leu | 51                      |
| K          | Lys | 31                      |
| M          | Met | 15                      |
| F          | Phe | 30                      |
| P          | Pro | 19                      |
| S          | Ser | 73                      |
| T          | Thr | 56                      |
| W          | Trp | 8                       |
| Y          | Tyr | 43                      |
| V          | Val | 57                      |
| N          | Asn | 44                      |
| D          | Asp | 35                      |
| o          | Gln | 25                      |
| E          | Glu | 41                      |

5 Usando la composición de aminoácidos mostrada en la Tabla 7 y la tabla de uso de codones humanos mostrado en la Tabla 3, puede diseñarse una región codificante optimizada por codones humanos que codifica la SEC ID N°: 12 mediante cualquiera de los métodos analizados en el presente documento. En la estrategia de “optimización uniforme”, cada aminoácido se asigna al codón más frecuente usado en el genoma humano para ese aminoácido como se indica, por ejemplo, en la Tabla 3. De acuerdo con este método, los codones se asignan a la región codificante que codifica la SEC ID N°: 12 de la siguiente manera: los 34 codones de fenilalanina son TTC, los 70  
10 codones de leucina son CTG, los 48 codones de isoleucina son ATC, los 17 codones de metionina son ATG, los 71 codones de valina son GTG, los 87 codones de serina son AGC, los 30 codones de prolina son CCC, los 71 codones de treonina son ACC, los 62 codones de alanina son GCC, los 51 codones de tirosina son TAC, los 20 codones de histidina son CAC, los 37 codones de glutamina son CAG, los 52 codones de asparagina son AAC, los 39 codones de lisina son AAG, los 45 codones de ácido aspártico son GAC, los 49 codones de ácido glutámico son  
15 GAG, los 16 codones de cisteína son TGC, los 8 codones de triptófano son TGG, los 53 codones de arginina son CGG, AGA o AGG (las frecuencias de uso de estos tres codones en el genoma humano no son significativamente diferentes), y los 46 codones de glicina son GGC. La región codificante de gB de longitud completa optimizada por codones diseñada mediante este procedimiento se presenta en el presente documento como SEC ID N°: 15.

20 Como alternativa, una región codificante “completamente optimizada por codones” que codifica la SEC ID N°: 12 puede diseñarse asignando al azar a cada uno de cualquier aminoácido determinado un codón basándose en la frecuencia con la que el codón se usa en el genoma humano. Estas frecuencias se muestran en la Tabla 3 anterior. Usando este último método, los codones se asignan a la región codificante que codifica la SEC ID N°: 12 de la

siguiente manera: aproximadamente 15 de los 34 codones de fenilalanina son TTT, y aproximadamente 19 de los codones de fenilalanina son TTC; aproximadamente 5 de los 70 codones de leucina son TTA, aproximadamente 9 de los codones de leucina son TTG, aproximadamente 9 de los codones de leucina son CTT, aproximadamente 10 de los codones de leucina son CTC, aproximadamente 5 de los codones de leucina son CTA, y aproximadamente 28 de los codones de leucina son CTG; aproximadamente 17 de los 48 codones de isoleucina son ATT, aproximadamente 23 de los codones de isoleucina son ATC, y aproximadamente 8 de los codones de isoleucina son ATA; los 17 codones de metionina son ATG; aproximadamente 13 de los 71 codones de valina son GTT, aproximadamente 17 de los codones de valina son GTC, aproximadamente 8 de los codones de valina son GTA, y aproximadamente 33 de los codones de valina son GTG; aproximadamente 16 de los 87 codones de serina son TCT, aproximadamente 19 de los codones de serina son TCC, aproximadamente 13 de los codones de serina son TCA, aproximadamente 5 de los codones de serina son TCG, aproximadamente 13 de los codones de serina son AGT, y aproximadamente 21 de los codones de serina son AGC; aproximadamente 9 de los 30 codones de prolina son CCT, aproximadamente 10 de los codones de prolina son CCC, aproximadamente 8 de los codones de prolina son CCA y aproximadamente 3 de los codones de prolina son CCG; aproximadamente 17 de los 71 codones de treonina son ACT, aproximadamente 26 de los codones de treonina son ACC, aproximadamente 20 de los codones de treonina son ACA, y aproximadamente 8 de los codones de treonina son ACG; aproximadamente 16 de los 62 codones de alanina son GCT, aproximadamente 25 de los codones de alanina son GCC, aproximadamente 14 de los codones de alanina son GCA, y aproximadamente 7 de los codones de alanina son GCG; aproximadamente 22 de los 51 codones de tirosina son TAT y aproximadamente 29 de los codones de tirosina son TAC; aproximadamente 8 de los 20 codones de histidina son CAT y aproximadamente 12 de los codones de histidina son CAC; aproximadamente 9 de los 37 codones de glutamina son CAA y aproximadamente 28 de los codones de glutamina son CAG; aproximadamente 24 de los 52 codones de asparagina son AAT y aproximadamente 28 de los codones de asparagina son AAC; aproximadamente 16 de los 39 codones de lisina son AAA y aproximadamente 23 de los codones de lisina son AAG; aproximadamente 21 de los 45 codones de ácido aspártico son GAT y aproximadamente 24 de los codones de ácido aspártico son GAC; aproximadamente 20 de los 49 codones de ácido glutámico son GAA y aproximadamente 29 de los codones de ácido glutámico son GAG; aproximadamente 7 de los 16 codones de cisteína son TGT y aproximadamente 9 de los codones de cisteína son TGC; los 8 codones de triptófano son TGG; aproximadamente 4 de los 53 codones de arginina son CGT, aproximadamente 10 de los codones de arginina son CGC, aproximadamente 6 de los codones de arginina son CGA, aproximadamente 11 de los codones de arginina son CGG, aproximadamente 11 de los codones de arginina son AGA y aproximadamente 11 de los codones de arginina son AGG; y aproximadamente 7 de los 46 codones de glicina son GGT, aproximadamente 16 de los codones de glicina son GGC, aproximadamente 12 de los codones de glicina son GGA, y aproximadamente 11 de los codones de glicina son GGG.

Como se ha descrito anteriormente, el término “aproximadamente” significa que el número de aminoácidos codificados por un determinado codón puede ser uno más o uno menos que el número determinado. Se entenderá por un experto en la técnica que el número total de cualquier aminoácido en la secuencia polipeptídica debe permanecer constante, por lo tanto, si hay uno “más” de un codón que codifica un aminoácido determinado, tendría que haber uno “menos” de otro codón que codifique el mismo aminoácido. Las regiones codificantes de gB optimizadas completamente por codones representativas diseñadas por este método que codifican gB del HCMV de longitud completa se presenta en el presente documento como SEC ID N°: 16-18.

Adicionalmente, una secuencia de nucleótidos optimizada mínimamente por codones que codifica la SEC ID N°: 14 puede diseñarse haciendo referencia a la composición de aminoácidos de la Tabla 8 y cambiando solo determinados codones encontrados más frecuentemente en genes humanos que se expresan altamente, como se muestra en la Tabla 5. Por ejemplo, si se desea sustituir codones más frecuentemente usados en seres humanos por los codones que se producen al menos 2,7 veces más frecuentemente en genes HCMV, Ala CGC, que se produce 2,75 veces más frecuentemente en genes de HCMV que en genes humanos, se cambia a, por ejemplo, GCC; Pro CCG, que se produce 3,0 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, CCC; Arg CGT, que se produce 3,2 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, CGC; Ser TCG, que se produce 4,2 veces más frecuentemente en genes de HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, TCC; y Thr ACG, que se produce 4,3 veces más frecuentemente en genes HCMV que en seres humanos, se cambia a, por ejemplo, ACC. Esta región codificante gB segregada optimizada mínimamente por codones que codifica la SEC ID N°: 14 diseñada por este método se presenta en el presente documento como SEC ID N°: 13.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido aislado puede comprender un fragmento de ácido nucleico que codifica al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, al menos 95 o al menos 100 o más aminoácidos contiguos de la SEC ID N°: 12 o SEC ID N°: 14, donde el fragmento de ácido nucleico es un fragmento de una región codificante optimizada por codones que codifica la SEC ID N°: 12 o SEC ID N°: 14. La región codificante optimizada por codones humanos puede optimizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

En determinadas realizaciones, un polinucleótido aislado puede comprender un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una identidad de al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% con la gB, es decir, SEC ID N°: 12 o SEC ID N°: 14, y donde el ácido

nucleico es una variante de una región codificante optimizada por codones que codifica la SEC ID N°: 12 o SEC ID N°: 14. La región codificante optimizada por codones humanos puede optimizarse mediante cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

- 5 De esta manera, el nivel de expresión del polipéptido a partir de polinucleótidos administrados *in vivo* se mejora y/o la captación de los polinucleótidos por las células de una especie deseada, por ejemplo una especie de vertebrado, por ejemplo una especie de mamífero, por ejemplo un ser humano, se facilita.

### Métodos y administración

- 10 Un polipéptido de HCMV puede administrarse a un ser humano administrando al mismo una o más de las composiciones descritas en el presente documento; de tal manera que tras la administración de las composiciones tales como se describe en el presente documento, un polipéptido del HCMV se expresa en células humanas en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria contra HCMV.

El término “vertebrado” pretende incluir un vertebrado “vertebrado” singular así como “vertebrados” plurales y comprende mamíferos y aves así como peces, reptiles y anfibios.

- 15 El término “mamífero” pretende incluir un “mamífero” singular y “mamíferos” en plural e incluye, pero sin limitación, seres humanos; primates tales como simios, monos, orangutanes y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos; felinos tal como gatos, leones y tigres, equinos tales como caballos, burros y cebras, animales comestibles tales como vacas, cerdos y ovejas; ungulados tal como ciervo y jirafa; y úrsidos tal como osos. En particular, el mamífero puede ser un sujeto humano, un animal comestible o un animal de compañía.

- 20 Adicionalmente se describe un método para generar, potenciar o modular una respuesta inmunitaria contra el HCMV que comprende administrar a un vertebrado una o más de las composiciones descritas en el presente documento. En este método, la composición incluye un polipéptido aislado que comprende una región codificante optimizada por codones humanos que codifica un polipéptido del HCMV, o un fragmento de ácido nucleico de dicha región codificante que codifica un fragmento, variante o derivado del mismo. Los polinucleótidos se incorporan en las células del vertebrado *in vivo*, y una cantidad antigénica del polipéptido de los HCMV o fragmento, variante o  
25 derivado del mismo se produce *in vivo*. Después de la administración de la composición de acuerdo con este método, el polipéptido del HCMV se expresa en el vertebrado en una cantidad suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria. Dicha respuesta inmunitaria podría usarse por ejemplo para generar anticuerpos contra el HCMV para su uso en ensayos de diagnóstico o como reactivos de laboratorio.

- 30 También se describe un método para generar, potenciar o modular una respuesta inmunitaria protectora y/o terapéutica contra el HCMV en un ser humano, que comprende administrar al ser humano que necesite una inmunidad terapéutica y/o preventiva una o más de las composiciones descritas en el presente documento. En este método, la composición incluye un polinucleótido aislado que comprende una región codificante optimizada por codones humanos que codifican un polipéptido de HCMV, o un fragmento de ácido nucleico de dicha región codificante que codifica un fragmento, variante o derivado del mismo. Los polinucleótidos se incorporan en las  
35 células del ser humano *in vivo*, y una cantidad inmunológicamente eficaz del polipéptido HCMV, o fragmento o variante se produce *in vivo*. Después de la administración de la composición de acuerdo con este método, el polipéptido del HCMV se expresa en el ser humano en una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz.

- 40 Como se usa en el presente documento, una “respuesta inmunitaria” se refiere a la capacidad de un vertebrado para suscitar una reacción inmunitaria frente a una composición administrada al vertebrado. Como ejemplos de respuestas inmunitarias se incluyen una respuesta contra anticuerpos o una respuesta celular, por ejemplo, de linfocitos T citotóxicos. Una o más composiciones de la presente invención pueden usarse para prevenir infección por HCMV en seres humanos, por ejemplo, como una vacuna profiláctica, para establecer o potenciar la inmunidad contra HCMV en un individuo sano antes de exposición al HCMV o contracción de enfermedad de HCMV, previniendo así la enfermedad o reduciendo la gravedad de los síntomas de la enfermedad.

- 45 Una o más composiciones de la presente invención también pueden usarse para tratar individuos que ya están expuestos a la HCMV o ya padecen la enfermedad del HCMV para estimular posteriormente el sistema inmunitario del ser humano, reduciendo de esta manera o eliminando los síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno. Como se define en el presente documento, “tratamiento” se refiere al uso de una o más composiciones de la presente invención para impedir, curar, retrasar o reducir la gravedad de los síntomas de la enfermedad del HCMV  
50 en un ser humano, y/o no da como resultado un empeoramiento de la enfermedad del HCMV durante un periodo de tiempo específico. No se requiere que ninguna composición de la presente invención proporcione inmunidad total contra el HCMV o cure totalmente o elimine todos los síntomas de la enfermedad del HCMV. Como se usa en el presente documento, un “ser humano que necesite inmunidad terapéutica y/o preventiva” se refiere a un individuo en el que se desea tratar, es decir, prevenir, curar, retrasar o reducir la gravedad de los síntomas de la enfermedad del  
55 HCMV, y/o no da como resultado un empeoramiento de la enfermedad del HCMV durante un periodo de tiempo específico.

En otras realizaciones, una o más composiciones de la presente invención se utilizan en una pauta de

“sensibilización y recuerdo”. Un ejemplo de una pauta de “sensibilización y recuerdo” pueden encontrarse en Yang, Z. *et al J. Virol* 77: 799-803 (2002). En estas realizaciones, una o más composiciones de vacuna de polinucleótidos de la presente invención se administran a un ser humano, sensibilizando de esta manera la respuesta inmunitaria del ser humano contra el HCMV y después se utiliza una segunda composición inmunogénica como una vacunación de refuerzo. Una o más composiciones de vacunas de polinucleótidos de la presente invención se usan para preparar la inmunidad y después una segunda composición inmunogénica, por ejemplo, una vacuna o vacunas virales recombinantes, una vacuna polinucleotídica diferente, una o más proteínas del HCMV subunitarias purificadas, por ejemplo, gB o pp65, con o sin antígenos HCMV adicionales, por ejemplo IE1, o una variante, fragmento o derivado del mismo se usa para reforzar la respuesta inmunitaria anti HCMV. Las composiciones de vacuna de polinucleótidos pueden comprender uno o más vectores para la expresión de uno o más genes del HCMV como se describe en el presente documento. Además, una vacuna sensibilizadora de polinucleótidos y la posterior vacuna de refuerzo pueden suscitar una respuesta inmunitaria a los mismos antígenos o similares, o puede suscitar respuestas a diferentes antígenos.

Pueden prepararse vectores para la expresión en la vacuna viral recombinante y en células de mamífero transfectadas como parte de una vacuna polinucleotídica.

Los términos “sensibilización” o “primario” y “refuerzo” o “reforzando” se usan en el presente documento para referirse a las inmunizaciones iniciales y posteriores, respectivamente, es decir de acuerdo con las definiciones que estos términos normalmente tienen en inmunología.

Adicionalmente se describen métodos para potenciar la respuesta inmunitaria de un paciente humano contra el HCMV administrando a los tejidos de un ser humano uno o más polinucleótidos que comprenden una o más regiones codificantes optimizadas por codones que codifican polipéptidos del HCMV y también polipéptidos del HCMV o fragmentos, o variantes o derivados del mismo; o uno o más polinucleótidos no optimizados que codifican polipéptidos del HCMV, fragmentos, variantes o derivados del mismo.

La combinación de polipéptidos del HCMV o polinucleótidos que codifican polipéptidos del HCMV o fragmentos, variantes o derivados de los mismos, con las composiciones de ácido nucleico optimizadas por codones proporciona efectos terapéuticamente beneficiosos a concentraciones de dosis moderadas. Por ejemplo, las respuestas inmunológicas suficientes para conseguir un efecto terapéuticamente beneficioso usando menos de una vacuna de tipo convencional (que es una vacuna que comprende polipéptidos inmunogénicos o nucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos, variantes, fragmentos o derivados de los mismos que no son productos de, o que no se han optimizado por codones como se describe en el presente documento) cuando se complementan o potencian con la cantidad apropiada de un ácido nucleico optimizado por codones.

Las vacunas tipo convencionales, incluyen composiciones de vacuna que comprenden virus o bacterias destruidos, inertes o fragmentos de ellos, o proteínas o fragmentos de proteína bacterianos o virales, inyectados en el paciente para suscitar acción mediante el sistema inmunitario. Con respecto a la presente invención, las vacunas de tipo convencional incluyen composiciones que comprenden polipéptidos inmunogénicos o nucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos, fragmentos, variantes o derivados de los mismos y vectores que comprenden nucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos, fragmentos, variantes o derivados de los mismos que no son productos de, o no contienen polinucleótidos optimizados por codones como se describe en el presente documento. Por tanto, se incluyen vacunas modificadas genéticamente en vacunas tipo convencionales tales como vacunas vivas modificadas por ingeniería genética, vacunas quiméricas vivas, vacunas defectuosas en replicación vivas, vacunas subunitarias, vacunas peptídicas en diversas modificaciones de vacunas subunitarias monovalentes, multivalentes o quiméricas administradas como componentes individuales o incorporadas en partículas similares a virus para mejorar la inmunogenicidad y vacunas polinucleotídicas. Los agentes auxiliares, como se describe en el presente documento, también se consideran componentes de vacunas tipo convencionales.

Por tanto, se contempla una dosis moderada administrando las composiciones de vacuna polinucleotídicas combinatorias de la presente invención.

En particular, la dosis de las vacunas tipo convencionales puede reducirse al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 70% cuando se administran en combinación con las composiciones de ácido nucleico optimizadas por codones de la invención.

De manera similar, un nivel deseable de una respuesta inmunológica conseguida por un compuesto farmacéutico basado en ADN en solitario puede conseguirse con menos ADN incluyendo una vacuna de ADN de tipo convencional. Además, usando una combinación de una vacuna de tipo convencional y una vacuna basada en ADN optimizada por codones se puede permitir que ambos materiales se usen en menores cantidades consiguiendo aún el nivel deseado de respuesta inmunitaria que se produce a partir de la administración del componente en solitario en mayores cantidades (por ejemplo pueden usarse menos de producto inmunológico cuando se usan en combinación). Esta reducción en cuanto a las cantidades de materiales que se administran puede ser para cada administración, además de reducir el número de administraciones en un régimen de vacunación (por ejemplo, 2 frente a 3 o 4 inyecciones). Además, la combinación también puede proporcionar reducir la cinética de la respuesta inmunológica (por ejemplo se consiguen niveles de respuesta deseados en 3 semanas en lugar de 6 después de

inmunización).

En particular, la dosis de los productos farmacéuticos basados en ADN, puede reducirse al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 70% cuando se administran en combinación con vacunas IV convencionales.

- 5 La determinación de las cantidades exactas de los productos farmacéuticos basados en ADN y un antígeno convencional se basa en diversos factores como se describe en el presente documento y un experto habitual en la técnica puede determinarla fácilmente.

Además de dosis moderadas, las composiciones combinatorias reivindicadas proporcionan una ampliación de la respuesta inmunitaria y/o respuestas inmunitarias beneficiosas aumentadas. Dichas respuestas inmunitarias ampliadas o potenciadas se consiguen: añadiendo ADN para potenciar respuestas celulares a una vacuna de tipo convencional; añadiendo una vacuna de tipo convencional a un compuesto farmacéutico de ADN para potenciar la respuesta humoral; usando una combinación que induzca epítomos adicionales (tanto humoral y/o celular) que se reconozca y/o responda más deseablemente a (amplitud epitópica); empleando una combinación de vacuna convencional de ADN diseñada para un espectro deseado particular de respuestas inmunológicas; obteniendo un espectro deseable usando cantidades más elevadas de cualquier componente. La respuesta inmunitaria ampliada puede medirla un experto habitual en la técnica mediante un ensayo inmunológico convencional específico para el espectro de respuesta deseable.

Tanto la amplitud como la dosis moderada pueden obtenerse simultáneamente.

Una o más composiciones de la presente invención pueden administrarse a un ser humano mediante métodos descritos en el presente documento, consiguiendo de esta manera una respuesta inmunitaria preventiva eficaz y/o una terapéutica eficaz.

Más específicamente, las composiciones de la presente invención pueden administrarse en cualquier tejido de un ser humano, incluyendo, pero sin limitación, músculo, piel, tejido cerebral, tejido pulmonar, tejido hepático, tejido esplénico, tejido de médula ósea, tejido de timo, tejido cardíaco, por ejemplo, miocardio, endocardio y pericardio, tejido linfático, tejido sanguíneo, tejido óseo, tejido pancreático, tejido renal, tejido de vejiga urinaria, tejido estomacal, tejido intestinal, tejido testicular, tejido ovárico, tejido uterino, tejido vaginal, tejido rectal, tejido del sistema nervioso, tejido ocular, tejido glandular, tejido de la lengua y tejido conectivo, por ejemplo cartílago.

Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a cualquier cavidad interna de un ser humano, incluyendo, pero sin limitación, los pulmones, la boca, la cavidad nasal, el estómago, la cavidad peritoneal, el intestino, cualquier cámara cardíaca, venas, arterias, capilares, cavidades linfáticas, la cavidad uterina, la cavidad vaginal, la cavidad rectal, cavidades articulares, ventrículos en el cerebro, canal espinal en la médula espinal, las cavidades oculares; el lumen de un conducto de una glándula salivar o un hígado. Cuando las composiciones de la presente invención se administran al lumen de un conducto de una glándula salivar o hígado, el polipéptido deseado se expresa en la glándula salivar y el hígado de tal manera que el polipéptido se administra a la corriente sanguínea del ser humano de cada glándula salivar o hígado. Determinados modos de administración de a órganos secretores de un sistema gastrointestinal usando una glándula salivar hepática y páncreas para liberar un polipéptido deseado en la corriente sanguínea se desvelan en las Patentes de Estados Unidos N° 5.837.693 y 6.004.944.

Las composiciones pueden administrarse al músculo, bien músculo esquelético o bien músculo cardíaco, o al tejido pulmonar. Se desvelan modos de administración específicos, pero no limitantes, al tejido pulmonar en Wheeler, C. J., *et al.*, *Proa Nati Acad. Sci. USA* 93: 11454-11459 (1996).

De acuerdo con los métodos descritos, las composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía intramuscular (i.m.), subcutánea (s.c), o intrapulmonar. Otras vías de administración adecuadas incluyen pero sin limitación administración intratraqueal, transdérmica, intraocular, intranasal, por inhalación, intracavidad, intravenosa (i.v.), intraductal (por ejemplo en el páncreas) e intraparenquimal (por ejemplo en cualquier tejido). La administración transdérmica incluye pero sin limitación administración intradérmica (por ejemplo, en la dermis o epidermis), transdérmica (por ejemplo percutánea) y transmucosa (es decir, en o a través de la piel o tejido mucoso). La administración intracavidad incluye, pero sin limitación, administración en cavidades oral, vaginal, rectal, nasal, peritoneal o intestinal así como administración intratecal (es decir, en el canal espinal), intraventricular (es decir, en los ventrículos cerebrales o en los ventrículos cardíacos), intraauricular (es decir en la aurícula cardíaca) y subaracnoidea (es decir en los espacios subaracnoideos del cerebro).

Cualquier modo de administración puede usarse siempre que el método dé como resultado la expresión del péptido o proteína deseado, en el tejido deseado, en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria contra el HCMV y/o generar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéuticamente eficaz contra el HCMV en un ser humano que necesite dicha respuesta. Los medios de administración incluyen inyección con aguja, infusión con catéter, inyectores biológicos, aceleradores de partículas (por ejemplo, "pistolas génicas" o inyectores "sin aguja" neumáticos) Med-E-Jet (Vahlsing, H., *et al.*, *J. Immunol Methods* 171: 11-22 (1994)), Pigjet (Schrijver, R., *et al.*,

*Vaccine* 15: 1908-1916 (1997)), Biojector (Davis, H., *et al.*, *Vaccine* 12: 1503-1509 (1994); Gramzinski, R., *et al.*, *MolMed.* 4: 109-118 (1998)), AdvantaJet (Linmayer, I., *et al.*, *Diabetes Care* 9: 294-297 (1986)), Medi-jector (Martins, J., y Roedl, E. J. *Occup. Med.* 21: 821-824 (1979)), depósitos de esponjas de espuma con gel, otros materiales de depósito comercialmente disponibles (por ejemplo, hidrogeles), bombas osmóticas (por ejemplo minibombas Alza), formulaciones farmacéuticas sólidas orales o en supositorio (comprimido o píldora), cremas dérmicas tópicas y decantación, el uso de suturas recubiertas con polinucleótidos (Qin, Y., *et al.*, *Life Sciences* 65: 2193-2203 (1999)) o aplicaciones tópicas durante la cirugía. Determinados modos de administración son inyección basada en aguja intramuscular y aplicación pulmonar mediante infusión por catéter. También pueden emplearse métodos de administración de plásmidos con ayuda de energía (EAPD) para administrar a las composiciones de la invención. Un método de este tipo implica la aplicación de breves impulsos eléctricos en los tejidos inyectados, un procedimiento normalmente conocido como electroporación. Véase en líneas generales Mir, L. M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 4262-7 (1999); Hartikka, J *et al.*, *Mol. Ther.* 4: 407-15 (2001); Mathiesen, I., *Gene Ther.* 6: 508-14(1999); Rizzuto G, *et al.*, *Hum. Gen. Ther.* 11: 1891-900 (2000). Cada una de las referencias citadas en este párrafo se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Además, pueden formularse construcciones de antígenos en solitario o en combinación para potenciar el tipo de respuesta inmunitaria (por ejemplo humoral, celular, mucosa, etc.) que se considera que es más beneficioso montar en el hospedador para ese antígeno o antígenos particulares. Cada dicha formulación puede administrarse individualmente en un sitio distinto en el hospedador y/o combinarse y administrarse mediante alguna o todas de las otras formulaciones de antígeno en uno o más sitios en el hospedador. Cada administración puede conseguirse usando el mismo o diferente medio de administración físico. Por tanto, en un ejemplo no limitante, podría formularse un plásmido gB con lípidos catiónicos y administrarse en una nebulización por vía intranasal, junto con administración de una formulación de poloxámero de pp65 usando un dispositivo sin aguja en la piel y el músculo de un extremidad junto con administración intramuscular transdérmica usando una jeringa convencional y una aguja de un plásmido IE1 en PBS en una segunda extremidad.

La determinación de una cantidad eficaz de una o más composiciones de la presente invención depende de diversos factores que incluyen, por ejemplo, el antígeno que se esté expresando, por ejemplo, gB, pp65 o IE1; o fragmentos, variantes o derivados de los mismos, la edad y el peso del sujeto, la afección exacta que requiera el tratamiento y su gravedad y la vía de administración. Basándose en los factores anteriores, la determinación de la cantidad exacta, número de dosis y sincronización de las dosis se encuentran dentro de la habilidad habitual en la técnica y será fácilmente determinada por el médico tratante.

Las composiciones de la presente invención pueden incluir diversas sales, excipientes, vehículos de administración y/o agentes auxiliares como se desvela, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 2002/0019358, publicada el 14 de febrero del 2002.

Adicionalmente, las composiciones de la presente invención pueden incluir uno o más compuestos facilitadores de la transfección que faciliten la administración de polinucleótidos al interior de una célula y/o en una localización deseada dentro de una célula. Como se usa en el presente documento, los términos "compuesto facilitador de la transfección", "agente facilitador de transfección" y "material facilitador de transfección" son sinónimos, y pueden usarse indistintamente. Debe observarse que determinados compuestos facilitadores de la transfección también pueden ser "adyuvantes" como se describen más adelante, por ejemplo, además de facilitar la administración de polinucleótidos al interior de una célula, el compuesto actúa para modificar o aumentar la respuesta inmunitaria contra el antígeno codificado por ese polinucleótido. Como ejemplos de compuestos facilitadores de la transfección se incluyen, pero sin limitación, materiales inorgánicos tales como fosfato cálcico, alumbre (sulfato de aluminio) y partículas de oro (por ejemplo, vehículos de administración de tipo "polvo"), péptidos que son, por ejemplo, dianas intercelulares catiónicas (para administración selectiva en determinados tipos de células), dianas intracelulares (para localización nuclear o salida endosómica) y anfipáticas (formadoras de hélices o formadores de poros), proteínas que son, por ejemplo, básicas (por ejemplo, cargadas positivamente) tales como histonas, conductoras (por ejemplo, asialoproteínas), virales (por ejemplo, la proteína de recubrimiento del virus Sendai) y lípidos formadores de poros que son, por ejemplo, catiónicos (por ejemplo, DMRIE, DOSPA, DC-Chol), básicos (por ejemplo, estearil amina), neutros (por ejemplo, colesterol), aniónicos (por ejemplo, fosfatidil serina) y zwitteriónicos (por ejemplo, DOPE, DOPC); y polímeros tales como dendrímeros, polímeros radiales, poliaminoácidos "homogéneos" (por ejemplo, polilisina, poliarginina), poliaminoácidos "heterogéneos" (por ejemplo mezclas de lisina y glicina), copolímeros, polivinilpirrolidona (PVP), poloxámeros (por ejemplo CRL 1005) y polietilenglicol (PEG). Un material facilitador de la transfección puede usarse en solitario o en combinación con uno o más de otros materiales facilitadores de transfección. Dos o más materiales facilitadores de transfección pueden combinarse mediante enlace químico (por ejemplo, covalente e iónico tal como en polilisina lipídica, polilisina PEGilada) (Toncheva, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1380(3): 354-368 (1988)), mezcla mecánica (por ejemplo, materiales con movimiento libre en fase líquida o sólida tales como "Lípidos catiónicos + polilisina") (Gao y Huang, *Biochemistry* 35: 1027-1036 (1996); Trubetskoy, *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* 1131: 311-313 (1992)), y agregación (por ejemplo, coprecipitación, formación de geles tal como en lípidos catiónicos + poli-lactida y polilisina + gelatina).

Una categoría de materiales facilitadores de la transfección es los lípidos catiónicos. Como ejemplos de lípidos catiónicos se encuentran 5-carboxiespermilglicina dioctadecilamida (DOGS) y dipalmitoil-fosfatidiletanolamina-5-

carboxiespermidamida (DPPES). También pueden usarse derivados de colesterol catiónicos, que incluyen {3β-[N,N',N'-dimetilamino]etano]-carbomoil}-colesterol (DC-Chol). Bromuro de dimetildiocetadecil-amonio (DDAB), bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-bis-(2-tetradeciloetil)-N-metil-amonio (PA-DEMO), bromuro de N-(3-aminopropil)-N,N-bis-(2-dodeciloetil)-N-metil-amonio (PA-DELO), bromuro de N,N,N-tris-(2-dodeciloetil)-N-(3-amino)propil-amonio (PA-TELO) y bromuro de N1-(3-aminopropil)((2-dodeciloetil)-N2-(2-dodeciloetil)-1-piperacinaamino (GA-LOE-BP) también puede emplearse en la presente invención.

Como lípidos catiónicos no diéter, tales como DL-1,2-dioleoil-3-dimetilaminopropil-β-hidroxiethylamonio (diéster DORI), 1-O-oleil-2-oleoil-3-dimetilaminopropil-β-hidroxiethylamonio (DORI éster/éter), y sus sales promueven la administración de genes *in vivo*. En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos comprenden grupos unidos mediante un heteroátomo unido a un resto amonio cuaternario en el grupo principal. Puede conectarse un espaciador de glicilo al engarce del grupo hidroxilo.

Lípidos catiónicos específicos, pero no limitantes para su uso en determinadas realizaciones de la presente invención se incluyen DMRIE (bromuro de (±)-N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloetil)-1-propanaminio), GAP-DMORIE (bromuro de ((±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeceneiloetil)-1-propanaminio) y GAP-DLRIE (bromuro de (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloetil)-1-propanaminio).

Otros tensioactivos catiónicos específicos pero no limitantes para su uso en determinadas realizaciones de la presente invención incluyen Bn-DHRIE, DhxRIE, DhxRIE-OAc, DhxRIE-OBz y Pr-DOctRIE-OAc. Estos lípidos se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos relacionada con N° de Serie 60/435.303. En otro aspecto de la presente invención, el tensioactivo catiónico es Pr-DOctRIE-OAc.

Otros lípidos catiónicos incluyen pentaclorhidrato de (±)-N,N-dimetil-N-[2-(espermincarboxamido)etil]-2,3-bis(dioleiloetil)-1-propanaminio (DOSPA), bromuro de (±)-N-(2-aminoetil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloetil)-1-propanaminio (β-aminoetil-DMRIE o βAE-DMRBE) (Wheeler, *et al*, *Biochim. Biophys. Acta* 1280: 1-11 (1996)), y bromuro de (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloetil)-1-propanaminio (GAP-DLRIE) (Wheeler, *et al*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 93: 11454-11459 (1996)), que se ha desarrollado a partir de DMRIE.

Otros ejemplos de lípidos catiónicos derivados de DMRIE que son útiles para la presente invención son bromuro de (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloetil)-1-propanaminio (GAP-DDRIE), bromuro de (±)-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloetil)-1-propanaminio (GAP-DMRIE), bromuro de (±)-N-((N"-metil-N-ureil)propil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloetil)-1-propanaminio (GMU-DMRIE), bromuro de (±)-N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetil-2,3-bis(dodeciloetil)-1-propanaminio (DLRIE) y bromuro de (±)-N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetil-2,3-bis-([Z]-9-octadeceniloetil)propil-1-propanaminio (HP-DORIE).

En las realizaciones en las que la composición inmunogénica comprende un lípido catiónico, el lípido catiónico puede mezclarse con uno o más co-lípidos. Para los fines de definición, el término Acolípido se refiere a cualquier material hidrófobo que pueda combinarse con el componente lipídico catiónico e incluye lípidos anfipáticos, tales como fosfolípidos, y lípidos neutros, tales como colesterol. Los lípidos catiónicos y co-lípidos pueden mezclarse o combinarse en diversas maneras para producir diversas estructuras macroscópicas unidas no covalentemente, incluyendo, por ejemplo, liposomas, vesículas multilaminares, vesículas unilaminares, micelas y películas simples. Una clase no limitante de co-lípidos son los fosfolípidos zwitteriónicos que incluyen las fosfatidiletanolaminas y las fosfatidilcolinas. Como ejemplos de fosfatidiletanolaminas se incluyen DOPE, DMPE y DPyPE. En determinadas realizaciones, el co-lípido es DPyPE, que comprende dos sustituyentes fitanoilo incorporados en el esqueleto de diacilfosfatidiletanolamina.

En otras realizaciones el co-lípido es DOPE, CAS nombre 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

Cuando una composición de la presente invención comprende un lípido catiónico y un co-lípido, la proporción molar lípido catiónico:co-lípido puede ser de aproximadamente 9:1 a aproximadamente 1:9, de aproximadamente 4:1 a aproximadamente 1:4, de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:2 o de aproximadamente 1:1.

Para minimizar la homogeneidad, los componentes plásmido y co-lípido pueden disolverse en un disolvente tal como cloroformo, seguido por evaporación de la solución lípido catiónico/co-lípido en vacío para secarse como una película sobre la superficie interna de un recipiente de vidrio (por ejemplo, un matraz de fondo redondo Rotovap). Después de la suspensión en un disolvente acuoso, las moléculas del componente de lípido anfipático se autoensamblan en vesículas lipídicas homogéneas. Esas vesículas lipídicas pueden procesarse posteriormente para tener un diámetro medio seleccionado de tamaño uniforme antes de la formación del complejo con, por ejemplo, un polinucleótido optimizado por codones, de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el tratamiento con ultrasonidos de una solución lipídica se describe en Felgner *et al*, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 8: 7413-7417 (1987) y en la Patente de Estados Unidos N° 5.264.618.

En aquellas realizaciones en las que la composición incluye un lípido catiónico, los polinucleótidos forman complejos con lípidos mezclando, por ejemplo, se mezclan un plásmido en solución acuosa y una solución de lípido catiónico:co-lípido como se prepara en el presente documento. La concentración de cada una de las soluciones del

constituyente puede ajustarse antes de mezclar de tal manera que la proporción lípido:co-lípido plásmido/catiónico deseada final y la concentración final del plásmido deseada se obtenga después de mezclar dos soluciones. Las mezclas lípido catiónico:co-lípido se preparan adecuadamente hidratando una fina película de los materiales lipídicos mezclados en un volumen apropiado de disolvente acuoso mezclando por agitación vorticial a temperaturas ambientes durante aproximadamente 1 minuto. Las finas películas se preparan mezclando soluciones de cloroformo de los componentes individuales para conseguir una proporción de soluto molar deseada seguido de formación de alícuotas del volumen deseado de las soluciones en un recipiente adecuado. El disolvente se retira por evaporación, primero con una corriente de gas seco inerte (por ejemplo argón), seguido por un tratamiento de vacío elevado.

Otros aditivos hidrófobos y anfífilos tales como, por ejemplo, esteroides, ácidos grasos, gangliósidos, glucolípidos, lipopéptidos, liposacáridos, neobees, niosomas, prostaglandinas y esfingolípidos, también pueden incluirse en las composiciones de la presente invención. En dichas composiciones, estos aditivos pueden incluirse en una cantidad entre aprox. 0,1 mol % y aprox. 99,9 mol % (con respecto al lípido total), aprox. 1-50 mol % o aprox. 2-25 mol %.

Realizaciones adicionales de la presente invención se obtienen de composiciones que comprenden un agente auxiliar que se administra antes, después o simultáneamente con el polinucleótido. Como se usa en el presente documento, un "agente auxiliar" es una sustancia incluida en una composición con respecto a su capacidad para potenciar, con respecto a una composición que es idéntica excepto por la inclusión del agente auxiliar, la entrada de polinucleótidos en las células de vertebrados *in vivo*, y/o la expresión *in vivo* de polipéptidos codificados por dichos polinucleótidos. Determinados agentes auxiliares pueden, además de potenciar la entrada de polinucleótidos en las células, mejorar una respuesta inmunitaria contra un inmunógeno codificado por el polinucleótido. Como agentes auxiliares se incluyen tensioactivos no iónicos, aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos o detergentes, quelantes, inhibidores de DNasa, poloxámeros, agentes que agregan o condensan ácidos nucleicos, agentes emulsificantes o solubilizantes, agentes humectantes, agentes formadores de gel y tampones.

Como agentes auxiliares para su uso en las composiciones de la presente invención se incluyen, pero sin limitación, detergentes no iónicos y tensioactivos IGEAL CA 630<sup>®</sup> CA 630, NONIDET NP-40, Nonidet<sup>®</sup> P40, Tween-20<sup>™</sup>, Tween-80<sup>™</sup>, Pluronic<sup>®</sup> F68, Pluronic F77<sup>®</sup>, Pluronic P65<sup>®</sup>, Tritón X-100<sup>™</sup> y Tritón X-114<sup>™</sup>; el detergente aniónico de dodecil sulfato sódico (SDS); el azúcar estaquiosa; el agente condensante DMSO; y el inhibidor quelante/DNasa EDTA, CRL 1005 y BAK. En determinadas realizaciones específicas, el agente auxiliar es DMSO, Nonidet P40, Pluronic F68<sup>®</sup>, Pluronic F77<sup>®</sup>, Pluronic P65<sup>®</sup>, Pluronic L64<sup>®</sup> y Pluronic F108<sup>®</sup>. Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20020019358, publicada el 14 de febrero del 2012.

Ciertas composiciones de la presente invención pueden incluir adicionalmente uno o más adyuvantes antes, después o simultáneamente con el polinucleótido. El término "adyuvante" se refiere a cualquier material que tenga la capacidad de (1) modificar o aumentar la respuesta inmunitaria contra un antígeno particular o (2) aumentar o ayudar a un efecto de un agente farmacológico. Debe observarse, con respecto a las vacunas polinucleotídicas, que un "adyuvante" puede ser un material facilitador de la transfección. De manera similar, determinados "materiales facilitadores de la transfección" descritos anteriormente, también pueden ser "adyuvantes". Un adyuvante puede usarse con una composición que comprende un polinucleótido. En una pauta de sensibilización y recuerdo, como se describe en el presente documento, puede usarse un adyuvante con la preparación de inmunización, la inmunización de recuerdo o ambas. Como adyuvantes adecuados se incluyen, pero sin limitación, citocinas y factores de crecimiento; componentes bacterianos (por ejemplo, endotoxinas, en particular superantígenos, exotoxinas y componentes de la pared celular); sales basadas en aluminio; sales basadas en calcio, sílice; polinucleótidos; toxoides; proteínas séricas, virus y materiales derivados de virus, contaminantes, venenos, poloxámeros y lípidos catiónicos.

Se ha observado que una gran diversidad de materiales tienen actividad adyuvante a través de diversos mecanismos. Cualquier compuesto que pueda aumentar la expresión, antigenicidad o inmunogenicidad del polipéptido es un posible adyuvante. En el presente documento se desvela un ensayo para explorar respuestas inmunitarias mejoradas contra posibles adyuvantes. Los posibles adyuvantes que pueden explorarse con respecto a su capacidad para potenciar la respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación: vehículos inertes, tales como alumbre, bentonita, látex y partículas acrílicas; polímeros de bloque plurónicos, tales como TiterMax<sup>™</sup>; formadores de depósitos tales como adyuvante de Freund, materiales tensioactivos tales como saponina, lisolecitina, retinal, Quil A, liposomas y formulaciones poliméricas plurónicas; estimuladores de macrófagos, tales como lipopolisacáridos bacterianos; activadores del complemento de la ruta alternativa, tales como insulina, zimósán, endotoxina, y levamisol; y tensioactivos no iónicos tales como poloxámeros, copolímeros tribloque de poli(oxietileno)-poli(oxipropileno). También se incluyen como adyuvantes materiales facilitadores de la transfección tales como los descritos anteriormente.

Los poloxámeros que pueden explorarse con respecto a su capacidad para potenciar la respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, poloxámeros disponibles en el comercio tales como Pluronic<sup>®</sup> L121 (PM promedio: 4400; PM aprox. de hidrófobo, 3600; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic<sup>®</sup> L101 (PM promedio: 3800 PM aprox. de hidrófobo, 3000; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic<sup>®</sup> L81 (PM promedio: 2750; PM aprox. de hidrófobo, 2400; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic<sup>®</sup> L61 (PM promedio: 2000; PM aprox. de hidrófobo, 1800; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic<sup>®</sup> L31 (PM promedio: 1100; PM

aprox. de hidrófobo, 900; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic® L122 (PM promedio: 5000; PM aprox. de hidrófobo, 3600; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® L92 (PM promedio: 3650; PM aprox. de hidrófobo, 2700; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® L72 (PM promedio: 2750; PM aprox. de hidrófobo, 2100; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® L62 (PM promedio: 2500; PM aprox. de hidrófobo, 1800; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® L42 (PM promedio: 1630; PM aprox. de hidrófobo, 1200; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® L63 (PM promedio: 2650; PM aprox. de hidrófobo, 1800; % en peso aprox. de hidrófilo, 30%), Pluronic® L43 (PM promedio: 1850; PM aprox. de hidrófobo, 1200; % en peso aprox. de hidrófilo, 30%), Pluronic® L64 (PM promedio: 2900; PM aprox. de hidrófobo, 1800; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® L44 (PM promedio: 2200; PM aprox. de hidrófobo, 1200; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® L35 (PM promedio: 1900; PM aprox. de hidrófobo, 900; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® P123 (PM promedio: 5750; PM aprox. de hidrófobo, 3600; % en peso aprox. de hidrófilo, 30%), Pluronic® P103 (PM promedio: 4950; PM aprox. de hidrófobo, 3000; % en peso aprox. de hidrófilo, 30%), Pluronic® P104 (PM promedio: 5900; PM aprox. de hidrófobo, 3000; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® P84 (PM promedio: 4200; PM aprox. de hidrófobo, 2400; % en peso de hidrófilo, 40%), Pluronic® P105 (PM promedio: 6500; PM aprox. de hidrófobo, 3000; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® P85 (PM promedio: 4600; PM aprox. de hidrófobo, 2400; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® P75 (PM promedio: 4150; PM aprox. de hidrófobo, 2100; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® P65 (PM promedio: 3400; PM aprox. de hidrófobo 1800; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® F127 (PM promedio: 12600; PM aprox. de hidrófobo, 3600; % en peso aprox. de hidrófilo, 70%), Pluronic® F98 (PM promedio: 13000; PM aprox. de hidrófobo, 2700; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), Pluronic® F87 (PM promedio: 7700; PM aprox. de hidrófobo, 2400; % en peso aprox. de hidrófilo, 70%), Pluronic® F77 (PM promedio: 6600; PM aprox. de hidrófobo, 2100; % en peso aprox. de hidrófilo, 70%), Pluronic® F108 (PM promedio: 14600; PM aprox. de hidrófobo, 3000; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), Pluronic® F98 (PM promedio: 13000; PM aprox. de hidrófobo, 2700; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), Pluronic® F88 (PM promedio: 11400; PM aprox. de hidrófobo, 2400; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), Pluronic® F68 (PM promedio: 8400; PM aprox. de hidrófobo, 1800; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), Pluronic® F38 (PM promedio: 4700; PM aprox. de hidrófobo, 900; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%).

Los poloxámeros inversos incluyen pero sin limitación Pluronic® R 31R1 (PM promedio: 3250; PM aprox. de hidrófobo, 3100; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic® R 25R1 (PM promedio: 2700; PM aprox. de hidrófobo, 2500; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic® R 17R1 (PM promedio: 1900; PM aprox. de hidrófobo, 1700; % en peso aprox. de hidrófilo, 10%), Pluronic® R 31R2 (PM promedio: 3300; PM aprox. de hidrófobo, 3100; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® R 25R2 (PM promedio: 3100; PM aprox. de hidrófobo, 2500; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® R 17R2 (PM promedio: 2150; PM aprox. de hidrófobo, 1700; % en peso aprox. de hidrófilo, 20%), Pluronic® R 12R3 (PM promedio: 1800; PM aprox. de hidrófobo, 1200; % en peso aprox. de hidrófilo, 30%), Pluronic® R 31R4 (PM promedio: 4150; PM aprox. de hidrófobo, 3100; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® R 25R4 (PM promedio: 3600; PM aprox. de hidrófobo, 2500; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® R 22R4 (PM promedio: 3350; PM aprox. de hidrófobo, 2200; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® R 17R4 (PM promedio: 3650; PM aprox. de hidrófobo, 1700; % en peso aprox. de hidrófilo, 40%), Pluronic® R 25R5 (PM promedio: 4320; PM aprox. de hidrófobo, 2500; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® R 10R5 (PM promedio: 1950; PM aprox. de hidrófobo, 1000; % en peso aprox. de hidrófilo, 50%), Pluronic® R 25R8 (PM promedio: 8550; PM aprox. de hidrófobo, 2500; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), Pluronic® R 17R8 (PM promedio: 7000; PM aprox. de hidrófobo, 1700; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%), y Pluronic® R 10R8 (PM promedio: 4550; PM aprox. de hidrófobo, 1000; % en peso aprox. de hidrófilo, 80%).

Otros poloxámeros disponibles en el comercio que pueden explorarse con respecto a su capacidad para potenciar la respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención incluyen compuestos que son copolímeros en bloque de polietileno y propilenglicol tales como Synperonic® L121, Synperonic® L122, Synperonic® P104, Synperonic® P105, Synperonic® P123, Synperonic® P85 y Synperonic® P94; y compuestos que son nonilfenil polietilenglicol tales como Synperonic® NP10, Synperonic® NP30 y Synperonic® NP5.

Otros poloxámeros que pueden explorarse con respecto a su capacidad para potenciar la respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención incluyen un copolímero en bloque de poliéter que comprende un segmento de tipo A y un segmento de tipo B, en el que el segmento de tipo A comprende un segmento polimérico lineal de carácter relativamente hidrófilo, cuyas unidades de repetición contribuyen a una constante fragmentaria Hansch-Leo promedio de aproximadamente -0,4 o menos y tienen contribuciones de peso molecular entre aproximadamente 30 y aproximadamente 500, en el que el segmento de tipo B comprende un segmento polimérico lineal de carácter relativamente hidrófobo, cuyas unidades de repetición contribuyen a una constante de fragmento Hansch-Leo promedio de aproximadamente -0,4 o más y tiene contribuciones de peso molecular entre aproximadamente 30 y aproximadamente 500 en el que al menos aproximadamente el 80% de los engarces que unen las unidades de repetición de cada uno de los segmentos poliméricos comprenden un enlace éter, (b) un copolímero en bloque que tiene un segmento poliéter y un segmento policatión, en el que el segmento poliéter comprende al menos un bloque de tipo A y el segmento policatión comprende una pluralidad de unidades de repetición catiónicas y (c) un copolímero poliéter-policatión que comprende un polímero, un segmento poliéter y un segmento policatiónico que comprende una pluralidad de unidades de repetición catiónicas de fórmula  $\text{—NH—R}^0$ , en la que  $\text{R}^0$  es un grupo alifático de cadena directa de 2 a 6 átomos de carbono, que puede sustituirse, en el que dichos segmentos de

poliéter comprenden al menos uno de un segmento de tipo A o de tipo B. Véase la Patente de Estados Unidos N° 5.656.611 de Kabonov, *et al.*

Otros agentes auxiliares que pueden explorarse con respecto a su capacidad para potenciar la respuesta inmunitaria de acuerdo con la presente invención incluyen, pero sin limitación, Acacia (goma arábiga); el éter de polioxietileno R-O-(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>x</sub>-H (BRIJ<sup>®</sup>), por ejemplo, polietilenglicol dodecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 35, x=23), polietilenglicol dodecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 30, x=4), polietilenglicol hexadecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 52 x=2), polietilenglicol hexadecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 56, x=10), polietilenglicol hexadecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 58P, x=20), polietilenglicol octadecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 72, x=2), polietilenglicol octadecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 76, x=10), polietilenglicol octadecil éter (BRIJ<sup>®</sup> 78P, x=20), polietilenglicol oleil éter (BRIJ<sup>®</sup> 92V, x=2) y polioxil 10 oleil éter (BRIJ<sup>®</sup> 97, x=10); poli-D-glucosamina (quitosán); clorbutanol; colesterol; dietanolamina; digitonina; dimetilsulfóxido (DMSO), ácido etilendiamina tetraacético (EDTA); gliceril monoestearato; alcoholes de lanolina; mono- y diglicéridos; monoetanolamina; nonilfenol polioxietileno éter (NP-40<sup>®</sup>); octilfenoxipolietoxietanol (NONIDET NP-40 de Amresco); etil fenol poli (etilenglicol éter)<sup>n</sup>, n=11 (Nonidet<sup>®</sup> P40 de Roche); condensado de óxido de octil fenol etileno con aproximadamente 9 unidades de óxido de etileno (nonidet P40); IGEPAL CA 630<sup>®</sup> (octil fenoxi) polietoxietanol; estructuralmente igual que NONIDET NP-40; ácido oleico; alcohol oleílico; polietilenglicol 8000; polioxil 20 cetoestearil éter, aceite de ricino polioxil 35; aceite de ricino polioxil 40 hidrogenado; polioxil 40 estearato; polioxietileno sorbitán monolaurato (polisorbato 20 o TWEEN-20<sup>®</sup>); polioxietileno sorbitán monooleato (polisorbato 80 o TWEEN-80<sup>®</sup>); diacetato de propilenglicol; monoestearato de propilenglicol; sulfato de protamina; enzimas proteolíticas; dodecil sulfato sódico (SDS); monolaurato sódico; estearato sódico; derivados de sorbitán (SPAN<sup>®</sup>), por ejemplo monopalmitato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup> 40), monoestearato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup> 60), triestearato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup> 65), monooleato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup> 80) y trioleato de sorbitán (SPAN<sup>®</sup> 85); 2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno (escualeno); estaquiosa; ácido esteárico; sacarosa; surfactina (antibiótico lipopeptídico de *Bacillus subtilis*); dodecilmulti(etilenglicol éter)<sub>9</sub> (Thesit<sup>®</sup>) PM 582,9; condensado de óxido de octil fenol etileno con aproximadamente 9-10 unidades de óxido de etileno (Tritón X-100<sup>™</sup>); condensado de óxido de octil fenol etileno con aproximadamente 7-8 unidades de óxido de etileno (Tritón X-114<sup>™</sup>); tris(2-hidroxietil)amina (trolamina); y cera emulsionante.

En determinadas composiciones adyuvantes, los adyuvantes son citocinas. Una composición de la presente invención puede comprender una o más citocinas, quimiocinas o compuestos que inducen la producción de citocinas y quimiocinas, o un polinucleótido que codifica una o más citocinas, quimiocinas o compuestos que inducen la producción de citocinas y quimiocinas. Como ejemplos se incluyen, pero sin limitación, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias (CSF), eritropoyetina (EPO), interleucina 2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6), interleucina 7 (IL-7), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10), interleucina 12 (IL-12), interleucina 15 (IL-15), interleucina 18 (IL-18), interferón alfa (IFN $\alpha$ ), interferón beta (IFN $\beta$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), interferón omega (IFN $\omega$ ), interferón tau (IFN $\tau$ ), factor I inductor de interferón gamma (IGIF), factor beta de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ), RANTES (regulado después de la activación, expresado en linfocitos T normales y presumiblemente segregados), proteínas inflamatorias de macrófagos (por ejemplo MIP-1 alfa y MIP-1 beta), factor de iniciación de la elongación de *Leishmania* (LEIF) y ligando Flt-3.

En determinadas composiciones de la presente invención, la construcción de polinucleótido puede formar complejos con una composición adyuvante que comprende bromuro de ( $\pm$ )-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(Syn-9-tetradecenilo)-1-propanaminio (GAP-DMORIE). La composición también puede comprender uno o más co-lípidos, por ejemplo, 1,2-dioleil-*sn*-glicer-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1,2-difitanoil-*sn*-glicer-3-fosfoetanolamina (DPyPE) y/o 1,2-dimiristoil-glicer-3-fosfoetanolamina (DMPE). Una composición de adyuvante que comprende GAP-DMORIE y DPyPE a una proporción molar 1:1 se denomina en el presente documento Vaxfectin<sup>™</sup>. Véase, por ejemplo la Publicación PCT N° WO 00/57917.

La capacidad de un adyuvante para aumentar la respuesta inmunitaria frente a un antígeno se manifiesta típicamente mediante un aumento significativo en la protección mediada por sistema inmunitario. Por ejemplo, un aumento de la inmunidad humoral se manifiesta típicamente mediante un aumento significativo en la titulación de anticuerpos suscitados contra el antígeno y un aumento en la actividad de linfocitos T se manifiesta típicamente aumentando la proliferación celular, aumentando la producción de citocinas y/o la actividad citolítica específica de antígeno. Un adyuvante también puede modificar una respuesta inmunitaria, por ejemplo cambiando una respuesta Th<sub>2</sub> a una respuesta Th<sub>1</sub>.

Las moléculas de ácido nucleico y/o polinucleótidos, por ejemplo ADNp, ARNm, ADN lineal u oligonucleótidos, pueden solubilizarse en cualquiera de los diversos tampones. Como tampones adecuados se incluyen, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina normal, tampón Tris y fosfato sódico (por ejemplo, fosfato sódico 150 mM). Los polinucleótidos insolubles pueden solubilizarse en un ácido débil o una base débil y después diluirse al volumen deseado con un tampón. El pH del tampón puede ajustarse como sea apropiado. Además, puede usarse un aditivo farmacéuticamente aceptable para proporcionar una osmolaridad apropiada. Dichos aditivos se encuentran dentro de la competencia de un experto en la técnica. Para las composiciones acuosas usadas *in vivo*, puede usarse agua apirógena estéril. Dichas formulaciones contendrán una cantidad eficaz de un polinucleótido junto con una cantidad adecuada de una solución acuosa para preparar composiciones

farmacéuticamente aceptables adecuadas para la administración a un ser humano.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse de acuerdo con métodos conocidos. Se describen métodos de preparación adecuados, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16ª Edición, A. Osol, ed., Mack. Publishing Co., Easton, PA (1980), y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19ª Edición, A. R. Gennaro, ed., Mack. Publishing Co., Easton, PA (1995). Aunque la composición puede administrarse como una solución acuosa, también puede formularse como una emulsión, gel, solución, suspensión, forma liofilizada o cualquier otra forma conocida en la técnica. Además, la composición puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables que incluyen, por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes y conservantes.

Los siguientes ejemplos se incluyen con fines ilustrativos únicamente y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

## Ejemplos

### Materiales y métodos

Los siguientes materiales y métodos se aplican generalmente a todos los ejemplos descritos en el presente documento. En cada ejemplo, se desvelan materiales y métodos específicos si fuera necesario.

La realización práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular (incluyendo PCR), vacunología, microbiología, ADN recombinante e inmunología que se encuentran dentro de la experiencia en la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Sambrook *et al.*, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis *et al.* Patente de Estados Unidos Nº 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu *et al.* eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, London, 1987); y en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Baltimore, Maryland (1989).

### Construcción génica

Las construcciones son construcciones basadas en la información de secuencia proporcionada en el presente documento o en este campo utilizando técnicas de biología molecular convencionales, incluyendo, pero sin limitación las siguientes. En primer lugar, una serie de pares oligonucleotídicos complementarios de 80-90 nucleótidos cada uno de longitud y que abarcan la longitud de la construcción se sintetizan mediante métodos convencionales. Estos pares oligonucleotídicos se sintetizan de tal manera que después de la hibridación, forman fragmentos bicatenarios de 80-90 pares de bases, que contienen extremos cohesivos. Los extremos monocatenarios de cada par de oligonucleótidos se diseñan para hibridarse con un extremo monocatenario de un dúplex oligonucleotídico adyacente. Los diversos pares de oligonucleótidos adyacentes preparados de esta manera se permiten hibridar y aproximadamente de 5 a 6 fragmentos de dúplex oligonucleotídicos adyacentes se dejan hibridar entre sí mediante extremos monocatenarios cohesivos. Esta serie de fragmentos dúplex oligonucleotídicos hibridados se liga después entre sí y se clona en un plásmido adecuado tal como el vector TOPO® disponible de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA. Después la construcción se secuenciará mediante métodos convencionales. Las construcciones preparadas de esta manera, que comprenden de 5 a 6 fragmentos de 80 a 90 pares de bases adyacentes ligados entre sí, es decir fragmentos de aproximadamente 500 pares de bases, se preparan, de tal manera que toda la secuencia deseada de la construcción se representa en una serie de construcciones plasmídicas. Los insertos de estos plásmidos se cortan después con enzimas de restricción apropiadas y se ligan entre sí para formar la construcción final. La construcción final se clona después en un vector de clonación bacteriano convencional y se secuenciará. Como alternativa, las secuencias silvestres pueden clonarse directamente a partir de células infectadas por HCMV (por ejemplo células MRC-5, Nº de Acceso ATCC CCL-171, disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA) usando cebadores de PCR que amplifican el gen de interés. Los oligonucleótidos y cebadores indicados en el presente documento pueden diseñarse fácilmente por un experto habitual en la técnica basándose en información de secuencia proporcionada en el presente documento y en la técnica y estos pueden sintetizarse por cualquiera de diversos proveedores comerciales de nucleótidos por ejemplo Retrogen, San Diego, CA y GENEART, Regensburg, Alemania.

### Vector plasmídico

Las construcciones se insertaron en el vector de expresión eucariota V10551. Este vector se construye en un fondo pUC18 modificado (véase Yanisch-Perron *et al.* *Gene* 33: 103-119 (1985)) y contiene un gen de resistencia a kanamicina, el promotor/potenciador temprano 1 inmediato de citomegalovirus humano e intrón A, y la señal de terminación de la transcripción de la hormona del crecimiento bovina y un poliengarce para insertar genes ajenos.

Véase Hartikka, J., *et al*, *Hum. Gene Ther.* 7: 1205-1217 (1996). Sin embargo, pueden usarse otros vectores de expresión eucariotas disponibles en el mercado convencionales en la presente invención incluyendo pero sin limitación: plásmidos pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRAGER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 y pZeoSV2 (disponible de Invitrogen, San Diego CA) y el plásmido pCI (disponible de Promega, Madison, WI).

#### Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se transformó en células competentes DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* y se aisló un ADN plasmídico circular cerrado covalentemente purificado altamente mediante un procedimiento de lisis modificada (Horn, N. A., *et al*, *Hum. Gene Ther.* 6: 565-573 (1995)) seguido por una ultracentrifugación en gradiente de bromuro de CsCl etidio doble convencional (Sambrook, J., *et al*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York (1989)). Como alternativa, los ADN plasmídicos se purifican usando columnas Giga de Qiagen (Valencia, CA) de acuerdo con las instrucciones del kit. Todas las preparaciones plasmídicas carecían de ADN, ARN e impurezas de proteína cromosómicas detectables basándose en análisis en gel y en el ensayo de proteína bicinonínica (Pierce Chem. Co., Rockford IL). Los niveles de endotoxinas se midieron usando el ensayo de lisado de amebocito *Limulus* (LAL, Associates of Cape Cod, Falmouth, MA) y era menor de 0,6 unidades de Endotoxina/mg de ADN plasmídico. Las proporciones espectrofotométricas A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> de las soluciones de ADN fueron típicamente mayores de 1,8. Los plásmidos se precipitaron con etanol y se resuspendieron en una solución apropiada, por ejemplo, fosfato sódico 150 mM (para otros excipientes apropiados y agentes auxiliares, véase la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos 20020019358, publicada el 14 de febrero de 2002). El ADN se conservó a -20 °C hasta su uso. El ADN se diluyó mezclándolo con soluciones salinas 300 mM y añadiendo una cantidad apropiada de agua USP para obtener ADN plasmídico 1 mg/ml en la sal deseada a la concentración molar deseada.

#### Expresión plasmídica en líneas celulares de mamífero

Los plásmidos de expresión se analizaron *in vitro* transfectando los plásmidos en una línea celular de melanoma de ratón bien caracterizada (VM-92, conocido también como UM-449) disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. También pueden usarse otras líneas celulares humanas bien caracterizadas, por ejemplo, células MRC-5, N° de Acceso ATCC CCL-171. La transfección se realizó usando procedimientos de transfección basados en lípidos catiónicos bien conocidos por los expertos en la técnica. Otros procedimientos de transfección se conocen bien en la técnica y pueden usarse, por ejemplo electroporación y transfección mediada por cloruro de calcio (Graham F. L. y A. J. van der Eb *Virology* 52: 456-67 (1973)). Después de la transfección, los lisados celulares y los sobrenadantes de cultivo de las células transfectadas se evaluaron para comparar niveles relativos de expresión de proteínas antigénicas HCMV. Las muestras se ensayaron por transferencias de western y ELISA usando anticuerpos monoclonales anti-pp65 y anti-gB disponibles en el comercio (disponibles, por ejemplo, de Research Diagnostics Inc., Flanders NJ), para comparar tanto la calidad como la cantidad de antígeno expresado. Adicionalmente, se usaron ensayos de transfección *in vitro* para determinar el efecto de la mezcla de los diversos plásmidos que comprendían regiones codificantes optimizadas por codones que codifican pp65 y gB del HCMV sobre niveles de expresión en células humanas.

Los productos de expresión derivados de células humanas transfectadas con las diversas construcciones polinucleotídicas se examinaron con respecto al peso molecular y antígenos inmunorreactivos (es decir, para reaccionar con el antisuero HCMV). Además, se realizó una comparación de los niveles de expresión (tanto intra como extracelular) de cada clase de plásmido de expresión (por ejemplo tipo silvestre frente a optimizado por codón; truncado frente a longitud completa).

#### Inyecciones de ADN plasmídico

Los músculos cuádriceps de ratones conscientes sujetos (por ejemplo ratones BALB/c de hembra de 6-12 semanas de vida de Harlan Sprague Dawley, Indianápolis, IN) se inyectaron usando una jeringa de insulina de plástico estéril desechable y una aguja 1/2 de 28G (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, Cat N° 329430) equipada con un collar de plástico cortado a partir de una punta de micropipeta, todo como se ha descrito anteriormente (Hartikka, J., *et al*, *Hum. Gene Ther.* 7: 1205-1217 (1996)). A los ratones se les inyectó por vía bilateral en el músculo femoral rectal 25  $\mu$ g de ADN plasmídico (50  $\mu$ g total por ratón) formulado en una solución salina (por ejemplo fosfato sódico 150 mM o solución salina tamponada con Fosfato (PBS)) o con un sistema de administración basado en lípidos.

El cuidado de los animales a lo largo del estudio cumplía la "Guía del Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio", Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council, National Academy Press, Washington, D. C., 1996 así como con el Vical's Institutional Animal Care and Use Committee.

#### Correlacionados inmunitarios

Aunque la HCMV puede solamente infectar solamente células humanas, diversos modelos animales fiables de infección por HCMV se conocen en la técnica, como se revisa por Staczek, y pueden usarse con los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo para analizar la inmunogenicidad o expresión (Staczek, J. *Microbiol*

Rev 54: 247-65 (1990)). Por ejemplo, puede usarse el modelo de ratón de antígeno leucocitario humano (HLA) transgénico A\*0201.Kb (Gallez-Hawkins, G. *et al. Scand J Immunol* 55: 592-8 (2002)). Se describe un modelo de ratón de transmisión de HCMV vertical en Tang, *et al.* (Tang, JL, *et al Arch Virol* 147: 1189-95 (2002)). Diversos modelos que infectan tejido humano implantado sobre ratones desnudos o SCID inmunodeficientes se han descrito (Bidanset, DJ, *et al, J Infect Dis* 184: 192-5 (2001); Pari, GS, *et al, J Infect Dis* 177: 523-8 (1998); Mocarski, ES, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 90: 104-8 (1993)). Se han usado ratas atímicas para realizar un modelo de retinitis de citomegalovirus usando HCMV (Laycock, KA, *et al. Am J Ophthalmol* 124: 181-9 (1997)). De modo adicional, se han descrito modelos animales usando citomegalovirus animales que imitan infección por HCMV, incluyendo modelos de primates en los que se han infectado macacos rhesus con citomegalovirus de rhesus y modelos murinos infectados con citomegalovirus murino (Sequar, G. *et al. J Virol* 76: 7661-11 (2002); Lockridge, KM, *et al. J Virol* 73: 9576-83 (1999); Minamishima, Y, *et al, Microbiol Immunol* 22: 693-700 (1978)).

#### Ejemplo 1

Construcción de un polinucleótido aislado que comprende una región codificante de pp65 optimizada por codones mínimamente humana, que codifica la pp65 de citomegalovirus humano con el sitio quinasa delecionado

El VCL-6368 codifica una forma optimizada y mutada del antígeno pp65 del CMV clonado en el vector de expresión VR10551 descrito anteriormente. Este plásmido codifica una proteína de 557 aminoácidos (SEC ID N°: 6) en la que los aminoácidos Arg435-Lys438 del antígeno pp65 del CMV humano se ha delecionado. La secuencia codificante se optimizó mínimamente para la expresión en seres humanos cambiando cinco codones que rara vez se usan en seres humanos correspondientes a codones que se usan más frecuentemente. Los cinco codones y cambios son: Ala GCG por GCC, Arg CGT por CGC, Pro CCG por CCC y CCA, Ser TCG por TCC y Thr ACG por ACC. La secuencia optimizada es la SEC ID N°: 5.

El inserto de pp65delArg435-Lys438 de VCL-6368 se construyó en dos etapas por amplificación PCR de un plásmido pp65 hCMV optimizado sintetizado en Retrogen Inc. (San Diego). El plásmido TOPO-hCMV-opti-pp65 (producto Retrogen N° 8041-8081-4) se amplificó con ADN polimerasa Expandida (Boehringer Mannheim) usando el conjunto de cebadores T7 (Invitrogen Cat. N° N650-02) (SEC ID N°: 21) y 65-delta-inv (SEC ID N°: 22) y el producto resultante se purificó en gel como un fragmento de 1330 pb. Se amplificó un fragmento solapante de 400 pb a partir del mismo plásmido TOPO parental usando el conjunto de cebadores M13inv (Invitrogen Cat. N° 18430017) (SEC ID N°: 23) y 65-delta-dir (SEC ID N°: 24) y el producto se purificó en gel. Diez microlitros de cada uno de los dos fragmentos PCR se combinaron en una segunda reacción de PCR y se amplificó con el T7 (SEC ID N°: 21) y el cebador M13inv (SEC ID N°: 23) y el fragmento de 1704 pb se purificó en gel. Este fragmento se cortó con las enzimas de restricción Avr II y Nhe I y se ligó con ADN estructural plasmídico digerido de manera similar. La mezcla de ligación se transformó en *E. coli* (XL-2 de Stratagene, Inc.) y se exploró por PCR con respecto a clones recombinantes usando los cebadores VR10551FOR (SEC ID N°: 25) y hCMVpp65-R (SEC ID N°: 26). Diversos clones positivos PCR se seleccionaron y se secuenciaron. Un clon optimizado por codones mínimamente humano que codifica la forma de deleción correcta Arg435-Lys438 del antígeno pp65 del CMV humano se seleccionó y se usó para análisis posterior.

La expresión de VR6368 se observó por transfección de células VM92 y análisis de transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal anti-pp65 (ViroGen, lote N° hCMV-pp65-4). La proteína de tamaño predicho se detectó en un sobrenadante y lisado celular. Incluso aunque esta construcción codifica una proteína intracelular, una cantidad significativa termina en el sobrenadante. Este no es un fenómeno excepcional o particularmente inusual.

#### Ejemplo 2

Construcción de un polinucleótido aislado que comprende una región codificante de la glucoproteína B optimizada por codones mínimamente humano, que codifica la glucoproteína B de citomegalovirus humano secretado

El VCL-6365 codifica una forma secretada del antígeno gB del CMV humano clonado en el vector de expresión VR10551 descrito anteriormente. Este plásmido codifica los aminoácidos 1-713 del antígeno gB del CMV humano (SEC ID N°: 14). Los nucleótidos 1-2139 de la secuencia codificante gB de tipo silvestre (SEC ID N°: 11) se optimizaron mínimamente para la expresión en seres humanos cambiando cinco codones que rara vez se usan en seres humanos por cinco codones correspondientes que se usan más frecuentemente. Los cinco codones y cambios son: Ala GCG por GCC, Arg CGT por CGC, Pro CCG por CCC, CCT y CCA, Ser TCG por TCC y Thr ACG por ACC. La secuencia optimizada es la SEC ID N°: 13.

VR6365 se construyó insertando un fragmento sintetizado de 2160 pb que codifica los aminoácidos 1-713 del antígeno gB del CMV humano insertado en el vector de expresión VR-10551. Específicamente, VR-10551 se digirió con las enzimas de restricción Nhe I y Avr II, y el vector lineal de 4,5 kb se purificó en gel. El inserto gB se obtuvo por digestión de la región codificante optimizada por codones mínimamente humana que codifica el fragmento gB secretado sintetizado por Retrogen Inc. (San Diego, producto N° 7981-8031(2)-1) con las enzimas de restricción Nhe I y Avr II, purificando después en gel el fragmento resultante de 2160 pb. El vector y fragmentos insertados se ligaron entre sí, se transformaron en *E. coli* (XL-2 de Stratagene, Inc.) y se exploraron por PCR para clones recombinantes usando los cebadores 10551F (SEC ID N°: 25) y hCMVgB-R (SEC ID N°: 27). Se secuenciaron

diversos clones positivos a PCR. Un clon con la secuencia nucleotídica correcta y se denominó VR6365. Este clon codifica una forma segregada del antígeno gB del CMV humano clonado en los sitios Nhe I-Avr II del vector de expresión VR10551.

- 5 El ADN plasmídico purificado se usó para transfectar la línea celular murina VM92 para determinar la secreción de gB optimizado por codones mínimamente humano.

La secreción de gB optimizada por codones mínimamente humanos se confirmó con un ensayo ELISA usando placas recubiertas con sobrenadantes de las células VM92 transfectadas. La expresión y secreción se visualizó con suero anti-gB policlonal y un anticuerpo anti-gB monoclonal disponible en el comercio (disponible de Research Diagnostics Inc., Flanders, NJ).

# 10 Ejemplo 3

Construcción de un polinucleótido aislado que comprende una región codificante IE1 del CMV optimizado por codones humana que codifica un IE1 de citomegalovirus humano.

- 15 El plásmido VCL-6520 que comprende una construcción de ADN sintética optimizada por codones humana de 1236 pares de bases que codifica los exones 2 y 4 del gen de IE1 del CMV humano, insertado en el vector de expresión VR-10551. La secuencia de tipo silvestre para los exones 2 y 4 del gen de IE1 del CMV humano es la siguiente (SEC ID N°: 50):

**GAATTGCGCGCCACCATGGAGTCTCTGCCAAGAGAAAGATGGACCCTGATAATCCTGAC  
GAGGGCCCTTCTCCAAAGGTGCCACGGGTCAAACAGATTAAGGTTGAGTGGACATGGTG  
CGGCATAGAATCAAGGAGCACATGCTGAAAAATATACCCAGACGGAAGAGAAATTCAC  
GGCGCCTTTAATATGATGGGAGGATGTTTGCAGAATGCCTTAGATATCTTAGATAAGGTT  
CATGAGCCTTTTCAGGAGATGAAGTGTATTTGGGCTAACTATGCAGAGCATGTATGAGAAC  
TACATTGTACCTGAGGATAAGCGGGAGATGTGGATGGCTTGTATTGATGAACCTTAGGAGA  
AAGATGATGTATATGTGCTACAGGAATATAGAGTTCTTTACCAAGAACTCAGCCCTCCCT  
AAGACCACCAATGGCTGCAGTCAGGCCATGGCGGCCTGCAGAACTTGCCTCAGTGCTCC  
CCTGATGAGATTATGGCTTATGCCCGAGAAATATTTAAGATTTTGGATGAGGAGAGAGAC  
AAGGTGCTCACGCACATTGATCACATATTTATGGATATCCTCACTACATGTGTGGAAACA  
ATGTGTAATGAGTACAAGGTCACTAGTGACGCTTGTATGATGACCATGTACGGGGGCATC  
TCTCTCTTAAGTGAGTTCTGTGGGTGCTGTGCTGCTATGTCTTAGAGGAGACTAGTGTG  
ATGCTGGCCAAGCGGCCTCTGATAACCAAGCCTGAGGTTATCAGTGTAAAGAGCGCCGC  
ATTGAGGAGATCTGCATGAAGGTCTTTGCCAGTACATTCTGGGGGCCGATCCTCTGAGA  
GTCTGCTCTCCTAGTGTGGATGACCTACGGGCCATCGCGAGGAGTCAGATGAGGAAGAG  
GCTATTGTAGCCTACACTTTGGCCACCGCTGGTGTGAGCTCCTCTGATTCTCTGGTGTCA  
CCCCAGAGTCCCTGTACCCGCGACTATCCCTCTGTCTCAGTAATTGTGGCTGAGAAC  
AGTGATCAGGAAGAAAGTGAGCAGAGTGATGAGGAAGAGGAGGAGGGTGTCTCAGGAGGAG  
CGGGAGGACACTGTGTCTGTCAAGTCTGAGCCAGTGTCTGAGATAGAGGAAGTTGCCCA  
GAGGAAGAGGAGGATGGTCTGAGGAACCCACCGCCTCTGGAGGCAAGAGCACCCACCT  
ATGGTGACTAGAAGCAAGGCTGACCAGTGAGGATCC**

La inserción en la construcción VCL-6250 se sintetizó por GENEART (<http://www.geneart.de/>, Regensburg, Alemania). La VCL-6250 tiene la siguiente secuencia (SEC ID N°: 28):

**GATATCGCCGCCACCATGGAGTCTAGCGCCAAGAGGAAGATGGACCCGACAACCTGAT  
GAGGGCCCTAGCAGCAAGGTGCCCGGGTGAAGCAGATCAAGGTGCGGGTGGACATGGTG  
CGGCACAGGATCAAGGAACACATGCTGAAGAAGTACACCCAGACCGAGGAGAAGTTACCC  
GGCGCCTTCAATATGATGGGCGGCTGCCTGCAGAATGCCCTGGACATCCTGGACAAGGTG  
CACGAGCCCTTCGAGGAGATGAAGTGATCGGCCTGACCATGCAGAGCATGTACGAGAAC  
TACATCGTGCCCGAGGACAAGAGGGAGATGTGGATGGCTGCATCGACGAGCTGCGGCGG  
AAGATGATGTACATGTGCTACCGGAACATCGAGTTCTTACCAAGAACAGCGCCTTCCCC  
AAGACCACCAACGGATGCTCTCAGGCCATGGCGCCCTGCAGAACTGTGCTCAGTGACG  
CCCGATGAGATCATGGCCTACGCCCAGAAGATCTTCAAGATCCTGGACGAGGAGAGGGAT  
AAGGTGCTGACCCACATCGACCACATCTTCATGGACATCCTGACCACCTGCGTGGAGACC**

**ATGTGCAACGAGTACAAGGTGACCAGCGACGCCTGTCATGATGACAATGTACGGCGGCATC**  
**AGCCTGCTGAGCGAGTTCTGCAGAGTGCTGTGCTGCTACGTGCTGGAGGAGACCTCTGTG**  
**ATGCTGGCCAAGAGGCCCTGATCACCAAGCCTGAGGTGATCAGCGTGATGAAGCGGGG**  
**ATCGAGGAGATCTGCATGAAGGTGTTGCGCCAGTACATCCTGGAGCCGACCCTCTGAGA**  
**GTGTGTAGCCCCAGCGTGATGACCTGAGAGCCATCGCCGAGGAATCTGATGAAGAGGAG**  
**GCCATCGTGGCCTATACACTGGCCACAGCCGGCGTGTCTAGCAGCGATAGCCTGGTGAGC**  
**CCTCCTGAGTCTCCTGTGCCTGCCACAATCCCTCTGAGCAGCGTGATCGTGGCCGAGAAC**  
**AGCGATCAGGAGGAGAGCGAGCAGTCTGATGAGGAAGAGGAAGAGGAGCCAGGAGGAG**  
**AGAGAGGATACCGTGAGCGTGAAGAGCGAGCCTGTGAGCGAGATCGAAGAGGTGGCCCCCT**  
**GAGGAAGAAGAGGATGGCGCCGAGGAGCCTACAGCCAGCGCGGCAAGTCAACACACCCC**  
**ATGGTGACCAGAAGCAAGGCCGACCAAGGATCC**

VCL-6250 se construyó aislando el inserto sintético de IE1 EcoR5-BamHI y ligándolo en el vector de expresión VR-10551, descrito anteriormente. Específicamente, VR-10551 se digirió con enzimas de restricción y se purificó en gel, como se ha descrito en los ejemplos anteriores. El vector y los fragmentos del inserto se ligaron entre sí, se transformaron en células DH10B de *E. coli* (disponibles, por ejemplo, de Invitrogen). Los plásmidos recombinantes seleccionados se secuenciaron completamente usando los cebadores sintetizados de acuerdo con la siguiente tabla:

TABLA 9 – Cebadores

| Cebador | Secuencia                  | SEC ID N°     |
|---------|----------------------------|---------------|
| 2944S   | CTG CGC CTT ATC CGG TAA CT | SEC ID N°: 33 |
| 5876    | CAG TGA GGC ACC TAT CTC AG | SEC ID N°: 34 |
| 5760    | CAC CAT GAG TGA CGA CTG AA | SEC ID N°: 35 |
| 5761    | TTA ATC GCG GCC TCG AGC AA | SEC ID N°: 36 |
| 5762    | GGC TCA TGT CCA ACA TTA CC | SEC ID N°: 37 |
| 931S    | GAG ACG CCA TCC ACG CTG TT | SEC ID N°: 38 |
| 5874    | CAG ACT TAG GCA CAG CAC AA | SEC ID N°: 39 |
| 5104    | GAG CGA GGA AGC GGA AGA GT | SEC ID N°: 40 |
| 3054A   | CCG CCT ACA TAC CTC GCT CT | SEC ID N°: 41 |
| 5767    | GAG CAT TAC GCT GAC TTG AC | SEC ID N°: 42 |
| 5768    | ATG CCT CTT CCG ACC ATC AA | SEC ID N°: 43 |
| 5770    | GGC GGT AAT GTT GGA CAT GA | SEC ID N°: 44 |
| 847A    | GGC GGA GTT GTT ACG ACA TT | SEC ID N°: 45 |
| 5772    | CAT TGT GCT GTG CCT AAG TC | SEC ID N°: 46 |
|         |                            |               |
| GAseqF1 | CCA GAC CGA GGA GAA GTT CA | SEC ID N°: 47 |
| GAseqF2 | TGC TGG AGG AGA CCT CTG TG | SEC ID N°: 48 |
| GAseqR2 | TCG ATC CGC CGC TTC ATC AC | SEC ID N°: 49 |

Se usó ADN de VCL-6250 purificado para transfectar la línea celular murina VM92 para determinar la expresión de la proteína IE1. La expresión de IE1 se confirmó con un ensayo de Transferencia de Western. La expresión se visualizó con un anticuerpo anti-IE1 monoclonal disponible en el comercio (disponible de Chemicon International, Temecula, CA).

#### Ejemplo 4

##### Preparación de formulaciones de vacuna

En cada uno de los siguientes métodos, los plásmidos que codifican el antígeno del HCMV se formularon con el sistema de poloxámero descrito en el presente documento como VF-P1205-02A. VF-P1205-02A se refiere a un sistema de administración basado en poloxámero que consiste en un único polímero en bloque no iónico, CRL 1005, y un tensioactivo catiónico, BAK (solución de cloruro de benzalconio al 50%, disponible de Ruger Chemical Co. Inc.). Concentraciones finales específicas de cada componente de la fórmula se describen en los siguientes métodos para cualquiera de estos métodos, las concentraciones de cada componente pueden variarse por cálculos estequiométricos básicos conocidos por los expertos habituales en la técnica para preparar una solución final que tenga las concentraciones deseadas.

Por ejemplo, la concentración de CRL 1005 se ajusta dependiendo de, por ejemplo, la eficacia de la transfección, la eficacia de la expresión o de la inmunogenicidad, para conseguir una concentración final de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 75 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml,

aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6,5 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 7,5 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 35 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 45 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 55 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml de CRL 1005.

De manera similar la concentración de ADN se ajusta dependiendo de diversos factores, incluyendo la cantidad de una formulación a administrar, la edad y el peso del sujeto, el método y vía de administración y de la inmunogenicidad del antígeno que va a administrarse. En general, las formulaciones de la presente invención se ajustan para que tengan una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 30 mg/ml de plásmido (u otro polinucleótido). Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede tener una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml, aproximadamente 5 ng/ml, aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 600 µg/ml, aproximadamente 800 µg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 3,5, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 4,5, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 5,5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 30 mg/ml de un plásmido.

Determinadas formulaciones de la presente invención incluyen un cóctel de plásmidos, por ejemplo, una mezcla de dos o más plásmidos de VCL-6365, VCL-6368, o VCL-6520 y opcionalmente plásmidos que comprenden regiones codificantes optimizadas por codones o no optimizadas por codones que codifican otros antígenos del HCMV, por ejemplo, una parte antigénica de IE1 del HCMV y/o los plásmidos que codifican proteínas potenciadoras de la inmunidad, por ejemplo citocinas. Diversos plásmidos deseados en un cóctel se combinan entre sí en PBS u otro diluyente antes de la adición de los otros ingredientes. Además, los plásmidos pueden presentarse en un cóctel en las mismas proporciones o las proporciones pueden ajustarse basándose, por ejemplo, en los niveles de expresión relativos de los antígenos o en la inmunogenicidad relativa de los antígenos codificados. Por tanto, diversos plásmidos en el cóctel pueden estar presentes en las mismas proporciones o hasta de dos a tres veces o más, como mucho de un plásmido que puede incluirse con respecto a otros plásmidos en el cóctel.

Adicionalmente, la concentración de BAK puede ajustarse dependiendo de, por ejemplo, un tamaño de partícula deseado y estabilidad mejorada. Las formulaciones de la presente invención que contienen BAK se ajustan para tener una concentración final de BAK.

El volumen total de las formulaciones producidas por los métodos siguientes puede cambiarse de escala hacia arriba o hacia abajo seleccionando aparatos de tamaño proporcional. Finalmente, al realizar cualquiera de los métodos descritos a continuación, los tres componentes de la formulación, BAK, CRL 1005 y ADN plasmídico, pueden añadirse en cualquier orden. En cada uno de los métodos descritos a continuación, la expresión "punto de turbidez" se refiere al punto en un cambio de temperatura, u otra valoración, a la cual la solución transparente se hace turbia, es decir cuando un componente disuelto en una solución comienza a precipitarse en solución.

#### A. Termociclación de una formulación premezclada

Este ejemplo describe la preparación de una formulación que comprende BAK 0,3 mM, CRL 1005 7,5 mg/ml y 5 mg/ml de ADN en un volumen total de 3,6 ml. Los ingredientes se combinan entre sí a una temperatura por debajo del punto de turbidez y después la formulación se cicla térmicamente a temperatura ambiente (por encima del punto de turbidez) varias veces, de acuerdo con el protocolo expuesto en la figura 8.

Se prepara una solución de BAK de 1,28 mM en PBS, 846 µl de la solución colocada en un matraz de fondo redondo de 15 ml equipado con una barra de agitación magnética y la solución se agita a velocidad moderada en un baño con hielo sobre la parte superior de un agitador/termoplaca (termoplaca apagada) durante 10 minutos. Después se añadió CRL 1005 (27 µl) usando una pipeta de desplazamiento positivo de 100 µl y la solución se agitó durante 60 minutos más en hielo. Los plásmidos VCL-6365 y VCL-6368 y, opcionalmente, plásmidos adicionales que codifican, por ejemplo, antígenos HCMV adicionales, por ejemplo, VCL-6520; se mezclan entre sí a proporciones deseadas en PBS. En este ejemplo, 2,73 ml de una solución que contenía 3,2 mg/ml de VCL-6365 y 3,2 mg/ml de VLC-6398 (6,4 mg/ml de ADN total) se añadió gota a gota, lentamente, a la solución de agitación durante 1 minuto usando una pipeta de 5 ml. La solución en este punto (en hielo) es transparente dado que está por debajo del punto de turbidez del poloxámero y se agita adicionalmente en hielo durante 15 minutos. El baño con hielo se elimina después y la solución se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos para producir una solución turbia a medida que el poloxámero pasa a través del punto de turbidez.

Después el matraz se vuelve a colocar en el baño con hielo y se agita durante 15 minutos más para producir una solución transparente a medida que la mezcla se calienta por debajo del punto de turbidez del poloxámero. El baño con hielo se retira de nuevo y la solución se agita a temperatura ambiente durante 15 minutos más. La agitación durante 15 minutos por encima y por debajo del punto de turbidez (total de 30 minutos), se define como un ciclo

térmico. La mezcla se cicla seis veces más. La formulación resultante puede usarse inmediatamente, o puede colocarse en un vial de vidrio, enfriarse por debajo del punto de turbidez y congelarse a -80 °C para su uso en un tiempo posterior.

5 B. Termociclación, dilución y filtración de una formulación premezclada usando concentraciones en aumento de CRL 1005

Este ejemplo describe la preparación de una formulación que comprende BAK 0,3 mM, 34 mg/ml o 50 mg/ml de CRL 1005 y 2,5 mg/ml de ADN en un volumen final de 4,0 ml. Los ingredientes se combinaron entre sí a una temperatura por debajo del punto de turbidez, después la formulación se cicló térmicamente a temperatura ambiente (por encima de punto de turbidez) varias veces, se diluyó y se filtró de acuerdo con el protocolo indicado en la figura 9.

- 10 Los plásmidos VCL-6365 y VCL-6368 y opcionalmente plásmidos adicionales que codifican, por ejemplo, antígenos HCMV adicionales, por ejemplo, VLC-6520, se mezclan entre sí a proporciones deseadas en PBS. Para la formulación que contiene 34 mg/ml CRL 1005, 1,55 ml de una solución que contiene aproximadamente 3,2 mg/ml de VCL-6365 y aproximadamente 3,2 mg/ml de VCL-6368 (aproximadamente 6,4 mg/ml de ADN total) se colocó en el matraz de fondo redondo de 15 ml equipado con una barra de agitación magnética, y para la formulación que
- 15 contenía 50 mg/ml de CRL 1005, 1,52 ml de una solución que contenía aproximadamente 3,2 mg/ml de VCL-6365 y aproximadamente 3,2 mg/ml de VCL-6368 (aproximadamente 6,4 mg/ml de ADN total) se colocó en el matraz de fondo redondo de 15 ml equipado con una barra de agitación magnética y las soluciones se agitaron con velocidad moderada en un baño con hielo sobre la parte superior de un agitador/placa térmica (placa térmica apagada) durante 10 minutos. CRL 1005 (68 µl para 34 mg/ml de concentración final, y 100 µl para 50 mg/ml de
- 20 concentración) final se añade después usando una pipeta de desplazamiento positivo de 100 µl y la solución se agitó durante 30 minutos más en hielo. Se preparó una solución de 1,6 mM de BAK en PBS, y después se añadieron 375 µl gradualmente, lentamente, a las mezclas de 34 mg/ml o 50 mg/ml de agitación durante 1 minuto usando una pipeta de 1 ml. Las soluciones en este punto son transparentes dado que están por debajo del punto de turbidez del poloxámero y se agitan en hielo durante 30 minutos. Después se retiraron los baños de hielo, las soluciones se agitaron a temperatura ambiente durante 15 minutos para la producción de soluciones turbias a medida que el poloxámero pasa a través del punto de turbidez.
- 25

Después los matraces se colocaron de nuevo en los baños con hielo y se agitaron durante otros 15 minutos para producir soluciones transparentes a medida que las mezclas se enfriaron por debajo del punto de turbidez del poloxámero. Los baños con hielo se retiraron de nuevo y las soluciones se agitaron durante 15 minutos más. La agitación durante 15 minutos por encima y por debajo del punto de turbidez (total de 30 minutos), se define como un ciclo térmico. Las mezclas se ciclaron dos veces más.

30

- Mientras tanto, dos dispositivos de filtración al vacío desechables Sterifiip® de 50 ml, cada uno con una membrana Millipore Express® de 0,22 µm (disponible de Millipore, cat N° SCGP00525) se colocaron en un cubo con hielo, con una línea de vacío unida y se dejó durante 1 hora para permitir que los dispositivos se equilibrasen a la temperatura del hielo. Las formulaciones de poloxámeros se diluyeron después a 2,5 mg/ml de ADN con PBS y se filtraron al vacío.
- 35

Las formulaciones resultantes se usaron inmediatamente, o pueden transferirse a viales de vidrio, enfriarse por debajo del punto de turbidez y congelarse a -80 °C para su uso en un momento posterior.

C. Un método simplificado sin termociclación

- 40 Este ejemplo describe una preparación simplificada de una formulación que comprende BAK 0,3 mM, CRL 7,5 mg/ml de CRL 1005 y 5 mg/ml de ADN en un volumen total de 3,6 ml. Los ingredientes se combinaron entre sí a una temperatura por debajo del punto de turbidez y después la formulación se filtró simplemente y después se usó o se conservó, de acuerdo con el protocolo indicado en la figura 10.

- 45 Se preparó una solución de BAK de 0,77 mM en PBS, y se colocaron 780 µl de la solución en un matraz de fondo redondo de 15 ml equipado con una barra de agitación magnética, y la solución se agitó con velocidad moderada, en un baño con hielo en la parte superior de un agitador/placa térmica (placa térmica apagada) durante 15 minutos. Después se añadió CRL 1005 (15 µl) usando una pipeta de desplazamiento positivo de 100 µl y la solución se agitó durante 60 minutos más en hielo. Los plásmidos VCL-6365 y VCL-6368, y opcionalmente los plásmidos adicionales que codifican, por ejemplo, antígenos HCMV adicionales, por ejemplo VLC-6250, se mezclaron entre sí a las
- 50 proporciones deseadas en PBS. En este ejemplo, aproximadamente 1,2 ml de una solución que contenía aproximadamente 4,1 mg/ml de VCL-6365 y aproximadamente 4,2 mg/ml de VCL-6368 (aproximadamente 8,3 mg/ml de ADN total) se añadió gota a gota, lentamente, a la solución de agitación durante 1 minuto usando una pipeta de 5 ml. La solución en este punto (en hielo) es transparente dado que está por debajo del punto de turbidez del poloxámero y se agitó posteriormente en hielo durante 15 minutos.

- 55 Mientras tanto, dispositivos de filtración al vacío desechables Sterifiip® de 50 ml, cada uno con una membrana Millipore Express® de 0,22 µm (disponible de Millipore, cat N° SCGP00525) se colocaron en un cubo con hielo, con una línea de vacío unida y se dejó durante 1 hora para permitir que los dispositivos se equilibrasen a la temperatura

del hielo. Después la formulación de poloxámero se filtró al vacío, por debajo del punto de turbidez y después se dejó calentar por encima del punto de turbidez. Las formulaciones resultantes pueden usarse inmediatamente, o pueden transferirse a viales de vidrio, enfriarse por debajo del punto de turbidez y después congelarse a -80 °C para su uso en un momento posterior.

## 5 Ejemplo 5

### Inmunización de animales

La inmunogenicidad de los productos de expresión codificados por uno o más de los polinucleótidos optimizados por codones descritos en los Ejemplo 1, 2 y 3 y opcionalmente los polinucleótidos optimizados por codones descritos en el Ejemplo 4, se valoran basándose en la capacidad de cada plásmido para generar una respuesta inmunitaria *in vivo*. Los plásmidos se ensayaron individualmente y en combinaciones inyectando construcciones sencillas así como construcciones múltiples. Las inmunizaciones se realizaron inicialmente en animales, tales como ratones, conejos, cabras, ovejas, primates y otros animales adecuados mediante inyecciones intramusculares (IM). Se recogió suero de los animales inmunizados y se cuantificó la respuesta inmunitaria. Los ensayos de inmunogenicidad incluyeron adicionalmente medir la titulación de anticuerpos, neutralizar la titulación de anticuerpos, la producción de citocinas de linfocitos T y actividad citolítica de linfocitos T. La correlación con niveles protectores en seres humanos se realizó de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Véase “correlacionados inmunológicos”, anteriormente.

#### A. Formulaciones de ADN

El ADN plasmídico se formuló mediante cualquiera de los métodos descritos en el Ejemplo 4. Como alternativa, se preparó ADN plasmídico como se ha descrito anteriormente y se disolvió a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 1 mg/ml, en PBS con o sin lípidos catiónicos facilitadores de la transfección, por ejemplo, DMRIE/DOPE a una proporción de masa de ADN: lípido de 4:1. Las formulaciones de ADN alternativas incluyen fosfato sódico 150 mM en lugar de PBS, adyuvantes, por ejemplo Vaxfectin™ a una proporción de masa de ADN: Vaxfectin™ de 4:1, monofosforil lípido A (endotoxina destoxificada) de *S. minnesota* (MPL) y trehalosadiorinomicolato AF (TDM) en aceite al 2% (escualeno)-agua-Tween 80 (MPL + TDM, disponible de Sigma/Aldrich, St Louis, MO, (catálogo N° M6536)), una formulación de monofosforil lípido A solubilizada (AF, disponible de Corixa) o cloruro de ( $\pm$ )-N-(3-acetoxipropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(octiloxo)-1-propanaminio (compuesto N° VC1240) (véase Shriver, J. W. *et al*, *Nature* 415: 331-335 (2002), y Solicitud P.C.T. N° WO 02/00844 A2).

#### B. Inmunizaciones con animales

Los plásmidos de ADN de tipo silvestre y optimizados por codones que codifican gB y pp65 secretados y sus respectivas variantes mutantes, como se ha descrito anteriormente, se inyectaron en ratones BALB/c como plásmidos sencillos, como ADN en PBS o formulados con el sistema de administración basado en poloxámero: ADN 3 mg/ml, 34 o 50 mg/ml de CRL 1005 y BAK 0,3 mM. Grupos de 10 ratones se inmunizaron tres veces, a intervalos bisemanales, y se obtuvo suero para determinar las titulaciones de anticuerpo con respecto a cada uno de los antígenos. También se incluyeron grupos en los que los ratones estaban inmunizados con una preparación trivalente, cada una conteniendo tres plásmidos de igual masa. El diseño del estudio de cada plásmido se muestra en la Tabla 10 y en la Tabla 11 se muestra un protocolo de inmunización típico.

TABLA 10 – Diseño del estudio para plásmidos

| Grupo                                       | Número de animales |
|---------------------------------------------|--------------------|
| ADN en PBS                                  | 10                 |
| ADN formulado con CRL 1005 y BAK            | 10                 |
| Estructura plasmídica (VR10551), ADN en PBS | 5                  |

TABLA 11 – Problema de inmunización

| Día | Inmunización                                                                    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------|
| -3  | Pre-sangrado                                                                    |
| 0   | Inyecciones plasmídicas, intramuscular, bilateral en recto anterior, 25 µg/pata |
| 14  | Inyecciones plasmídicas, intramuscular, bilateral en recto anterior, 25 µg/pata |
| 20  | Recogida de suero                                                               |
| 28  | Inyecciones plasmídicas, intramuscular, bilateral en recto anterior, 25 µg/pata |
| 35  | Recogida de suero                                                               |

Las titulaciones de anticuerpo en suero se determinan por ELISA con proteínas recombinantes o sobrenadantes de transfección y lisados de células VM-92 transfectadas o lisados de células infectadas con virus.

#### C. Producción de antisuero pp65 y gB del HCMV en animales

- 5 Se preparó ADN plasmídico que codificaba pp65, gB, IE1 del HCMV o fragmentos variantes o derivados de los mismos de acuerdo con el esquema de inmunización descrito anteriormente y se inyectó en un animal adecuado para generar anticuerpos policlonales. El suero se recogió y el anticuerpo se tituló como se ha indicado anteriormente. La titulación de los anticuerpos peptídicos anti-HCMV en suero de animales inmunizados puede aumentarse por selección de anticuerpos anti-peptídicos, por ejemplo, por adsorción con el péptido en un soporte sólido y elución de los anticuerpos seleccionados de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

También se produjeron anticuerpos monoclonales usando tecnología de hibridoma (Kohler, *et al.*, *Nature* 256: 495 (1975); Kohler, *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6: 511 (1976); Kohler, *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6: 292 (1976); Hammerling, *et al.*, en *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N. Y., (1981), páginas 563-681. En general, dichos procedimientos implican inmunizar un animal (preferentemente un ratón) como se ha descrito anteriormente. Las células adecuadas pueden reconocerse por su capacidad para unirse a anticuerpos anti-HCMV pp65, gB o IE1. Dichas células pueden cultivarse en cualquier medio de cultivo tisular adecuado; sin embargo, se prefiere cultivar células en el medio de Eagle modificado por Earle complementado con suero bovino fetal al 10% (inactivado a aproximadamente 56 °C), y complementado con aproximadamente 10 g/l de aminoácidos no esenciales, aproximadamente 1000 U/ml de penicilina y aproximadamente 100 g/ml de estreptomycin. Los esplenocitos de dichos ratones se extrajeron y se fusionaron con una línea celular de mieloma adecuada. Puede emplearse cualquier línea celular de mieloma adecuada de acuerdo con la presente invención; sin embargo, es preferente emplear la línea celular de mieloma parental (SP2/0), disponible de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Rockville, Maryland. Después de la fusión, las células de hibridoma resultantes se conservan selectivamente en medio HAT y después se clonan por dilución limitante como se describe por Wands *et al.*, *Gastroenterology* 80: 225-232 (1981). Las células de hibridoma obtenidas a través de dicha selección se someten a ensayo después para identificar clones que secretan anticuerpos capaces de unirse a pp65 o gB del HCMV.

Como alternativa, pueden producirse anticuerpos adicionales capaces de unirse a pp65 o gB de HCMV en un procedimiento en dos etapas a través del uso de anticuerpos anti-idiotípicos. Dicho método usa el hecho de que los anticuerpos son propiamente antígenos y que, por lo tanto, es posible obtener un anticuerpo que se una a un anticuerpo secundario. De acuerdo con este método, se usan anticuerpos específicos de pp65 o gB del HCMV para inmunizar un animal, preferentemente un ratón. Después los esplenocitos de dicho animal se usan para producir células de hibridoma, y las células de hibridoma se exploran para identificar clones que produzcan un anticuerpo cuya capacidad para unirse al anticuerpo específico de la proteína HCMV pueda bloquearse mediante pp65 o gB del HCMV. Dichos anticuerpos comprenden anticuerpos anti-idiotípicos del anticuerpo específico de proteína del HCMV y pueden usarse para inmunizar un animal para inducir la formación de anticuerpos específicos gB o pp65 del HCMV adicionales.

Se apreciará que Fab y F(ab')<sub>2</sub> y otros fragmentos de los anticuerpos pueden usarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Dichos fragmentos se producen típicamente por escisión proteolítica, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Como alternativa, pueden producirse fragmentos de unión a pp65 o gB del HCMV a través de la aplicación de la tecnología de ADN recombinante o a través de química sintética.

Puede ser preferible usar anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados". Dichos anticuerpos pueden producirse usando construcciones genéticas derivadas de células de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente. En la técnica se conocen métodos para producir anticuerpos quiméricos.

Véase, para una revisión, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi, *et al*, *Bio Techniques* 4: 214 (1986); Cabilly, *et al*, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Taniguchi, *et al*, documento EP 171496; Morrison, *et al*, documento EP 173494; Neuberger, *et al*, documento WO 8601533; Robinson, *et al*, documento WO 8702671; Boulianne, *et al*, *Nature* 312: 643 (1984); Neuberger, *et al*, *Nature* 314: 268 (1985).

- 5 Estos anticuerpos se usan, por ejemplo, en ensayos de diagnóstico, así como un reactivo de investigación o inmunizar adicionalmente animales para generar anticuerpos anti-idiotípicos específicos contra el HCMV. Como ejemplos no limitantes de usos de anticuerpos anti-HCMV se incluyen use en transferencias de Western, ELISA (competitivo, en sándwich y directo), inmunofluorescencia, microscopia inmunoelectrónica, radioinmunoensayo, inmunoprecipitación, ensayos de aglutinación, inmunodifusión, inmunoelectrofóresis y mapeo epitópico (Weir, D. *Ed. Handbook of Experimental Immunology*, 4<sup>a</sup> ed. Vols. I y II Blackwell Scientific Publications (1986)).

#### Ejemplo 6

Análisis con RT-PCR en tiempo real cuantitativa de la expresión de ARNm de construcciones que codifican pp65 y gB del HCMV y fragmentos, variantes y derivados de los mismos

- 15 La cuantificación de los niveles de ARNm expresados a partir de construcciones pp65, gB e IE1 del HCMV es un marcador biológico valioso para la actividad génica. Pueden usarse diversos métodos para medir los niveles de ARNm, tales como transferencia de Northern, transferencias por ranuras y otras técnicas conocidas por los expertos en la técnica. Sin embargo, un método rápido basado en RT-PCR en tiempo real proporciona un medio eficaz, fiable para controlar la actividad génica. Un sistema de este tipo es el ensayo RT-PCR de TaqMan<sup>®</sup> usado con un Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM<sup>®</sup>, ambos disponibles de Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA).
- 20 En resumen, el ARN se extrajo usando técnicas convencionales o comercialmente disponibles. Después de la extracción, el ARN se dividió en alícuotas en tubos ópticamente transparentes o pocillos de una placa de microtitulación que contenía los tampones proporcionados, enzimas y reactivos proporcionados por el kit apropiado, por ejemplo, el Kit RT-PCR de TaqMan<sup>®</sup> Gold (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Adicionalmente, se añaden los cebadores y sondas específicos de la construcción, que pueden diseñarse por un experto en la técnica basándose en las secuencias descritas en el presente documento, o en el mercado, por ejemplo, Cebadores ABI PRISM<sup>®</sup> y Servicio de Síntesis de Sondas TaqMan<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA). Las muestras se colocan en el Sistema de Detección de Secuencia ABI PRISM<sup>®</sup>, un termociclador acoplado a un láser capaz de excitar los fluoróforos presentes en la sonda y un sistema de detección adecuado. Inicialmente, el ARN se transcribe a la inversa en ADN, después la ADN polimerasa termoestable y cebadores específicos de secuencia contenidos en la solución de reacción inician los ciclos de amplificación controlados por temperatura. La sonda usada para la detección del producto de amplificación se marca con un fluoróforo de baja energía (el indicador) y un fluoróforo de alta energía (el interruptor), que impide que las emisiones del indicador se detecten si el interruptor está estrechamente asociado con el indicador a través de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Al inicio del ciclo de reacción, la sonda está en exceso, de tal manera que la mayoría permanece no hibridada e intacta, dando como resultado ninguna señal. Sin embargo, a medida que el producto de ADN se acumula, una mayor proporción de la sonda se une al ADN. La sonda unida se degrada después mediante actividad 5' nucleasa de la ADN polimerasa usada para la amplificación, que libera el indicador del interruptor y crea una señal detectable. A medida que la reacción PCR avanza y que el producto de amplificado se acumula, más sonda se degrada, induciendo una mayor señal que se registra. El número de ciclos de amplificaciones necesario para detectar una señal (Ct) es directamente proporcional a la cantidad de molde de partida o construcción de ARNm. Comparando los valores Ct entre la muestra y controles de partida con una cantidad conocida de ARN, es posible cuantificar la cantidad de ARNm expresado en las células transfectadas con los plásmidos que contienen las construcciones de HCMV. Véase the Applied Biosystem, Inc. tutorial "Real-Time PCR Vs. Traditional PCR" en <http://www.appliedbiosystems.com/support/tutorials/>, visitada el 15 de noviembre, 2002. Otro sistema de detección en tiempo real incluye sondas "Molecular Beacon", véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 6.103.476 de Kramer y Tyagi.

- Para los estudios *in vitro*, se siembran células adecuadas en placas de cultivo tisular de 24 pocillos. Una vez que las células están a una densidad celular apropiada, el ADN plasmídico que contiene construcciones de HCMV optimizadas por codones y no optimizadas por codones o controles apropiados, por ejemplo controles negativos que contienen la estructura plasmídica con ninguna construcción HCMV, se usa para transfectar en las células. En diversos puntos temporales postransfecciones, las células se recogen para la extracción de ARN, por ejemplo con tiocianato de guanidinio 4 M seguido por extracción con fenol. Las células se recogen a partir de estudios *in vivo* y también se usan para extracción de ARN. El ARN total extraído se cuantifica midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm, diluida de acuerdo con las instrucciones del kit Taqman<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA), y se divide en alícuotas en placas de 386 pocillos adecuadas para PCR en tiempo real que contiene los tampones, nucleótidos y enzimas necesarios. Los controles que contienen cantidades conocidas de ARN de partida se incluyen en el ensayo y opcionalmente puede incluirse un patrón interno en las muestras para garantizar la calidad. Este patrón interno es típicamente un producto génico no relacionado, normalmente un ARN endógeno abundante. También se incluyen cebadores y sondas específicos para la construcción y opcionalmente patrón interno. Los cebadores se diseñan y sintetizan de la misma manera que los cebadores de PCR convencionales, que es una tarea

habitual para un experto en la técnica. Para garantizar la reproducibilidad y especificidad, se usan conjuntos de cebadores múltiples en la reacción, cada uno dirigiéndose a regiones diferentes de la construcción. El cebador se sintetiza de una manera similar, pero los fluoróforos, por ejemplo FAM y TAMRA, se unen covalentemente mediante métodos convencionales. La reacción avanza como se ha descrito anteriormente, y los valores Ct resultantes de las muestras se comparan con los de los controles. Las cantidades de partida del ARNm se extrapolan usando los valores Ct control.

Después de la cuantificación del ARNm, el nivel de ARNm se correlaciona con la expresión de proteína, tanto intracelular como segregada. El sobrenadante se recoge del medio de cultivo tisular (o del sobrenadante de células centrifugadas recogidas *in vivo*) en diversos momentos post-transfección. Adicionalmente, un número de células adecuado se conserva después de la recogida para su uso en la extracción de proteínas. Para medir los niveles de proteína del HCMV producida por las células transfectadas se utilizan transferencias de Western, transferencias por ranuras, ELISA y otras técnicas de cuantificación de proteínas.

#### Ejemplo 7

Demostración de inmunogenicidad de plásmidos que codifican antígenos de CMV humanos

#### Procedimiento experimental general

El procedimiento experimental para el siguiente ejemplo es como se ha descrito anteriormente, con parámetros particulares y materiales empleados como se describe en el presente documento.

#### Plásmidos

Como se ha descrito anteriormente, se insertaron construcciones en el vector de expresión VR10551.

El VR10551 es un vector de expresión sin ningún inserto transgénico (estructura para los plásmidos HCMV).

El VR6365 contiene la secuencia codificante de una versión segregada del gB del CMV humano (aminoácidos 1-713) clonado en el vector de expresión VR10551 (Ejemplo 1). El ADN se prepara usando kits de purificación de plásmidos Qiagen y se caracterizó y se formuló con el sistema de administración basado en poloxámero VF-P1205-02A.

El VR6368 contiene la secuencia codificante del pp65 HCMV de longitud completa delecionado de restos <sup>435</sup>RKRK<sup>438</sup> en el supuesto dominio quinasa, clonado en el vector de expresión VR10551 (Ejemplo 2). El ADN se preparó usando kits de purificación de plásmidos Qiagen y se caracterizó y formuló con el sistema de administración basado en poloxámero VF-P1205-02A como se ha indicado anteriormente.

#### Formulación de poloxámero

El sistema de administración basado en poloxámero VF-P1205-02A se formuló usando un protocolo equivalente al del Ejemplo 4B, con un ADN inicial, poloxámero y concentración BAK de 5,0 mg/ml, 7,5 mg/ml y 0,3 mM respectivamente. Las formulaciones se diluyeron con PBS a temperatura ambiente a las concentraciones experimentales necesarias antes de la inyección.

#### Régimen de vacunación

Grupos de nueve ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de vida (Harlan-Sprague-Dawley) recibieron inyecciones intramusculares (recto anterior) que contenían 100 µg de ADN pp65, 100 µg de ADN gB o 100 µg de cada uno de ADN de pp65 y gB administrado con PBS o la formulación de poloxámero CRL 1005 descrito anteriormente. Los ratones de control recibieron 100 µg de ADN pp65 o 100 µg de ADN gB mezclada con 100 µg de vector de ADN no codificante (VR10551) administrado con PBS o VF-P1205-02A. Todos los ratones recibieron dos vacunaciones (administradas los días 0 y 13) que contenían un total de 200 µg de ADN, 100 µg de ADN pp65 y los 100 µg de ADN gB. Se recogieron sueros después de la primera (día 11) y segunda (día 22) vacunación, y las respuestas de anticuerpos específicas para gB y pp65 se midieron por ELISA y análisis de inmunotransferencia, respectivamente.

#### Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) gB recombinante

El suero se recogió de los ratones vacunados de acuerdo con el régimen descrito anteriormente. Las titulaciones IgG Anti-gB se determinaron usando un Ensayo Inmunoabsorbente Asociado a Enzima (ELISA) gB CMV recombinante.

Placas de noventa y seis pocillos, de EIA (Inmunoensayo Enzimático) de alta unión, semiárea, se recubrieron con gB del CMV recombinante a una concentración de 0,05 µg/pocillo (50 µl/pocillo) en tampón de Solución Salina tamponada con Borato (BBS) a 4 °C durante una noche. Las placas se recubrieron con un sellador de placa adhesivo en todas las incubaciones. Después del recubrimiento, las placas se transfirieron a toallitas de papel y 100 µl de tampón de bloqueo (BSA al 0,1% [p/v] en BBS) se añadieron a cada pocillo. Las placas selladas se incubaron

a temperatura ambiente durante 2 horas y después se conservaron a 4 °C hasta que el suero se hubo diluido. Los sueros se diluyeron en BSA al 0,5% (p/v) en BBS en tubos Eppendorf y se mezclaron por inversión y se agitaron vorticialmente brevemente. Las placas bloqueadas se transfirieron y se añadieron 100 µl de suero diluido a cada pocillo. Las placas se sellaron y se incubaron durante una noche a 4 °C. Después las placas se lavaron en un ciclo de cuatro lavados en un lavador de placa automatizado con Tween-20 al 0,1% (v/v) en BBS y se transfirieron en toallitas de papel. Se diluyó anticuerpo secundario anti Fc IgG de ratón marcado con fosfatasa alcalina 1:2000 en BSA al 0,5% (p/v) en BBS y se añadieron 80 µl de anticuerpo secundario diluido a cada pocillo. Las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. De nuevo las placas se lavaron en el ciclo de cuatro lavados en el lavador de placa automatizado y se transfirieron a toallitas de papel. Cincuenta microlitros de solución de desarrollo (1 mg/ml de paranitrofenil fosfato en tampón de bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,8 y MgCl<sub>2</sub> 1 mM) se añadió a cada pocillo, las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente. Se leyó la absorbancia a 405 nm, A<sub>405</sub> (una sola longitud de onda) en el lector de placa. Las titulaciones se determinaron como la dilución a la cual el valor de absorbancia medio del suero inmunitario era al menos dos veces que la media del valor de absorbancia para el suero preinmune a una dilución de 1:100.

#### 15 Inmunotransferencias para detectar pp65

Se prepararon lisados de células VM92 de melanoma murino transfectadas con VR6368 o VR10551 directamente en tampón de muestra LDS 1X NuPAGE y se conservaron a -80 °C hasta necesitarse. Después de descongelar a temperatura ambiente, un décimo del volumen de muestra de ditioneitol 0,5 mM se añadió a cada muestra. Después, las muestras se calentaron a 85 °C durante 10 minutos y se enfriaron inmediatamente en hielo antes de cargar en geles Bis-Tris de 4-12% NuPAGE. Se realizó electroforesis a 200 V durante 60 minutos a temperatura ambiente. Para la transferencia de proteínas, membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se sumergieron primero en metanol durante 30 s y después se equilibraron en tampón de transferencia 1X NuPAGE que contenía metanol al 20% (v/v). Las proteínas se transfirieron de los geles a membranas PVDF a 30 V durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la transferencia de las proteínas, las membranas se aclararon en agua mili-Q y después se bloquearon durante 45 minutos a temperatura ambiente en BSA al 1% (p/v) en BBS en un agitador orbital. Después de bloquear, las membranas se conservaron a 4 °C en BSA al 1% (p/v) en BBS durante no más de 24 horas. Las transferencias se cortaron en tiras y se incubaron en suero inmune de ratón diluido en BSA 0,5% (p/v) en BBS a temperatura ambiente durante una noche en un agitador orbital. Después de lavar en BBS, las tiras se incubaron en anticuerpo secundario (Fcγ anti IgG de ratón de cabra conjugado con fosfatasa alcalina) a temperatura ambiente durante 2,5 h. Después las tiras se lavaron de nuevo en BBS y se desarrollaron en solución de sustrato de fosfatasa alcalina durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después las tiras se aclararon cuidadosamente en agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente entre toallitas de papel.

Se vacunaron ratones con plásmido gB (VR6365) o una combinación de plásmido gB/pp65, como se ha descrito anteriormente. Las titulaciones anti IgG gB, medidas después de dos vacunaciones en ratones vacunados con plásmido gB (VR6365), en solitario o en combinación con plásmido pp65 (VR6368) se proporcionan a continuación:

TABLA 12 – Titulaciones anti IgG gB después 2ª vacunación

| Grupo                                | titulación media recíproca (intervalo) | titulación recíproca de la media geométrica |
|--------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| gB (formulación poloxámero)          | 42.667 (12.800-102.400)                | 34.836                                      |
| Combinación (formulación poloxámero) | 17.244 (1.600-25.600)                  | 13.825                                      |
| gB (ADN desnudo)                     | 29.867 (12.800- 51.200)                | 27.650                                      |
| Combinación (ADN desnudo)            | 10.667 (3.200-25.600)                  | 8.709                                       |

Todos los ratones vacunados con ADN plasmídico que codifica gB del HCMV en solitario o en combinación, con o sin VF-P1205-02A, tuvo titulaciones anti IgG gB detectables después de dos inyecciones de ADN. El suero de ratones inyectados con ADN de pp65 solamente se agrupó y ensayó. La actividad de unión para el grupo único pp65 fue la misma que para el suero presangrado lo que indicaba que los anticuerpos específicos de gB no eran detectables.

#### Inmunotransferencias de pp65

El suero de los ratones recogido después de la segunda vacunación con ADN se sometió a ensayo en inmunotransferencias de lisados de células transfectadas con el plásmido pp65 (VR6368) como se ha descrito anteriormente para determinar cualitativamente la diferencia en las respuestas de anticuerpo contra pp65 en ratones vacunados con VR6368 en solitario y ratones vacunados con la combinación plasmídica. En el primer conjunto de

inmunotransferencias, el suero agrupado de cada grupo de ratones vacunado con VR6368 se sometió a ensayo a diluciones de 1:200, 1:400, 1:800, 1:1000 y 1:2000. Una muestra de suero agrupado de ratones vacunados con VR6365 (gB) formulado en VF-P1205-02A se incluyó como un control negativo. Se incluyó un anticuerpo monoclonal murino específico de pp65 como un control positivo. Cada tira de inmunotransferencia tenía un carril de patrones de peso molecular, conteniendo un carril lisado celular transfectado con VR6368 y un carril de control con lisado celular transfectado con VR10551. Todos los ratones (nueve de nueve) vacunados con ADN pp65 formulados con VF-P1205-02A tuvieron anticuerpo detectable contra pp65 por inmunotransferencia cuando los sueros se sometieron a ensayo a una dilución de 1:200. Seis de nueve ratones vacunados con la vacuna plasmídica HCMV bivalente formulada con VF-P1205-02A tuvo anticuerpos detectables contra pp65 por inmunotransferencia cuando se sometió a ensayo a una dilución de 1:200. La titulación de la inmunotransferencia de suero agrupado de los ratones vacunados con ADN de pp65 formulado con VF-P1205-02A, o vacuna plasmídica HCMV bivalente formulada con VF-P1205-02A no reveló ninguna diferencia notable en la respuesta de anticuerpos contra pp65 entre los grupos. No se detectó anticuerpo de pp65 en ratones vacunados con ADN gB en solitario.

Por tanto, los plásmidos VR6365 (gB) y VR6368 (pp65) suscitaron la producción de anticuerpos específicos de antígeno en ratones que recibieron dos inyecciones de plásmidos en solitario o en combinación. Aunque no se puede cuantificar la respuesta de anticuerpo anti-pp65 usando inmunotransferencias, se demuestra que la mayoría de los ratones tuvieron una respuesta de anticuerpo detectable contra pp65 y que la combinación de los dos plásmidos no dio como resultado la supresión completa de la respuesta contra pp65. Las respuestas de anticuerpos contra pp65 en este estudio sirvieron como una lectura adicional para la confirmación de producción de esta proteína *in vivo* después de la vacunación con VR6368.

#### Ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$ específico de pp65

Las respuestas de linfocitos T al pp65 codificado por ADN se determinaron mediante ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$ . Los esplenocitos de ratones vacunados se estimularon con dos grupos diferentes de péptidos solapantes que, en su conjunto, abarcaban toda la proteína pp65 y contendrían todos los epítomos de linfocitos T posibles. Por lo tanto, el tipo de linfocitos T (por ejemplo CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>) que producen IFN- $\gamma$  en respuesta de la estimulación peptídica no puede diferenciarse por este método de ensayo. Teóricamente, estos péptidos pueden presentarse en el contexto de MHC clase I o clase II, estimulando así tanto linfocitos T CD8<sup>+</sup> como CD4<sup>+</sup> dentro de la misma preparación de esplenocitos.

En estos ensayos el número de puntos específicos de antígeno fue normalmente >10 veces que el número en los pocillos de control. Las células que producen IFN- $\gamma$  se detectaron en preparaciones de esplenocitos de ratones vacunados con VR6368 estimulados con los conjuntos de péptidos, pero se detectaron aproximadamente tres veces tantas manchas en respuesta al Grupo I que al Grupo II. De algunas a ninguna mancha se produjo por esplenocitos de ratones vacunados con gB en respuesta a estimulación con los grupos de péptidos.

Estos datos demuestran que el componente pp65 de la vacuna de ADN contra el HCMV se expresó *in vivo* a niveles suficientes para inducir respuestas inmunitarias celulares, tanto cuando se administra en solitario como en combinación en la formulación VF-P1205-02A.

#### Ejemplo 8

##### Confirmación de la inmunogenicidad de plásmidos que codifican antígenos CMV humanos

##### Procedimiento experimental general

El procedimiento experimental para los siguientes ejemplos es como se ha descrito anteriormente, con parámetros y materiales particulares empleados como se describe en el presente documento.

##### Plásmidos

Como se describe anteriormente, las construcciones VR6365 y VR 6368 se construyeron insertando los insertos apropiados en el vector de expresión VR10551 y se formularon con formulación de poloxámero VF-P1205-02A registradas.

##### Régimen de vacunación

Grupos de nueve ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de vida (Harlan-Sprague-Dawley) recibieron inyecciones bilaterales, intramusculares (recto anterior) (50  $\mu$ l/extremidad) que contenía ADN plasmídico que codifica pp65, gB o pp65 y gB con o sin VF-P1205-02A los días 0, 21 y 49. Cada ratón recibió 200  $\mu$ g de ADN por vacunación. Para las formulaciones que contienen un solo plásmido codificante gB o pp65, se incluyeron 100  $\mu$ g de ADN blanco (VCL10551), que sirvió como una carga. El efecto del ADN blanco se ensayó vacunando ratones con 100  $\mu$ g de los ADN plasmídicos sencillos administrados con o sin VF-P1205-02A en ausencia del ADN carga. Las muestras de suero se recogieron antes de la primera vacunación (día -1) y después de cada vacunación (días 20, 48 y 63) y los anticuerpos específicos para gB se midieron por ELISA.

## Ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas (ELISA) de gB recombinante

Se recogía suero de los ratones vacunados y se determinaron las titulaciones de IgG anti gB determinadas usando un ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas (ELISA) de gB de CMV recombinante como se describe en el Ejemplo 7.

- 5 Las titulaciones de IgG anti gB en suero de ratones vacunados con VCL-6365, en solitario o en combinación con VCL-6368 se proporcionan a continuación:

TABLA 13 – Titulaciones de IgG anti gB

|                                                  | Sangrado 2 (Día 48)                            | Sangrado 3 (Día 63)                            |
|--------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Inmunógeno                                       | Titulación media Log <sub>10</sub> (intervalo) | Titulación media Log <sub>10</sub> (intervalo) |
| gB+pp65 en PBS                                   | 4,6 (4,4-4,7)                                  | 4,78 (4,4-5,0)                                 |
| gB + pp65 + VF-P1205-02A                         | 4,7 (4,1-5,0)                                  | 4,96 (4,7-5,3)                                 |
| gB + plásmido de control negativo                | 4,98 (3,8-5,3)                                 | 5,25 (4,1-5,6)                                 |
| gB + plásmido de control negativo + VF-P1205-02A | 4,87 (4,4-5,3)                                 | 5,14 (4,7-5,6)                                 |
| gB en PBS                                        | 4,82 (4,4-5,3)                                 | 5,15 (4,7-5,6)                                 |
| gB + VF-P1205-02A                                | 4,73 (4,4-5,0)                                 | 5,1 (4,7-5,3)                                  |

- 10 El plásmido VCL6365 (gB) suscitó la producción de anticuerpos específicos contra gB en ratones que recibieron tres inyecciones de plásmidos en solitario o en combinación. Todos los ratones vacunados con VCL6365 tuvieron titulaciones anti IgG gB detectables después de dos inyecciones. Estos datos confirman la inmunogenicidad del producto plasmídico gB *in vivo* cuando se administra VCL6365 en combinación con VCL6368 en la formulación VF-P1205-02A.

## Ejemplo 9

- 15 El plásmido que codifica IE1 de CMV humano es inmunogénico

## Procedimiento experimental general

El procedimiento experimental general para el siguiente ejemplo es como se describe anteriormente con parámetros particulares y materiales empleados como se describe en el presente documento.

## Régimen de vacunación

- 20 Los ratones recibieron inyecciones intramusculares bilaterales en el fémur anterior del plásmido IE1 VR6250. Las dosis totales de ADN como se muestra a continuación fueron cada una en un volumen de 100 µl en PBS, pero se administraron como dos inyecciones del mismo volumen, una en cada músculo del recto anterior de cada ratón. El grupo de control negativo contenía 5 ratones y los otros grupos contenían 10 ratones. Los ratones recibieron los días 0 y 14. Se analizaron los esplenocitos con respecto a la reactividad de IE1 por ensayo ELISpot en el que los
- 25 esplenocitos se estimularon con un conjunto de 98 péptidos de 15 oligómeros solapantes (solapando 11 aminoácidos) que incluyen toda la proteína IE1 codificada por la construcción VR6250. Los esplenocitos del grupo de control negativo se recogieron el día 24 y se analizaron con respecto a la estimulación inespecífica de linfocitos T que secretan IFN-γ con el grupo del péptido IE1. Los esplenocitos de los grupos inyectados con ADN IE1 se recogieron para análisis específico de antígeno, secreción de IFN-γ, respuesta de linfocitos T los días 27-29. Dos
- 30 bazos de cada grupo se agruparon para el ensayo. Dos grupos de cada grupo se analizaron los días 27 y 28, un grupo de cada grupo se analizó el día 29. Los valores indicados a continuación representan el promedio de 5 conjuntos de esplenocitos por grupo experimental.

## Ensayo ELISpot con IFN-γ

- 35 Respuestas de linfocitos T a las vacunas de ADN se determinaron cuantificando la cantidad de esplenocitos que secretaban IFN-γ en respuesta a estimulación específica de antígeno como se mide mediante ensayo ELISpot de

IFN- $\gamma$ . Placas InmunoSpot (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH) se recubrieron con anticuerpo monoclonal de rata anti IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences, San Diego, CA) y se bloqueó con medio RPMI-1640. Las suspensiones de esplenocitos se aislaron de ratones vacunados individuales y se añadieron a placas ELISpot a  $1 \times 10^6$  o  $3,3 \times 10^5$  células/pocillo en medio con RPMI que contenía 5  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno de los péptidos IE1 solapantes como antígeno estimulante. Los pocillos de control que contenían  $1 \times 10^6$  esplenocitos se incubaron en el medio (sin antígeno). Después de una incubación de 20 horas a 37 °C, se detectó el IFN- $\gamma$  capturado mediante adición secuencial de anticuerpo monoclonal de rata anti IFN- $\gamma$  de ratón marcado con biotina y peroxidasa de rábano picante con avidina. Las manchas producidas por la conversión de sustrato colorimétrico, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), se cuantificaron mediante un Analizador InmunoSpot (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH). Los resultados se expresan como unidades formadoras de manchas (UFM) por  $10^6$  pocillos.

TABLA 14 – Resultados de ELISpot de IE1

| ADN y Dosis         | 100 $\mu\text{g}$ de blanco | 1 $\mu\text{g}$ de VR6250 | 3 $\mu\text{g}$ de VR6250 | 10 $\mu\text{g}$ de VR6250 | 30 $\mu\text{g}$ de VR6250 | 100 $\mu\text{g}$ de VR6250 |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| UFM/ $10^6$ células | 6                           | 5                         | 77                        | 289                        | 367                        | 501                         |

Los datos muestran que administrando el plásmido de IE1 VR6250 se induce una respuesta inmunitaria específica de antígeno y que la respuesta inmunitaria tiene una dependencia a la dosis de ADN. De manera adicional, esto confirma indirectamente que la proteína IE1 se expresa *in vivo*.

#### Ejemplo 10

#### Estudios de selección de formulación

La fuerza de las diferentes formulaciones de vacuna se evaluó en dos estudios de inmunogenicidad de ratones experimentales usando M84 de CMV murino. Se considera que el M84 de CMV murino es un homólogo del pp65 CMV humano y que por tanto sirve como un sustituto para el antígeno pp65. El primer estudio midió las respuestas de dosis de lípidos usando una cantidad establecida de ADN mientras que el segundo estudio evaluó clínicamente dosis relevantes de ADN por graduación de dosis.

#### Formulaciones

Se produjo DMRIE/DOPE en una relación molar 1:1 como una película lipídica que contenía DMRIE al 46,2% y DOPE al 53,8% en peso (5,14 mg del lípido total seco). Antes de la inyección, la película lipídica mixta seca se hidrató en agua estéril para inyección para formar liposomas catiónicos que después se añadieron al ADN a la concentración apropiada en 2 x PBS. El ADN se formuló con DMRIE/DOPE de la siguiente manera:

TABLA 15 – Formulaciones de ADN

| Concentración de ADN (mg/ml) | ADN:Lípido* |
|------------------------------|-------------|
| 0,5                          | 2:1         |
| 1,0                          | 4:1         |
| 3,0                          | 10:1        |

\* relación molar ADN (PM asignado = 333 gr/mol):lípido catiónico

Para los estudios de respuesta a la dosis de lípidos las formulaciones DMRIE/DOPE indicadas anteriormente se diluyeron a una concentración de vacunación final de 0,5 mg/ml de ADN de M84. Para los estudios de aumento de dosis de ADN las formulaciones no se diluyeron antes de la inyección.

Las formulaciones de poloxámero para el estudio de respuesta a la dosis de lípido se produjeron con 5 mg/ml de ADN de M84, 7,5 mg/ml de CRL 1005 y tensioactivo de cloruro de benzalconio (BAK) 0,3 mM. Antes de la inyección, las formulaciones para el estudio de respuesta a la dosis de lípidos se diluyeron a una concentración de vacunación final de 0,5 mg/ml de ADN de M84. En los estudios de aumento de dosis de ADN, las formulaciones se produjeron con 3 mg/ml del ADN plasmídico apropiado, 4,5 mg/ml de CRL 1005 y BAK 0,18 mM. Estas formulaciones no se diluyeron antes de la inyección.

#### Régimen de vacunación

Grupos de nueve ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de vida (Harlan-Sprague-Dawley) recibieron inyecciones

bilaterales (50  $\mu$ l/extremidad) intramusculares (recto anterior) de ADN plasmídico formulado con DMRIE/DOPE o CRL 1005 en PBS. Ratones de control recibieron ADN en PBS solitario. Todos los ratones se reforzaron (aproximadamente) los días 21 y 49. Dos semanas después de la última inmunización los esplenocitos se recogieron de tres ratones/grupo/día de tres días secuenciales y las respuestas de linfocitos T específicos de antígeno se midieron mediante ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$ .

Medio de cultivo celular

Los cultivos de esplenocitos se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía tampón HEPES 25 mM y L-glutamina y complementos con FBS al 10% (v/v),  $\beta$ -mercaptoetanol 50  $\mu$ M, 100 U/ml de sal sódica de penicilina G y 100  $\mu$ g/ml de sulfato de estreptomicina.

Ensayo ELISpot con IFN- $\gamma$

Las respuestas de linfocitos T a las vacunas de ADN se determinaron cuantificando la cantidad de esplenocitos que secretaban IFN- $\gamma$  en respuesta a la estimulación específica de antígeno medida por ensayo ELISpot con IFN- $\gamma$ . Se recubrieron placas ImmunoSpot (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH) con anticuerpo monoclonal de rata anti IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences, San Diego, CA) y se bloquearon con medio RPMI-1640. Se produjeron suspensiones de esplenocitos procedentes de ratones vacunados individuales y se sembraron en placas ELISpot a  $1 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$  o  $1 \times 10^5$  células/pocillo en medio RPMI que contenía 1  $\mu$ g/ml del péptido limitado de clase I de MHC apropiado (M84, <sup>297</sup>AYAGLFTPL<sup>305</sup>, (SEC ID N°: 32) Imgenex, San Diego, CA), 1 U/ml de IL-2 murino recombinante (Roche, Indianapolis, IN). Los pocillos de control que contenían  $1 \times 10^6$  esplenocitos se incubaron en el medio solo con IL-2 (sin antígeno). Después de una incubación de 20 horas a 37 °C, se detectó IFN- $\gamma$  capturado por la adición secuencial de anticuerpo monoclonal de rata anti IFN- $\gamma$  de ratón marcado con biotina y peroxidasa de rábano picante con avidina. Las manchas producidas por la conversión del sustrato colorimétrico, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) se cuantificaron mediante un lector ImmunoSpot (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH). Se determinaron diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de linfocitos T de ratones vacunados con ADN formulado con lípido o poloxámero y ADN desnudo usando un ensayo de la t de Student con una  $\alpha = 0,05$ .

Las respuestas de linfocitos T CD8+ específicas de M84 de ratones vacunados con 50  $\mu$ g de ADN M84 formulado con DMRIE/DOPE ("D/D") a las proporciones molares de ADN:lípido indicadas, CRL 1005 o PBS en solitario se proporcionaron a continuación.

TABLA 16 – Respuestas de linfocitos T CD8+

| Formulación de Vacuna | UFM media /10 <sup>6</sup> Esplenocitos linfocitos T CD8+ |
|-----------------------|-----------------------------------------------------------|
| PBS                   | 299                                                       |
| 2:1 D/D               | 243                                                       |
| 4:1 D/D               | 179                                                       |
| 10:1 D/D              | 299                                                       |
| CRL 1005              | 344                                                       |

Las respuestas de linfocitos T CD8+ específicos de M84 de ratones vacunados con dosis crecientes de ADN M84 formulados con DMRIE/DOPE (D/D) a las proporciones molares de ADN:lípido indicadas frente a ADN de M84 formulado con CRL 1005 o PBS en solitario se dan a continuación.

TABLA 17 – Respuestas de linfocitos T CD8+

| Formulación de Vacuna (Dosis de ADN) | UFM media/10 <sup>6</sup> esplenocitos linfocitos T CD8+ |
|--------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| PBS (300 $\mu$ g)                    | 533                                                      |
| 2:1 D/D (50 $\mu$ g)                 | 184                                                      |
| 4:1 D/D (100 $\mu$ g)                | 158                                                      |
| 10:1 D/D (300 $\mu$ g)               | 243                                                      |
| CRL 1005 (300 $\mu$ g)               | 416                                                      |

## Ejemplo11

## Experimentos empleando antígenos HCMV

## Régimen de vacunación

Grupos de nueve ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de vida (Harlan-Sprague-Dawley) recibieron inyecciones bilaterales, intramusculares (recto anterior) (50 µl/extremidad) que contenía el ADN plasmídico que codifica pp65, gB o pp65 y gB con o sin CRL 1005 (la formulación VF-P1205-02A) los días 0 y 13. Cada ratón recibió 200 µg de ADN por vacunación. Para las formulaciones que contenían un solo plásmido que codifica gB o pp65, se añadieron 100 µg de ADN blanco (VR10551) para producir 200 µg de ADN total. Comenzando aproximadamente tres semanas después de la inmunización primaria (el día 22), los esplenocitos se recogieron de ratones vacunados y las respuestas de linfocitos T específicas de pp65 se midieron mediante ensayo ELISpot de IFN-γ. Se realizaron tres ensayos ELISpot: el ensayo uno midió la respuesta inmunitaria de un grupo de esplenocitos de tres ratones por grupo y los ensayos dos y tres midieron la respuesta inmunitaria de un grupo de esplenocitos a partir de dos ratones por grupo. Las respuestas inmunitarias de los dos ratones adicionales en cada grupo no se midieron en esta serie de ensayos.

## Ensayos ELISpot e IFN-γ

Las respuestas de linfocitos T contra pp65 codificado por ADN se determinaron cuantificando el número de esplenocitos que secretaban IFN-γ de respuesta a estimulación con péptidos derivados de pp65 (Bio-Synthesis, Lewisville, TX). Placas ImmunoSpot (Millipore, Billerica, MA) se recubrieron con anticuerpo monoclonal de rata anti IFN-γ de ratón (BD Biosciences, San Diego, CA) y se bloquearon con medio RPMI-1640 que contenía tampón HEPES 25 mM y L-glutamina y complementado con FBS termoinactivado al 10% (v/v), β-mercaptoetanol 55 mM, 100 U/ml de sal sódica de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomycin (RPMI al 10%). Se produjeron suspensiones de esplenocitos de los ratones vacunados, se resuspendieron en medio RPMI al 10% a una densidad de  $2 \times 10^7$  células/ml y se sembraron en pocillos por triplicado de dos placas ImmunoSpot individuales a una densidad de  $5 \times 10^5$  o  $2,5 \times 10^5$  células/pocillo. Los esplenocitos se estimularon con dos grupos individuales de péptidos pp65 solapantes (un grupo por placa) que, en su conjunto, abarcan toda la proteína pp65 y debe incluir todos los posibles epítomos de linfocitos T. Por lo tanto, el tipo de linfocito T (por ejemplo, CD8+ o CD4+) que produce IFN-γ en respuesta a la estimulación peptídica no puede diferenciarse mediante este método de ensayo. Teóricamente, estos péptidos pueden presentarse en el contexto de MHC de clase I y de clase II, estimulando de esta manera ambos linfocitos T tanto CD8+ como CD4+ dentro de la misma preparación de esplenocitos. Los conjuntos de péptidos contenían 68 (conjunto I) o 69 (conjunto II) péptidos de 15 aminoácidos cada uno (excepto un péptido de 13 aminoácidos en el grupo II) y cada péptido se representó a una concentración final de 5 µg/ml en el pocillo de ensayo. Los pocillos de control contenían  $5 \times 10^5$  células en medio solamente (sin antígeno peptídico). Después de una incubación de 21 horas a 37 °C, se detectó IFN-γ capturado por la adición secuencial de anticuerpo monoclonal de rata anti-IFN-γ de ratón marcado con biotina (BD Biosciences, San Diego, CA) y peroxidasa de rábano picante-avidina. Las manchas producidas por la conversión de sustrato colorimétrico, 3-amino-9-etilcarbazol (AEC), se cuantificaron mediante un lector ImmunoSpot (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH). Los datos se presentan como el número de Unidades Formadoras de Manchas (UFM) producidas en respuesta a la estimulación específica de antígeno por millones de células ensayadas. La estimulación específica de antígeno se calculó sustrayendo el número medio de manchas en los pocillos que contenían esplenocitos incubados solo con medio (la respuesta a fondo no específica) a partir del número de manchas en pocillos que contenían la preparación de esplenocitos idéntica incubada con un grupo de péptidos derivados de pp65. Se usaron tres pocillos repetidos para determinar la respuesta del fondo media no específica. Cada UFM corresponde a un linfocito T específico de pp65. Debido al pequeño tamaño de la muestra (n=3), no se realizó un análisis estadístico de la diferencia de las medias.

Experimento 1 – Véase TABLAS 18 y 19.

TABLA 18 – Respuestas de linfocitos T contra el péptido pp65 de CMV del grupo 1

| Vacuna de ADN            | Media UFM/ $10^6$ Células | Factor de incremento frente a pp65+gB |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| pp65 + gB                | 170                       | --                                    |
| pp65 + gB + CRL 1005     | 705                       | 4,1                                   |
| pp65 + Blanco            | 681                       | 4,0                                   |
| pp65 + Blanco + CRL 1005 | 780                       | 4,6                                   |
| gB + Blanco              | 1                         | 0                                     |
| gB + Blanco + CRL 1005   | 2                         | 0                                     |

TABLA 19 – Respuesta de linfocitos T contra el péptido pp65 del CMV en grupo II

| Vacuna de ADN            | Media UFM/10 <sup>6</sup><br>Células | Factor de aumento<br>frente pp65+gB |
|--------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| pp65 + gB                | 80                                   |                                     |
| pp65 + gB + CRL 1005     | 208                                  | 2,6                                 |
| pp65 + Blanco            | 374                                  | 4,7                                 |
| pp65 + Blanco + CRL 1005 | 225                                  | 2,8                                 |
| gB + Blanco              | 0                                    | 0                                   |
| gB + Blanco + CRL 1005   | 0                                    | 0                                   |

## Experimento 2

- 5 El experimento anterior se repitió, y aunque el grupo pp65 + gB tuvo respuestas frente al grupo I del péptido que era 2,4 veces mayor que la medida en el estudio indicado con detalle anteriormente, los resultados fueron similares.

TABLA 20 – RESPUESTAS DE LINFOCITOS T A PÉPTIDO PP65 DEL CMV GRUPO I

| Vacuna de ADN            | Media UFM/10 <sup>6</sup><br>Células | Factor de aumento<br>frente a pp65+gB |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| pp65 + gB                | 407                                  | --                                    |
| pp65 + gB + CRL 1005     | 444                                  | 1,1                                   |
| pp65+Blanco              | 435                                  | 1,1                                   |
| pp65 + Blanco + CRL 1005 | 762                                  | 1,9                                   |
| gB + Blanco              | ND                                   | --                                    |
| gB + Blanco+ CRL 1005    | ND                                   | --                                    |

TABLA 21 – Respuestas de linfocitos T contra el péptido pp65 del CMV grupo II

| Vacuna de ADN            | Media UFM/10 <sup>6</sup><br>Células | Factor de incremento<br>frente a pp65+gB |
|--------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|
| Pp65 + gB                | 100                                  | --                                       |
| pp65 + gB + CRL1005      | 158                                  | 1,6                                      |
| pp65+ Blanco             | 140                                  | 1,4                                      |
| pp65 + Blanco + CRL 1005 | 225                                  | 2,3                                      |
| gB + Blanco              | 0                                    | --                                       |
| gB +Blanco + CRL 1005    | 0                                    |                                          |

## 10 Experimento 3

## Régimen de vacunación

- 15 Grupos de nueve ratones BALB/c hembra de 6 a 8 semanas de vida (Harlan-Sprague-Dawley) recibieron inyecciones bilaterales, intramusculares (recto anterior) (50 µl/extremidad) que contenía el ADN plasmídico que codifica pp65, gB o pp65 y gB con o sin CRL 1005 (la formulación VF-P1205-02A) los días 0, 21 y 49. Cada ratón recibió 200 µg de ADN por vacunación. Para las formulaciones que contenían un solo plásmido que codifica gB o pp65, se añadieron 100 µg de ADN blanco (VCL10551) para producir una dosis de 200 µg de ADN total. El efecto del ADN blanco se sometió a ensayo vacunando ratones con 100 µg de los ADN plasmídicos sencillos administrado con o sin CRL 1005 en ausencia del ADN blanco. Se recogieron esplenocitos comenzando el día 66 y las respuestas de linfocitos T específicos de pp65 se analizaron mediante el ELISpot de IFN- $\gamma$  como se ha indicado anteriormente.
- 20 Basándose en resultados previos, respuestas de linfocitos T no específicas de pp65 se anticiparon para ratones vacunados con gB + ADN blanco o gB + ADN blanco + CRL 1005. Por lo tanto, estos ratones no se valoran en los ensayos ELISpot. Diferencias estadísticamente significativas entre las respuestas de linfocitos T medias de ratones vacunados frente a pp65 + gB se determinaron usando un ensayo de la t de Student con  $\alpha = 0,05$ .

TABLA 22 – Respuestas de linfocitos T contra el péptido pp65 del CMV grupo I

| Vacuna de ADN            | Media UFM/10 <sup>6</sup><br>Células | Factor de aumento<br>frente a pp65+gB | Valor p |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| pp65 + gB                | 783                                  | --                                    | --      |
| pp65 + gB + CRL 1005     | 1360                                 | 1,7                                   | 0,03    |
| pp65 + Blanco            | 1265                                 | 1,6                                   | 0,02    |
| pp65 + Blanco + CRL 1005 | 1308                                 | 1,7                                   | 0,03    |
| pp65                     | 1184                                 | 1,5                                   | NS      |
| pp65 + CRL 1005          | 1767                                 | 2,3                                   | 0,01    |

NS = no significativo

TABLA 23 – Respuestas de linfocitos T contra el péptido pp65 del CMV grupo II

| Vacuna de ADN            | Media UFM/10 <sup>6</sup><br>Células | Factor de aumento<br>frente a pp65+gB | Valor p |
|--------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| pp65 + gB                | 234                                  | --                                    | --      |
| pp65 + gB + CRL 1005     | 544                                  | 2,3                                   | 0,04    |
| pp65 + Blanco            | 496                                  | 2,1                                   | 0,04    |
| pp65 + Blanco + CRL 1005 | 651                                  | 2,8                                   | 0,008   |
| PP65                     | 581                                  | 2,5                                   | 0,02    |
| pp65 + CRL 1005          | 704                                  | 3,0                                   | 0,01    |

## 5 Ejemplo12

Combinaciones de vacuna – combinación de ADN y proteína

Procedimiento experimental general

El procedimiento experimental para el siguiente ejemplo es como se ha descrito anteriormente con parámetros y materiales particulares empleados como se describe en el presente documento.

## 10 Régimen de vacunación

15 Ratones hembra BALB/c, 6/grupo, se inyectaron en cada recto anterior con 20 µg de vacuna de ADN bivalente contra HCMV en un volumen de 50 µl +/- poloxámero VF-P1205-02A ("02A"), DMRIE:DOPE ("D/D") y/o proteína gB como se indica más adelante. El plásmido VR6365 codifica gB del HCMV, el plásmido VR6368 codifica pp65 del HCMV. La proteína gB de longitud completa purificada de células CHO se obtuvo de Austral Biologicals. (San Ramón, CA). Los ratones recibieron inyecciones los días 0 y 14 y se les extrajo la sangre para determinar las titulaciones de anticuerpo gB el día 13 y 26. Esplenocitos de dos ratones por grupo se recogieron los días 26, 27 y 28 para análisis ELISpot de IFN-γ de pp65 (los esplenocitos de ratones individuales se sometieron a ensayo, n=6 por grupo).

TABLA 24 – Programa de inmunización

| Grupo | ADN (total/inyección/ratón)                                |
|-------|------------------------------------------------------------|
| A     | 10 µg VR 6368 + 10 µg VR6365 + 02A                         |
| B     | 10 µg VR 6368 + 10 µg VR6365 + 02A +<br>proteína gB 4,5 µg |
| C     | 10 µg VR 6368 +10 µg VR6365 + 02A +<br>proteína gB 1,5 µg  |
| D     | 10 µg VR 6368 + 10 µg VR6365 + 02A +<br>proteína gB 0,5 µg |
| E     | 10 µg VR 6368 + 10 µg VR6365 + D/D +<br>proteína gB 4,5 µg |
| F     | 10 µg VR 6368 +10 µg VR6365                                |

## Ensayo inmunoabsorbente asociado a enzimas gB recombinante (ELISA)

El ELISA para detectar anticuerpos en suero específicos de gB se realizó con placas EIA de 96 pocillos Costar 1/2 pocillos recubiertas con gB CMV recombinante a una concentración de 0,1 µg/pocillo en tampón de solución salina tamponado con borato (BBS). Después de recubrir con antígeno, las placas se sellaron y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron 4X con BBS que contenía Tween-20 (BBST) al 0,1% usando un lavador de placa automático. La unión no específica se bloqueó incubando placas durante 1 h a temperatura ambiente con 100 µl de tampón de ensayo (suero de ternero fetal al 10% en BBS). Después el tampón de bloqueo se decantó y el suero diluido en serie (diluido en tampón de ensayo) se añadió a 50 µl/pocillo. Las placas se sellaron, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavaron 4X con BBS que contenían Tween-20 (BBST) al 0,1% usando un lavador de placa automático. Se añadió anticuerpo secundario de cabra específico anti IgG Fc de ratón diluido a 1:5000 en tampón de ensayo a 50 µl/pocillo; las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron 4X con BBS que contenía Tween-20 (BBST) al 0,1% usando un lavador de placa automático. El sustrato, que consistía en p-nitrofenilfosfato a 1 mg/ml en tampón Bicarbonato Sódico 50 mM, pH 9,8 y MgCl<sub>2</sub> a 1 mM, se añadió a 50 µl/pocillo, las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. La absorbancia de cada pocillo se determinó a 405 mM. La titulación del punto final = el recíproco de la última dilución resultante en un valor medio de absorbancia que es mayor que o igual al doble del valor medio absorbancia del fondo de los pocillos.

TABLA 25 – Titulaciones de IgG anti-gB y resultados de ELISpot

| Grupo | pp65 del HCMV USM/10 <sup>6</sup> esplenocitos | Titulaciones de anticuerpos gB HCMV Día 13 | Titulaciones de anticuerpo gB HCMV Día 26 |
|-------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|
| A     | 368                                            | 325                                        | 5867                                      |
| B     | 576                                            | 467                                        | 22400                                     |
| C     | 451                                            | 717                                        | 25600                                     |
| D     | 260                                            | 500                                        | 14400                                     |
| E     | 523                                            | 1800                                       | 187733                                    |
| F     | 465                                            | 75                                         | 1867                                      |

La adición de la proteína gB a la vacuna de ADN pp65, gB bivalente formulada en poloxámero aumentó la respuesta anti anticuerpo gB hasta 14 veces frente a la vacuna bivalente en solitario (vacuna bivalente + 02A + 1,5 µg de proteína gB (Grupo C) frente a la vacuna bivalente en solitario (Grupo F, p=0,005) y hasta 4 veces frente al ADN bivalente en poloxámero (vacuna bivalente + 02A + 1,5 µg de proteína gB (Grupo C) frente a la vacuna bivalente + 02A (Grupo A), p=0,01). La adición de la proteína gB a la vacuna de ADN bivalente formulado en lípido catiónico aumentó la respuesta de anticuerpo anti-gB 101 veces frente a la vacuna bivalente en solitario (vacuna bivalente + D/D + 4,5 µg de proteína gB (Grupo E) frente a la vacuna bivalente en solitario (Grupo F), p=0,00006) y 32 veces frente a la ADN bivalente en poloxámero (vacuna bivalente + D/D + 4,5 µg de proteína gB (Grupo E) frente a vacuna bivalente + 02A (Grupo A), p=0,00005). La respuesta de pp65 fue similar en todo los grupos lo que indicaba que la combinación de la proteína con la vacuna de ADN bivalente para mejorar el componente de anticuerpo de la respuesta no reducía el componente celular de la respuesta.

## Ejemplo 13

Combinaciones de vacuna – combinación de vacuna trivalente

## Régimen de vacunación

A grupos de 10 ratones se les inyectó en cada recto anterior 50 µl de PBS que contenía plásmidos de ADN múltiples como se muestra más adelante. El plásmido VR6365 codifica gB del HCMV, el Plásmido VR6368 codifica pp65 del HCMV, el Plásmido VR6250 codifica IE1 del HCMV y “blanco” se refiere a una estructura plasmídica equivalente pero que carece de cualquier secuencia codificante de antígeno. Todo el ADN se formuló con la formulación basada en poloxámero “02A” como se describe en el Ejemplo 4. Se proporcionaron dos conjuntos de inyección en los días 0 y 14. El suero se extrajo el día 26 para determinar las titulaciones de anticuerpo gB.

TABLA 26 – Programa de inmunización

| Grupo | Dosis (por extremidad)                                          |
|-------|-----------------------------------------------------------------|
| A     | 6,6 µg VR6368 (pp65) + 6,6 µg VR6250 (IE1) + 6,6 µg VR6365 (gB) |
| B     | 6,6 µg VR6368 (pp65) + 6,6 µg blanco + 6,6 µg VR6365(gB)        |
| C     | 6,6 µg blanco + 6,6 µg VR6250 (IE1) + 6,6 µg VR6365 (gB)        |

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas gB recombinantes (ELISA)

- 5 Se recogió suero de los ratones vacunados de acuerdo con el régimen descrito en el Ejemplo 7 anterior. Las titulaciones anti IgG gB se determinaron usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas gB CMV (ELISA) como se describe en el Ejemplo 12 anterior.

Ensayo ELISpot de IFN- $\gamma$

- 10 Se recogieron bazo para análisis respuestas de linfocitos T específicos de antígeno, que secretaban IFN- $\gamma$  los días 27-29. Dos bazo de cada grupo se agruparon para el ensayo. Dos conjuntos de cada grupo se analizaron los días 27 y 28, un conjunto de cada grupo se analizó el día 29. Los esplenocitos se procesaron y analizaron con respecto a la reactividad pp65 mediante ensayo ELISpot como se describe en el Ejemplo 7. Se analizaron los esplenocitos para la reactividad IE1 por ensayo ELISpot como se describe para el ensayo ELISpot de pp65 excepto que los esplenocitos se estimularon con un grupo de 98 péptidos de 15 oligómeros solapantes (solapantes en 11 aminoácidos) que abarcaban toda la proteína IE1 codificada por la construcción VR6250 (Véase Ejemplo 3).

15 TABLA 27 – Titulaciones IgG anti-gB y resultados ELISpot

| Análisis                                        | Grupo A | Grupo B | Grupo C |
|-------------------------------------------------|---------|---------|---------|
| titulación de anticuerpo gB                     | 18,560  | 24,320  | 62,720  |
| ELISpot pp65 (UFM/10 <sup>6</sup> esplenocitos) | 348     | 231     | 1       |
| ELISpot IE1 (UFM/10 <sup>6</sup> esplenocitos)  | 218     | 1       | 319     |

- 20 Los experimentos anteriores mostraron que la administración de cada ADN que codifica el antígeno en solitario suscita una respuesta inmunitaria *in vivo*. Los datos actuales muestran que cada ADN que codifica antígeno induce una respuesta inmunológica específica cuando se combina con otros antígenos. Por tanto, combinando los antígenos y administrando simultáneamente los ADN que codifican antígenos múltiples se permite la generación de respuestas inmunitarias en todos los antígenos simultáneamente.

Ejemplo 14

Administración de plásmidos asistida eléctricamente

- 25 La administración de genes *in vivo* puede mejorarse a través de la aplicación de impulsos eléctricos breves a tejidos inyectados, un procedimiento denominado en el presente documento administración de plásmidos asistida eléctricamente. Véase, por ejemplo Aihara, H. & Miyazaki, J. *Nat. Biotechnol.* 16: 867-70 (1998); Mir, L.M. *et al.*, *Proc. Nati Acad. Sci. USA* 96: 4262-67 (1999); Hartikka, J. *et al.*, *Mol. Ther.* 4: 407-15 (2001); y Mir, L.M. *et al.*; Rizzuto, G. *et al.*, *Hum Gene Ther* 11: 1891-900 (2000); Widera, G. *et al.*, *J. of Immuno.* 164: 4635-4640 (2000). El uso de impulsos eléctricos para la electroporación celular se ha usado para introducir ADN extraño en células procariotas y eucariotas *in vitro*. La permeabilización celular puede también conseguirse localmente *in vivo* usando electrodos y parámetros eléctricos óptimos que son compatibles con la supervivencia celular.

El procedimiento de electroporación puede realizarse con diversos dispositivos de electroporación. Estos dispositivos incluyen electrodos de tipo placa externa o electrodos de aguja/rodillo invasivo y pueden poseer dos electrodos o electrodos múltiples colocados en una matriz. Las distancias entre los electrodos de placa o de aguja

pueden variar dependiendo del número de electrodos, del tamaño del área diana y del sujeto en tratamiento.

La matriz de aguja TriGrid, como se describe en el presente documento, es una matriz de tres electrodos que comprende tres electrodos alargados en la forma aproximada de un triángulo geométrico. La matriz de agujas puede incluir agujas sencillas, dobles, triples, cuádruples, quintuples, séxtuples o más dispuestas en diversas formaciones de matriz. Los electrodos se conectan a través de cables conductores a un dispositivo de cambio de alto voltaje que está conectado a una fuente de energía.

La matriz de electrodo se coloca en el tejido muscular, alrededor del sitio de la inyección del ácido nucleico, a una profundidad de aproximadamente 3 mm a 3 cm. La profundidad de la inserción varía dependiendo del tejido diana y del tamaño del paciente que recibe la electroporación. Después de una inyección del ácido nucleico extraño, tal como ADN plasmídico, y un periodo de tiempo suficiente para la distribución del ácido nucleico, se aplican impulsos eléctricos de onda cuadrada al tejido. La amplitud de cada impulso varía de aproximadamente 100 voltios a aproximadamente 1500 voltios, por ejemplo, de aproximadamente 100 voltios, aproximadamente 200 voltios, aproximadamente 300 voltios, aproximadamente 400 voltios, aproximadamente 500 voltios, aproximadamente 600 voltios, aproximadamente 700 voltios, aproximadamente 800 voltios, aproximadamente 900 voltios, aproximadamente 1000 voltios, aproximadamente 1100 voltios, aproximadamente 1200 voltios, aproximadamente 1300 voltios, aproximadamente 1400 voltios o aproximadamente 1500 voltios o aproximadamente 1-1,5 kV/cm, basándose en la distancia entre los electrodos. Cada impulso tiene una duración de aproximadamente 1  $\mu$ s a aproximadamente 1000  $\mu$ s, por ejemplo, aproximadamente 1  $\mu$ s, aproximadamente 10  $\mu$ s, aproximadamente 50  $\mu$ s, aproximadamente 100  $\mu$ s, aproximadamente 200  $\mu$ s, aproximadamente 300  $\mu$ s, aproximadamente 400  $\mu$ s, aproximadamente 500  $\mu$ s, aproximadamente 600  $\mu$ s, aproximadamente 700  $\mu$ s, aproximadamente 800  $\mu$ s, aproximadamente 900  $\mu$ s, o aproximadamente 1000  $\mu$ s y una frecuencia de impulso del orden de aproximadamente 1-10 Hz. La polaridad de los impulsos puede invertirse durante el procedimiento de electroporación cambiando los conectores a la generación de impulso. Los impulsos se repiten varias veces. Los parámetros de electroporación (por ejemplo amplitud de tensión, duración de impulso, número de impulsos, profundidad de inserción de electrodo y frecuencia) variarán basándose en el tipo de tejido diana, número de electrodos usados y distancia de la separación de electrodos como puede entenderse por un experto habitual en la técnica.

Inmediatamente después de finalizar el régimen de impulsos, los sujetos que reciben electroporación pueden tratarse opcionalmente con agentes estabilizadores de membrana para prolongar la permeabilidad de la membrana celular como resultado de la electroporación. Los ejemplos de agentes de estabilización de membrana incluyen, pero sin limitación, esteroides (por ejemplo dexametasona, metilprednisona y progesterona), angiotensina II y vitamina E. Una sola dosis de dexametasona, aproximadamente 0,1 mg por kilogramo de peso corporal, debe ser suficiente para conseguir un efecto beneficioso.

Las técnicas EADP tales como electroporación también pueden usarse para plásmidos contenidos en formulaciones de liposomas. El liposoma-suspensión de plásmidos se administra al animal o paciente y el sitio de inyección se trata con un campo eléctrico eficaz aunque inocuo generado, por ejemplo, por una matriz de aguja TriGrid o una matriz de cuatro agujas. La electroporación puede ayudar a la administración del plásmido a la célula desestabilizando la bicapa de liposomas de tal manera que se produce la fusión de membrana entre liposoma y la estructura celular diana. La electroporación también puede ayudar a la administración del plásmido a la célula desencadenando la liberación del plásmido a altas concentraciones desde el liposoma a la superficie de la célula diana de tal manera que el plásmido se lleva a través de la membrana celular mediante un gradiente de concentración a través de los poros creados en la membrana celular como resultado de la electroporación.

#### Estudio de electroporación en conejos

La administración de vacunas de ADN asistida por electroporación se comparó con ADN formulado con DMRIE:DOPE o CRL 1005 y ADN en PBS en un modelo de Conejo Blanco de Nueva Zelanda usando ADN gB CMV. Se inyectaron conejos (5 por grupo) en el músculo tibial a los 0 y 28 días con ADN 50  $\mu$ g/500  $\mu$ l/extremidad. La electroporación se realizó inmediatamente después de inyección usando el generador de impulso BTX-ECM830 con una matriz de 4 agujas 5 mm x 8,6 mm a 200V (232 V/cm), 60 ms, 2 impulsos y 2 Hz.

Las titulaciones de punto final del suero se midieron los días 2, 14, 28, 42 y 56 mediante ELISA gB. El ELISA para detectar los anticuerpos en suero específicos de gB se realizó con placas EIA 1/2 pocillo Costar de 96 pocillos con gB de CMV recombinante a una concentración de 0,1  $\mu$ g/pocillo en tampón de solución salina tamponada con borato (BBS). Después de recubrir con antígeno, las placas se sellaron y se incubaron a 4 °C durante una noche. Las placas se lavaron 4X con BBS que contenía Tween-20 (BBST) usando un lavador de placa automático. La unión no específica se bloqueó incubando placas durante 1 h a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l de tampón de ensayo (suero de ternero fetal al 10% en BBS). Después el tampón de bloqueo se decantó y el suero diluido en serie (diluido en tampón de ensayo) se añadió a 50  $\mu$ l/pocillo. Las placas se sellaron, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas, después se lavaron 4X con BBS que contenía Tween-20 (BBST) al 0,1% usando un lavador de placa automático. Se añadió anticuerpo secundario específico de Fc anti IgG de conejo de cabra diluido a 1:5000 en tampón de ensayo a 50  $\mu$ l/pocillo; las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Las placas se lavaron 4X con BBS que contenía Tween-20 (BBST) al 0,1% usando un lavador de placa

automático. Se añadió sustrato, que consistía en p-nitrofenilfosfato a 1 mg/ml en tampón Bicarbonato Sódico 50 mM, pH 9,8 y  $MgCl_2$  a 1 mM a 50  $\mu$ l/pocillo, las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 60 minutos. La absorbancia se determinó a 405 nm usando un lector de placa de 96 pocillos automático. La titulación de punto final = recíproco de la última dilución resultante en un valor medio de absorbancia que es mayor que o igual al doble del valor de absorbancia medio de los pocillos de fondo.

TABLA 28 – Titulaciones de punto final en suero

| Grupo                | Presangrado | Día 14 | Día 28 | Día 42  | Día 56  |
|----------------------|-------------|--------|--------|---------|---------|
| CRL1005              | 140         | 420    | 4830   | 46720   | 55040   |
| DMRIE:DOPE           | 240         | 1360   | 5120   | 354987  | 218453  |
| PBS+ Electroporación | 180         | 79360  | 221867 | 2703360 | 1884160 |
| PBS                  | 115         | 135    | 2240   | 35840   | 35840   |

Las titulaciones anti-gB medias para el grupo CRL 1005 fueron ligeramente superiores (hasta 3 veces superiores) que las titulaciones del grupo con PBS, pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas en ningún momento. Las titulaciones anti-gB medias para el grupo DMRIE:DOPE fueron 2-10 veces mayores ( $p < 0,05$  en todos los momentos postinyección) que para el ADN de gB en PBS. La electroporación después de la inyección de ADN de gB en PBS aumentó las titulaciones anti-gB 53-588 veces por encima del ADN de gB en PBS sin electroporación ( $p < 0,05$  en todos los momentos postinyección), 34-189 veces por encima del grupo CRL 1005 ( $p < 0,05$  en todos los momentos postinyección) y 8-58 veces por encima del grupo DMRIE:DOPE ( $p < 0,05$  en todos los momentos postinyección).

#### Ejemplo 15

Tratamiento de pacientes usando composiciones que comprenden pp65 y gB del HCMV optimizado por codones humanos y fragmentos y variantes de los mismos

Los productos inmunoterapéuticos plasmídicos se produjeron de acuerdo con los Procedimientos de Buena Fabricación (GMP) de la FDA actuales y se administraron a sujetos humanos según una solicitud autorizada de Nuevo Fármaco de Investigación.

#### A. Estudios iniciales

Treinta y dos adultos sanos se inmunizaron por inyección i.m. con 0,5 mg o 2,5 mg cada uno de ADN plasmídico que codifica gB y pp65 optimizado en plásmidos individuales a 0, 2 y 8 semanas. Las muestras de sangre se extrajeron antes de la inmunización y a 2, 4, 8, 10 y 16 semanas para estudios de inmunogenicidad, incluyendo ensayos ELISpot para medir las respuestas de linfocitos T CD4+ y CD8+ y titulaciones de anticuerpos para gB del HCMV.

#### B. Administración a donantes y receptores de trasplante de células madre hematopoyéticas (HSC)

Siguiendo los procedimientos anteriores, donantes HSC sanos se inmunizaron con las composiciones plasmídicas las semanas 4 y 2 antes de la donación. Se realizaron ensayos de inmunogenicidad usando sangre extraída de los donantes en la preinmunización y cada dos semanas durante 16 semanas postinmunización. Los receptores se dividieron en dos grupos. El primer grupo recibió el HSC de los donantes inmunizados pero se inmunizaron en sí mismos. El segundo grupo recibió el HSC de los donantes inmunizados y se inmunizaron con las mismas composiciones plasmídicas que la de los donantes aproximadamente cuatro semanas después del trasplante de HSC y los ensayos de inmunogenicidad se realizaron en el pretrasplante y cada dos semanas como se ha indicado anteriormente. Las inmunizaciones pueden repetirse cada dos semanas tanto para los donantes como para los receptores.

**Listado de Secuencias**

&lt;110&gt; Vical Incorporated

5 &lt;120&gt; Vacunas basadas en polinucleótidos optimizados por codones contra infección por citomegalovirus humano

&lt;130&gt; SMW/FP6703938

&lt;140&gt; EP

10 &lt;141&gt; 2003-12-19

&lt;150&gt; EP 03814236.0

&lt;151&gt; 2003-12-19

15 &lt;150&gt; PCT/US2003/040685

&lt;151&gt; 2003-12-19

&lt;150&gt; US 60/435,549

&lt;151&gt; 2002-12-23

20 &lt;160&gt; 50

&lt;170&gt; PatentIn version 3.2

25 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1683

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Citomegalovirus humano

30 &lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1683)

&lt;400&gt; 1

35

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg gag tgc cgc ggt cgc cgt tgt ccc gaa atg ata tcc gta ctg ggt | 48  |
| Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| ccc att tgc ggc cac gtg ctg aaa gcc gtg ttt agt cgc ggc gat acg | 96  |
| Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| ccg gtg ctg ccg cac gag acg cga ctc ctg cag acg ggt atc cac gta | 144 |
| Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| cgc gtg agc cag ccc tgc ctg atc ttg gta tgc cag tac acg ccc gac | 192 |
| Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| tcg acg cca tgc cac cgc ggc gac aat cag ctg cag gtg cag cac acg | 240 |
| Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| tac ttt acg ggc agc gag gtg gag aac gtg tgc gtc aac gtg cac aac | 288 |
| Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| ccc acg ggc cga agc atc tgc ccc agc cag gag ccc atg tgc atc tat | 336 |

# ES 2 429 338 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Pro | Thr | Gly | Arg | Ser | Ile | Cys | Pro | Ser | Gln | Glu | Pro | Met | Ser | Ile | Tyr |      |  |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |      |  |
| gtg | tac | gcg | ctg | ccg | ctc | aag | atg | ctg | aac | atc | ccc | agc | atc | aac | gtg | 384  |  |
| Val | Tyr | Ala | Leu | Pro | Leu | Lys | Met | Leu | Asn | Ile | Pro | Ser | Ile | Asn | Val |      |  |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |      |  |
| cac | cac | tac | ccg | tcg | gcg | gcc | gag | cgc | aaa | cac | cga | cac | ctg | ccc | gta | 432  |  |
| His | His | Tyr | Pro | Ser | Ala | Ala | Glu | Arg | Lys | His | Arg | His | Leu | Pro | Val |      |  |
|     |     | 130 |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |      |  |
| gct | gac | gct | gtg | att | cac | gcg | tcg | ggc | aag | cag | atg | tgg | cag | gcg | cgt | 480  |  |
| Ala | Asp | Ala | Val | Ile | His | Ala | Ser | Gly | Lys | Gln | Met | Trp | Gln | Ala | Arg |      |  |
|     |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |      |  |
| ctc | acg | gtc | tcg | gga | ctg | gcc | tgg | acg | cgt | cag | cag | aac | cag | tgg | aaa | 528  |  |
| Leu | Thr | Val | Ser | Gly | Leu | Ala | Trp | Thr | Arg | Gln | Gln | Asn | Gln | Trp | Lys |      |  |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |      |  |
| gag | ccc | gac | gtc | tac | tac | acg | tca | gcg | ttc | gtg | ttt | ccc | acc | aag | gac | 576  |  |
| Glu | Pro | Asp | Val | Tyr | Tyr | Thr | Ser | Ala | Phe | Val | Phe | Pro | Thr | Lys | Asp |      |  |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |      |  |
| gtg | gca | ctg | ccg | cac | gtg | gtg | tgc | gcg | cac | gag | ctg | ggt | tgc | tcc | atg | 624  |  |
| Val | Ala | Leu | Arg | His | Val | Val | Cys | Ala | His | Glu | Leu | Val | Cys | Ser | Met |      |  |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |      |  |
| gag | aac | acg | cgc | gca | acc | aag | atg | cag | gtg | ata | ggt | gac | cag | tac | gtc | 672  |  |
| Glu | Asn | Thr | Arg | Ala | Thr | Lys | Met | Gln | Val | Ile | Gly | Asp | Gln | Tyr | Val |      |  |
|     |     | 210 |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |      |  |
| aag | gtg | tac | ctg | gag | tcc | ttc | tgc | gag | gac | gtg | ccc | tcc | ggc | aag | ctc | 720  |  |
| Lys | Val | Tyr | Leu | Glu | Ser | Phe | Cys | Glu | Asp | Val | Pro | Ser | Gly | Lys | Leu |      |  |
|     |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |      |  |
| ttt | atg | cac | gtc | acg | ctg | ggc | tct | gac | gtg | gaa | gag | gac | ctg | acg | atg | 768  |  |
| Phe | Met | His | Val | Leu | Gly | Ser | Asp | Val | Glu | Glu | Asp | Leu | Thr | Met |     |      |  |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |      |  |
| acc | cgc | aac | ccg | caa | ccc | ttc | atg | cgc | ccc | cac | gag | cgc | aac | ggc | ttt | 816  |  |
| Thr | Arg | Asn | Pro | Gln | Pro | Phe | Met | Arg | Pro | His | Glu | Arg | Asn | Gly | Phe |      |  |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |      |  |
| acg | gtg | ttg | tgt | ccc | aaa | aat | atg | ata | atc | aaa | ccg | ggc | aag | atc | tcg | 864  |  |
| Thr | Val | Leu | Cys | Pro | Lys | Asn | Met | Ile | Ile | Lys | Pro | Gly | Lys | Ile | Ser |      |  |
|     |     | 275 |     |     |     | 280 |     |     |     |     |     | 285 |     |     |     |      |  |
| cac | atc | atg | ctg | gat | gtg | gct | ttt | acc | tca | cac | gag | cat | ttt | ggg | ctg | 912  |  |
| His | Ile | Met | Leu | Asp | Val | Ala | Phe | Thr | Ser | His | Glu | His | Phe | Gly | Leu |      |  |
|     |     | 290 |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |      |  |
| ctg | tgt | ccc | aag | agc | atc | ccg | ggc | ctg | agc | atc | tca | ggt | aac | ctg | ttg | 960  |  |
| Leu | Cys | Pro | Lys | Ser | Ile | Pro | Gly | Leu | Ser | Ile | Ser | Gly | Asn | Leu | Leu |      |  |
|     |     | 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |      |  |
| atg | aac | ggg | cag | cag | atc | ttc | ctg | gag | gta | caa | gcc | ata | cgc | gag | acc | 1008 |  |
| Met | Asn | Gly | Gln | Gln | Ile | Phe | Leu | Glu | Val | Gln | Ala | Ile | Arg | Glu | Thr |      |  |
|     |     |     | 325 |     |     |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |      |  |
| gtg | gaa | ctg | cgt | cag | tac | gat | ccc | gtg | gct | gcg | ctc | ttc | ttt | ttc | gat | 1056 |  |
| Val | Glu | Leu | Arg | Gln | Tyr | Asp | Pro | Val | Ala | Ala | Leu | Phe | Phe | Phe | Asp |      |  |

# ES 2 429 338 T3

| 340                                                                                                                                                   | 345 | 350 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| atc gac ttg ctg ctg cag cgc ggg cct cag tac agc gag cac ccc acc<br>Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr<br>355 360 365     |     |     | 1104 |
| ttc acc agc cag tat cgc atc cag ggc aag ctt gag tac cga cac acc<br>Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr<br>370 375 380     |     |     | 1152 |
| tgg gac cgg cac gac gag ggt gcc gcc cag ggc gac gac gac gtc tgg<br>Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp<br>385 390 395 400 |     |     | 1200 |
| acc agc gga tcg gac tcc gac gaa gaa ctc gta acc acc gag cgc aag<br>Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys<br>405 410 415     |     |     | 1248 |
| acg ccc cgc gtc acc ggc ggc ggc gcc atg gcg ggc gcc tcc act tcc<br>Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser<br>420 425 430     |     |     | 1296 |
| gcg ggc cgc aaa cgc aaa tca gca tcc tcg gcg acg gcg tgc acg tcg<br>Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser<br>435 440 445     |     |     | 1344 |
| ggc gtt atg aca cgc ggc cgc ctt aag gcc gag tcc acc gtc gcg ccc<br>Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro<br>450 455 460     |     |     | 1392 |
| gaa gag gac acc gac gag gat tcc gac aac gaa atc cac aat ccg gcc<br>Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala<br>465 470 475 480 |     |     | 1440 |
| gtg ttc acc tgg ccg ccc tgg cag gcc ggc atc ctg gcc cgc aac ctg<br>Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu<br>485 490 495     |     |     | 1488 |
| gtg ccc atg gtg gct acg gtt cag ggt cag aat ctg aag tac cag gaa<br>Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu<br>500 505 510     |     |     | 1536 |
| ttc ttc tgg gac gcc aac gac atc tac cgc atc ttc gcc gaa ttg gaa<br>Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu<br>515 520 525     |     |     | 1584 |
| ggc gta tgg cag ccc gct gcg caa ccc aaa cgt cgc cgc cac ccg caa<br>Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln<br>530 535 540     |     |     | 1632 |
| gac gcc ttg ccc ggg cca tgc atc gcc tcg acg ccc aaa aag cac cga<br>Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg<br>545 550 555 560 |     |     | 1680 |
| ggt<br>Gly                                                                                                                                            |     |     | 1683 |

<210> 2

<211> 561

<212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 2

# ES 2 429 338 T3

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

# ES 2 429 338 T3

Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu  
 225 230 235 240  
 Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met  
 245 250 255  
 Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe  
 260 265 270  
 Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser  
 275 280 285  
 His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu  
 290 295 300  
 Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr  
 325 330 335  
 Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp  
 340 345 350  
 Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr  
 355 360 365  
 Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr  
 370 375 380  
 Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp  
 385 390 395 400  
 Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys  
 405 410 415  
 Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser  
 420 425 430  
 Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser  
 435 440 445  
 Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro  
 450 455 460  
 Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala

# ES 2 429 338 T3

465                      470                      475                      480

Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu  
                                  485                      490                      495

Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu  
                                  500                      505                      510

Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu  
                                  515                      520                      525

Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln  
                                  530                      535                      540

Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg  
 545                      550                      555                      560

Gly

<210> 3

<211> 1683

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1683)

15 <400> 3

|                                                                            |     |
|----------------------------------------------------------------------------|-----|
| atg gag tcc cgc ggt cgc cgc tgt ccc gaa atg ata tcc gta ctg ggt            | 48  |
| Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly            |     |
| 1                      5                      10                      15   |     |
| ccc att tcc ggg cac gtg ctg aaa gcc gtg ttt agt cgc ggc gat acc            | 96  |
| Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr            |     |
| 20                      25                      30                         |     |
| ccc gtg ctg ccc cac gag acc cga ctc ctg cag acc ggt atc cac gta            | 144 |
| Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val            |     |
| 35                      40                      45                         |     |
| cgc gtg agc cag ccc tcc ctg atc ttg gta tcc cag tac acc ccc gac            | 192 |
| Arg Val Ser Gln Pro Ser Leu Ile Leu Val Ser Gln Tyr Thr Pro Asp            |     |
| 50                      55                      60                         |     |
| tcc acc cca tgc cac cgc ggc gac aat cag ctg cag gtg cag cac acc            | 240 |
| Ser Thr Pro Cys His Arg Gly Asp Asn Gln Leu Gln Val Gln His Thr            |     |
| 65                      70                      75                      80 |     |

# ES 2 429 338 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| tac ttt acc ggc agc gag gtg gag aac gtg tcc gtc aac gtg cac aac<br>Tyr Phe Thr Gly Ser Glu Val Glu Asn Val Ser Val Asn Val His Asn<br>85 90 95        | 288  |
| ccc acc ggc cga agc atc tgc ccc agc cag gag ccc atg tcc atc tat<br>Pro Thr Gly Arg Ser Ile Cys Pro Ser Gln Glu Pro Met Ser Ile Tyr<br>100 105 110     | 336  |
| gtg tac gcc ctg ccc ctc aag atg ctg aac atc ccc agc atc aac gtg<br>Val Tyr Ala Leu Pro Leu Lys Met Leu Asn Ile Pro Ser Ile Asn Val<br>115 120 125     | 384  |
| cac cac tac ccc tcc gcc gcc gag cgc aaa cac cga cac ctg ccc gta<br>His His Tyr Pro Ser Ala Ala Glu Arg Lys His Arg His Leu Pro Val<br>130 135 140     | 432  |
| gct gac gct gtg att cac gcc tcc ggc aag cag atg tgg cag gcc cgc<br>Ala Asp Ala Val Ile His Ala Ser Gly Lys Gln Met Trp Gln Ala Arg<br>145 150 155 160 | 480  |
| ctc acc gtc tcc gga ctg gcc tgg acc cgc cag cag aac cag tgg aaa<br>Leu Thr Val Ser Gly Leu Ala Trp Thr Arg Gln Gln Asn Gln Trp Lys<br>165 170 175     | 528  |
| gag ccc gac gtc tac tac acc tca gcc ttc gtg ttt ccc acc aag gac<br>Glu Pro Asp Val Tyr Tyr Thr Ser Ala Phe Val Phe Pro Thr Lys Asp<br>180 185 190     | 576  |
| gtg gca ctg cgg cac gtg gtg tgc gcc cac gag ctg gtt tgc tcc atg<br>Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met<br>195 200 205     | 624  |
| gag aac acc cgc gca acc aag atg cag gtg ata ggt gac cag tac gtc<br>Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val<br>210 215 220     | 672  |
| aag gtg tac ctg gag tcc ttc tgc gag gac gtg ccc tcc ggc aag ctc<br>Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu<br>225 230 235 240 | 720  |
| ttt atg cac gtc acc ctg ggc tct gac gtg gaa gag gac ctg acc atg<br>Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met<br>245 250 255     | 768  |
| acc cgc aac ccc caa ccc ttc atg cgc ccc cac gag cgc aac ggc ttt<br>Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe<br>260 265 270     | 816  |
| acc gtg ttg tgt ccc aaa aat atg ata atc aaa ccc ggc aag atc tcc<br>Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser<br>275 280 285     | 864  |
| cac atc atg ctg gat gtg gct ttt acc tca cac gag cat ttt ggg ctg<br>His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu<br>290 295 300     | 912  |
| ctg tgt ccc aag agc atc ccc ggc ctg agc atc tca ggt aac ctg ttg<br>Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu<br>305 310 315 320 | 960  |
| atg aac ggg cag cag atc ttc ctg gag gta caa gcc ata cgc gag acc                                                                                       | 1008 |

# ES 2 429 338 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Met | Asn | Gly | Gln | Gln | Ile | Phe | Leu | Glu | Val | Gln | Ala | Ile | Arg | Glu | Thr |      |  |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |      |  |
| gtg | gaa | ctg | cgc | cag | tac | gat | ccc | gtg | gct | gcc | ctc | ttc | ttt | ttc | gat | 1056 |  |
| Val | Glu | Leu | Arg | Gln | Tyr | Asp | Pro | Val | Ala | Ala | Leu | Phe | Phe | Phe | Asp |      |  |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |      |  |
| atc | gac | ttg | ctg | ctg | cag | cgc | ggg | cct | cag | tac | agc | gag | cac | ccc | acc | 1104 |  |
| Ile | Asp | Leu | Leu | Leu | Gln | Arg | Gly | Pro | Gln | Tyr | Ser | Glu | His | Pro | Thr |      |  |
|     |     |     | 355 |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |      |  |
| ttc | acc | agc | cag | tat | cgc | atc | cag | ggc | aag | ctt | gag | tac | cga | cac | acc | 1152 |  |
| Phe | Thr | Ser | Gln | Tyr | Arg | Ile | Gln | Gly | Lys | Leu | Glu | Tyr | Arg | His | Thr |      |  |
|     |     |     | 370 |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |      |  |
| tgg | gac | cgg | cac | gac | gag | ggg | gcc | gcc | cag | ggc | gac | gac | gac | gtc | tgg | 1200 |  |
| Trp | Asp | Arg | His | Asp | Glu | Gly | Ala | Ala | Gln | Gly | Asp | Asp | Asp | Val | Trp |      |  |
|     |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     | 400 |     |      |  |
| acc | agc | gga | tcc | gac | tcc | gac | gaa | gaa | ctc | gta | acc | acc | gag | cgc | aag | 1248 |  |
| Thr | Ser | Gly | Ser | Asp | Ser | Asp | Glu | Glu | Leu | Val | Thr | Thr | Glu | Arg | Lys |      |  |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |      |  |
| acc | ccc | cgc | gtc | acc | ggc | ggc | ggc | gcc | atg | gcc | ggc | gcc | tcc | act | tcc | 1296 |  |
| Thr | Pro | Arg | Val | Thr | Gly | Gly | Gly | Ala | Met | Ala | Gly | Ala | Ser | Thr | Ser |      |  |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |      |  |
| gcc | ggc | cgc | aaa | cgc | aaa | tca | gca | tcc | tcc | gcc | acc | gcc | tgc | acc | tcc | 1344 |  |
| Ala | Gly | Arg | Lys | Arg | Lys | Ser | Ala | Ser | Ser | Ala | Thr | Ala | Cys | Thr | Ser |      |  |
|     |     |     | 435 |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |     |      |  |
| ggc | gtt | atg | aca | cgc | ggc | cgc | ctt | aag | gcc | gag | tcc | acc | gtc | gcc | ccc | 1392 |  |
| Gly | Val | Met | Thr | Arg | Gly | Arg | Leu | Lys | Ala | Glu | Ser | Thr | Val | Ala | Pro |      |  |
|     | 450 |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |     |      |  |
| gaa | gag | gac | acc | gac | gag | gat | tcc | gac | aac | gaa | atc | cac | aat | ccc | gcc | 1440 |  |
| Glu | Glu | Asp | Thr | Asp | Glu | Asp | Ser | Asp | Asn | Glu | Ile | His | Asn | Pro | Ala |      |  |
|     | 465 |     |     |     | 470 |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |     |      |  |
| gtg | ttc | acc | tgg | cca | ccc | tgg | cag | gcc | ggc | atc | ctg | gcc | cgc | aac | ctg | 1488 |  |
| Val | Phe | Thr | Trp | Pro | Pro | Trp | Gln | Ala | Gly | Ile | Leu | Ala | Arg | Asn | Leu |      |  |
|     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     |     | 495 |     |      |  |
| gtg | ccc | atg | gtg | gct | acc | gtt | cag | ggg | cag | aat | ctg | aag | tac | cag | gaa | 1536 |  |
| Val | Pro | Met | Val | Ala | Thr | Val | Gln | Gly | Gln | Asn | Leu | Lys | Tyr | Gln | Glu |      |  |
|     |     |     | 500 |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     | 510 |     |     |      |  |
| ttc | ttc | tgg | gac | gcc | aac | gac | atc | tac | cgc | atc | ttc | gcc | gaa | ttg | gaa | 1584 |  |
| Phe | Phe | Trp | Asp | Ala | Asn | Asp | Ile | Tyr | Arg | Ile | Phe | Ala | Glu | Leu | Glu |      |  |
|     |     | 515 |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |     |      |  |
| ggc | gta | tgg | cag | ccc | gct | gcc | caa | ccc | aaa | cgc | cgc | cgc | cac | cgg | caa | 1632 |  |
| Gly | Val | Trp | Gln | Pro | Ala | Ala | Gln | Pro | Lys | Arg | Arg | Arg | His | Arg | Gln |      |  |
|     |     | 530 |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |     |      |  |
| gac | gcc | ttg | ccc | ggg | cca | tgc | atc | gcc | tcc | acc | ccc | aaa | aag | cac | cga | 1680 |  |
| Asp | Ala | Leu | Pro | Gly | Pro | Cys | Ile | Ala | Ser | Thr | Pro | Lys | Lys | His | Arg |      |  |
|     | 545 |     |     | 550 |     |     |     | 555 |     |     |     |     |     | 560 |     |      |  |
| ggt |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1683 |  |
| Gly |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |

<210> 4

<211> 561

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones

<400> 4

# ES 2 429 338 T3

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

# ES 2 429 338 T3

Val Ala Leu Arg His Val Val Cys Ala His Glu Leu Val Cys Ser Met  
195 200 205

Glu Asn Thr Arg Ala Thr Lys Met Gln Val Ile Gly Asp Gln Tyr Val  
210 215 220

Lys Val Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Glu Asp Val Pro Ser Gly Lys Leu  
225 230 235 240

Phe Met His Val Thr Leu Gly Ser Asp Val Glu Glu Asp Leu Thr Met  
245 250 255

Thr Arg Asn Pro Gln Pro Phe Met Arg Pro His Glu Arg Asn Gly Phe  
260 265 270

Thr Val Leu Cys Pro Lys Asn Met Ile Ile Lys Pro Gly Lys Ile Ser  
275 280 285

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu  
290 295 300

Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu  
305 310 315 320

Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr  
325 330 335

Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp  
340 345 350

Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr  
355 360 365

Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr  
370 375 380

Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp  
385 390 395 400

Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys  
405 410 415

Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser  
420 425 430

Ala Gly Arg Lys Arg Lys Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser

# ES 2 429 338 T3

435                      440                      445  
 Gly Val Met Thr Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro  
 450                      455                      460  
 Glu Glu Asp Thr Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala  
 465                      470                      475                      480  
 Val Phe Thr Trp Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu  
 485                      490                      495  
 Val Pro Met Val Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu  
 500                      505                      510  
 Phe Phe Trp Asp Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu  
 515                      520                      525  
 Gly Val Trp Gln Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln  
 530                      535                      540  
 Asp Ala Leu Pro Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg  
 545                      550                      555                      560

Gly

<210> 5

<211> 1671

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones

<400> 5

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggagtcgcc gcggtcgccg ctgtcccgaa atgatataccg tactgggtcc catttcggg | 60  |
| cacgtgctga aagccgtgtt tagtcgcgc gataccccg tgctgcccc cgagaccga      | 120 |
| ctcctgcaga ccggtatcca cgtacgcgtg agccagccct ccctgatctt ggatcccag   | 180 |
| tacacccccg actccacccc atgccaccgc ggcgacaatc agctgcaggt gcagcacacc  | 240 |
| tactttaccg gcagcgaggt ggagaacgtg tccgtcaacg tgcacaaccc caccggccga  | 300 |
| agcatctgcc ccagccagga gccatgtcc atctatgtgt acgccctgcc cctcaagatg   | 360 |
| ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac taccctccg ccgccgagcg caaacaccga   | 420 |
| cacctgcccc tagctgacgc tgtgattcac gcctccggca agcagatgtg gcaggccccgc | 480 |
| ctcaccgtct ccggactggc ctggacccgc cagcagaacc agtggaaga gcccgacgtc   | 540 |

# ES 2 429 338 T3

```
tactacacct cagccttcgt gtttcccaacc aaggacgtgg cactgcggca cgtggtgtgc 600
gcccacgagc tggtttgctc catggagaac acccgcgcaa ccaagatgca ggtgataggt 660
gaccagtacg tcaagggtga cctggagtcc ttctgcgag acgtgccctc cggcaagctc 720
tttatgcacg tcacctggg ctctgacgtg gaagaggacc tgaccatgac ccgcaacccc 780
caacccttca tgcgccccca cgagcgcaac ggctttaccg tgttgtgtcc caaaaatatg 840
ataatcaaac ccggcaagat ctccacatc atgctggatg tggcttttac ctcacacgag 900
cattttgggc tgctgtgtcc caagagcatc cccggcctga gcattctcagg taacctgttg 960
atgaacgggc agcagatctt cctggaggta caagccatac gcgagaccgt ggaactgcgc 1020
cagtacgac cctgggtgct cctcttcttt ttcgatatcg acttgctgct gcagcgcggg 1080
cctcagtaca gcgagcacc caccctcacc agccagtatc gcattccagg caagcttgag 1140
taccgacaca cctgggaccg gcacgacgag ggtgccgccc agggcgacga cgacgtctgg 1200
accagcggat ccgactccga cgaagaactc gtaaccaccg agcgcgaagac ccccgcgctc 1260
accggcgggc gcgcatggc cggcgctcc acttcgccc gctcagcatc ctccgccacc 1320
gcctgcacct ccggcgttat gacacggg cgccttaagg ccgagtcac cgtcgcccc 1380
gaagaggaca ccgacgagga ttccgacaac gaaatccaca atcccgccgt gttcacctgg 1440
ccacctggc agggccgcat cctggcccgc aacctggtgc ccatggtggc taccgttcag 1500
ggtcagaatc tgaagtacca ggaattcttc tgggacgcca acgacatcta ccgcatcttc 1560
gccgaattgg aaggcgtatg gcagcccgt gcccaacca aacgccgccg ccaccggcaa 1620
gacgccttgc ccgggccatg catgcctcc acccccacaaa agcaccgagg t 1671
```

<210> 6

<211> 557

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones

<400> 6

```
Met Glu Ser Arg Gly Arg Arg Cys Pro Glu Met Ile Ser Val Leu Gly
1          5          10          15
```

```
Pro Ile Ser Gly His Val Leu Lys Ala Val Phe Ser Arg Gly Asp Thr
          20          25          30
```

```
Pro Val Leu Pro His Glu Thr Arg Leu Leu Gln Thr Gly Ile His Val
35          40          45
```

# ES 2 429 338 T3

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

# ES 2 429 338 T3

His Ile Met Leu Asp Val Ala Phe Thr Ser His Glu His Phe Gly Leu  
 290 295 300  
 Leu Cys Pro Lys Ser Ile Pro Gly Leu Ser Ile Ser Gly Asn Leu Leu  
 305 310 315 320  
 Met Asn Gly Gln Gln Ile Phe Leu Glu Val Gln Ala Ile Arg Glu Thr  
 325 330 335  
 Val Glu Leu Arg Gln Tyr Asp Pro Val Ala Ala Leu Phe Phe Phe Asp  
 340 345 350  
 Ile Asp Leu Leu Leu Gln Arg Gly Pro Gln Tyr Ser Glu His Pro Thr  
 355 360 365  
 Phe Thr Ser Gln Tyr Arg Ile Gln Gly Lys Leu Glu Tyr Arg His Thr  
 370 375 380  
 Trp Asp Arg His Asp Glu Gly Ala Ala Gln Gly Asp Asp Asp Val Trp  
 385 390 395 400  
 Thr Ser Gly Ser Asp Ser Asp Glu Glu Leu Val Thr Thr Glu Arg Lys  
 405 410 415  
 Thr Pro Arg Val Thr Gly Gly Gly Ala Met Ala Gly Ala Ser Thr Ser  
 420 425 430  
 Ala Gly Ser Ala Ser Ser Ala Thr Ala Cys Thr Ser Gly Val Met Thr  
 435 440 445  
 Arg Gly Arg Leu Lys Ala Glu Ser Thr Val Ala Pro Glu Glu Asp Thr  
 450 455 460  
 Asp Glu Asp Ser Asp Asn Glu Ile His Asn Pro Ala Val Phe Thr Trp  
 465 470 475 480  
 Pro Pro Trp Gln Ala Gly Ile Leu Ala Arg Asn Leu Val Pro Met Val  
 485 490 495  
 Ala Thr Val Gln Gly Gln Asn Leu Lys Tyr Gln Glu Phe Phe Trp Asp  
 500 505 510  
 Ala Asn Asp Ile Tyr Arg Ile Phe Ala Glu Leu Glu Gly Val Trp Gln  
 515 520 525  
 Pro Ala Ala Gln Pro Lys Arg Arg Arg His Arg Gln Asp Ala Leu Pro  
 530 535 540  
 Gly Pro Cys Ile Ala Ser Thr Pro Lys Lys His Arg Gly  
 545 550 555

- 5
- <210> 7
  - <211> 1683
  - <212> DNA
  - <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones

<400> 7

5

```

atggagagca ggggcaggag gtgccccgag atgatcagcg tgctggggccc catcagcggc    60
cacgtgctga aggccgtgtt cagcaggggc gacacccccg tgctgcccga cgagaccagg    120
ctgctgcaga ccggcatcca cgtgaggggtg agccagccca gcctgacccg ggtgagccag    180
tacacccccg acagcacccc ctgccacagg ggcgacaacc agctgcaggt gcagcacacc    240
tacttcaccg gcagcgaggt ggagaacgtg agcgtgaacg tgcacaaccc caccggcagg    300
agcatctgcc ccagccaggag gcccatgagc atctacgtgt acgccctgcc cctgaagatg    360
ctgaacatcc ccagcatcaa cgtgcaccac taccccagcg ccgccgagag gaagcacagg    420
cacctgcccc tgggccgacg cgtgatccac gccagcggca agcagatgtg gcaggccagg    480
ctgaccgtga gcggcctggc ctggaccagg cagcagaacc agtggaagga gcccgacgtg    540
tactacacca gcgccttcgt gttccccacc aaggacgtgg ccctgaggca cgtggtgtgc    600
gcccacgagc tggtgtgtag catggagaac accaggggca ccaagatgca ggtgatcggc    660
gaccagtacg tgaaggtgta cctggagagc ttctgcgagg acgtgcccag cggcaagctg    720
ttcatgcacg tgaccttggg cagcgacgtg gaggaggacc tgacctgac caggaacccc    780
cagcccttca tgaggcccca cgagaggaac ggcttcaccg tgctgtgccc caagaacatg    840
atcatcaagc ccggcaagat cagccacatc atgctggacg tggccttcac cagccacgag    900
cacttcggcc tgctgtgccc caagagcatc cccggcctga gcatcagcgg caacctgctg    960
atgaacggcc agcagatctt cctggagggtg caggccatca gggagaccgt ggagctgagg   1020
cagtacgacc ccgtggcgcc cctgtttctt ttcgacatcg acctgctgct gcagaggggc   1080
ccccagtaca gcgagcaccc caccctcacc agccagtaca ggatccaggg caagctggag   1140
tacaggcaca cctgggacag gcacgacgag ggcgcgccc agggcgacga cgacgtgtgg   1200
accagcggca gcgacagcga cgaggagctg gtgaccaccg agaggaagac ccccagggtg   1260
accggcgcg cgcgcatggc cggcgccagc accagcgccc gcaggaagag gaagagcgcc   1320
agcagcgcca ccgcctgcac cagcgcgctg atgaccaggg gcaggctgaa ggccgagagc   1380
accgtggccc ccgaggaggga caccgacgag gacagcgaca acgagatcca caaccccgcc   1440
gtgttcacct ggccccctg gcaggccggc atcctggcca ggaacctggt gcccatggtg   1500
gccaccgtgc agggccagaa cctgaagtac caggagtctt tctgggacgc caacgacatc   1560
tacaggatct tcgccgagct ggagggcggtg tggcagcccc ccgccagccc caagaggagg   1620
aggcacaggc aggaacgcct gcccgcccc tgcatcgcca gcacccccaa gaagcacagg   1680
ggc                                     1683

```

10

<210> 8

<211> 1683

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones

<400> 8

```

atggagagcc gcgggagaag atgtcccag atgatcagtg tcctgggccc aatatctggc 60
cacgtgctga aggctgtctt ctcgagggga gatacaccag ttcttcctca cgaaaccaga 120
ctgctccaga caggatttca tgtccgctg tctcagccgt cactcatcct tgtagccag 180
tacactccgg atagtactcc atgccatagg ggcgacaacc agctccaagt tcagcatacg 240
tattttacag ggtccgaggt ggagaatgtg agcgtcaatg tgcacaaccc caccggacgt 300
tcaatatgcc catctcagga acctatgtct atctacgttt atgactgcc tttgaagatg 360
ctgaacatcc ccagttatga tggttaccat taccctctg ctgctgaacg caagcacagg 420
catctccccg tggccgacgc tgtgatccat gctagtggca aacagatgtg gcaggcacga 480
ttaacagtaa gcgggttggc atggacacgg cagcagaatc agtggaaaga gcccgcagta 540
tactatacca gtgcctttgt ttttctacc aaggacgtcg ccttaagaca tgtgtctgc 600
gcgcacgagc tgggtgttag catggaaaac actcgtgcaa ctaaaatgca ggtgattggc 660
gatcagtatg ttaaggtcta tctggagtca ttctgtgagg acgtcccatc cgggaaacta 720
ttcatgcacg tcactcttgg ttcggatgtg gaagaagatc tgacaatgac ccggaacccc 780
caacccttta tgcggcctca cgaacggaac gggttcacag tgctatgcc caaaaatatg 840
atcattaaac ccggttaagt atcccatatc atgctcgatg tggctttcac ctcccacgaa 900
cacttcgggc tgctgtgtcc caagtccatc ccaggactca gcatatccgg caatttatg 960
atgaacggtc aacagatctt cctggaggtg caggcaatca gagaaacagt ggaactccgc 1020
cagtatgacc ctgtggcggc tctgtttttc ttgacattg atctgttct tcaacgagga 1080
ccacaatatt ctgagcatcc aacatttact tcccagtacc gtatccaagg caagctcgaa 1140
tacaggcaca cgtgggacag gcacgacgag ggggctgccc aaggggacga tgacgtatgg 1200
acatccggct ccgatatgta tgaggagctt gtgaccaccg agcgggaagac cccaagagtg 1260
acgggcgag gtgcaatggc cggagcatct accagcgccg ggcggaagcg aaaatctgcc 1320
tcacagcaa ctgcttgac cagcgggtga atgacgagg gacgcctaaa ggctgagagc 1380
accgtggccc ctgaggaaga tactgacgag gactcagaca acgaaattca caatcctgcc 1440
gtgttcacat ggctccttg gcaggccgga attctggccc ggaacttggg accgatggtg 1500
gccactgttc agggccagaa cctgaaatac caggagtttt tctgggatgc caatgacatc 1560
tacagaatth ttgcggaact ggagggagtg tggcagccag ccgcacaacc caagcgccgg 1620
cgccataggc aggatgccct gccgggccct tgcatcgca gcacccaaa aaagcaccga 1680
ggc 1683

```

5 <210> 9  
 <211> 1683  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones  
 <400> 9

```

atggaatctc gaggtagacg ttgtccggag atgatcagcg tgctaggacc aataagtggg    60
cacgtcctga aggctgtggt ttcaaggggg gatacgccag tgctcccaca cgagacccgc    120
ctgctacaaa caggtattca cgttagggtc tcacagccca gcctaatttt ggtagccag    180
tatacacccg actccacccc ttgtcatcgc ggcgacaacc agctgcaagt ccagcatact    240
tatttcacag gcagcgaggt ggaaaatgtg tcggtcaatg tgcataaccc taccgggctg    300
tccatctgcc cttcacagga gcctatgtct atctacgtgt atgctttacc tttgaagatg    360
ttaaacatcc cctctatcaa tgtgcaccat tatccttcag cggctgagcg gaaacaccgc    420
cacttacccg tggctgacgc agtcatacac gcgagcggta agcagatgtg gcaagcacga    480
ctgacgggtc cgggtctggc ttggactaga cagcagaatc agtggaagga acctgatgtg    540
tactacacca gcgcatttgt cttcccaacc aaagacgtgg cactgcgcca cgtagtgtgc    600
gcccatgaac tgggtgtgtc catggagaac acccgggcaa ccaagatgca ggtaattggc    660
gatcagtatg tgaaagttaa ccttgagtcc ttttgtgagg atgtaccag cggaagctg    720
ttcatgcatg tgacgttggg cagtgcgtg gaagaggacc tgacaatgac tcgaaatcca    780
caaccattta tgaggccgca cgaaagaaac gggtttacag tgctctgccc aaagaacatg    840
atcatcaagc ccgggaagat tagtcatatt atgctcgatg ttgccttcac cagtcacgaa    900
cattttggac tcctttgccc caaatccatc ccaggcttgt caatttcagg caatctcttc    960
atgaacggac agcagatttt cctggagggt caagcgatcc gggagactgt agagctgaga   1020
cagtatgac cgtgtgcagc cctgttcttc ttcgatatcg acctctctct tcagcgaggc   1080
ccgcagtaca gcgaacaccc aacctttaca tctcagtacc gcatccaagg gaaactggag   1140
tatcgtcata cctgggacag gcatgacgaa ggggccgctc aaggagacga tgatgtgtgg   1200
acaagtggct cggattccga tgaggagtgt gtgacaaccg aaagaaagac tcccagggtt   1260
accggaggag gagcaatggc aggtgcttcc actagcgtg gcaggaaaac gaaaagcgcc   1320
tccagtgcc cagcctgcac ttctggcgtc atgacgaggg ggcggctgaa agccgaatct   1380
actgtagccc ctgaggagga cactgacgag gattctgaca atgaaattca caatcccgcg   1440
gtttttacat ggcccccttg gcaggccgga attctggccc ggaaccttgt gcccatggtc   1500
gccacagtcc aaggccagaa cctgaagtac caggaatttt tctgggatgc caacgacata   1560
tacagaatct tcgcagaact ggagggagtt tggcagcccc ctgctcagcc taaacgcaga   1620
cggcacagac aggacgccct ccaggggccg tgcatagcct ctaccccaaa gaagcaccgc   1680
ggt                                     1683

```

5 <210> 10  
 <211> 1683  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de hCMV pp65 optimizada por códones  
 <400> 10

```

atggaatcgc gtggcaggcg atgtcccga atgatttcag tcttaggccc aatctccggg    60
cacgtgctca aagcagtcct ctccaggggg gataccccag tgctccctca cgagacgagg    120
cttctgcaga ccggcataka tgtcagagtt tctcagccca gccttatctt ggatatctcag    180
tacaccccg acagtacacc gtgtcacaga ggagacaacc agctccaagt ccagcataca    240
tacttcacag gctcgggaagt ggaaaacgtg tctgtgaacg tccataaccc aactggcccg    300
tcaatttgcc cctctcagga gcctatgagt atctatgtgt atgctctgcc cctcaaatg    360
ctgaacatcc caagtattaa tgtccatcat taccctagcg cagccgagag aaagcatcgc    420
cacctgcctg tggctgacgc tgtgatacac gcttcaggtg agcaaatgtg gcaggcccg    480
cttacagtgt ctggattggc atggacacgg cagcagaacc agtgaagga gcccgatgtg    540
tactatacta gcgcttttgt gttccccacg aaagatgtcg ccttacgaca cgttgtatgc    600
gcacacgagc tagtgtgtag tatggagaac acacgtgcc acaaatgca ggtcatcggc    660
gatcaatacg tcaagggtga cctggagagt ttttgcgaag atgttccttc cggcaaatg    720
ttcatgcatg tgaccctggg ttctgatgtt gaggaggatc tgacaatgac tcgaaatccc    780
cagcctttca tgcgcctca cgaacgggac gggtttacag tgctgtgccc gaagaacatg    840
attatcaaac ccggaaaaat tccccacatt atgttgatg tagcctttac cagccatgaa    900
cacttcggac ttctctgtcc aaagtcaatt ccagggtgt ctataagcgg gaaccttcta    960
atgaatggcc agcagatctt tctcgaggtg caggccataa gagagactgt ggagctccgg    1020
caatacgatc cggttgcggc cctcttcttt ttcgacatcg acctgttact gcagcgcggt    1080
ccacagtata gcgaacaccc aactttcacc agtcagtatc gtatccaagg taagctggag    1140
tatagacaca cgtgggatcg ccatgacgaa ggtgcagccc aaggcgacga cgacgtttgg    1200
acctccggat ctgactcaga tgaggagctg gttaccacag aaagaaagac tcccagggtc    1260
actggagggt gggctatggc tggagcaagc actagcgag gccggaaacg aaagtccgcc    1320
agctccgcca cagcttgac ctcaggcgta atgacgggg gaagactgaa agccgagtcc    1380
actgtggcac ctgaagagga cacagacgaa gattccgaca atgaaatcca caatcccga    1440
gtttttacct gggcaccttg gcaggcgggg attctggcgc gcaatctggt gcccatggtg    1500
gctaccgtac aaggccagaa tttgaagtac caggagtctt tttgggacgc caatgacatc    1560
tatagaatct ttgccgaact ggaggggggtg tggcagccag ccgctcaacc aaagaggagg    1620
cgccaccggc aggatgcgct acccgacct tgcacgcca gcaccctaa gaagcatagg    1680
ggg                                                                1683

```

5 <210> 11  
 <211> 2718  
 <212> DNA  
 <213> Citomegalovirus humano

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1) .. (2718)

15 <400> 11

# ES 2 429 338 T3

|                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| atg gaa tcc agg atc tgg tgc ctg gta gtc tgc gtt aac ctg tgt atc<br>Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile<br>1 5 10 15       | 48  |
| gtc tgt ctg ggt gct gcg gtt tcc tct tct agt act tcc cat gca act<br>Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr<br>20 25 30            | 96  |
| tct tct act cac aat gga agc cat act tct cgt acg acg tct gct caa<br>Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln<br>35 40 45        | 144 |
| acc cgg tca gtc tat tct caa cac gta acg tct tct gaa gcc gtc agt<br>Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser<br>50 55 60        | 192 |
| cat aga gcc aac gag act atc tac aac act acc ctc aag tac gga gat<br>His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp<br>65 70 75 80     | 240 |
| gtg gtg gga gtc aac act acc aag tac ccc tat cgc gtg tgt tct atg<br>Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met<br>85 90 95        | 288 |
| gcc cag ggt acg gat ctt att cgc ttt gaa cgt aat atc atc tgc acc<br>Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr<br>100 105 110     | 336 |
| tcg atg aag cct atc aat gaa gac ttg gat gag ggc atc atg gtg gtc<br>Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val<br>115 120 125     | 384 |
| tac aag cgc aac atc gtg gcg cac acc ttt aag gta cgg gtc tac caa<br>Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln<br>130 135 140     | 432 |
| aag gtt ttg acg ttt cgt cgt agc tac gct tac atc tac acc act tat<br>Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr<br>145 150 155 160 | 480 |
| ctg ctg ggc agc aat acg gaa tac gtg gcg cct cct atg tgg gag att<br>Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile<br>165 170 175     | 528 |
| cat cac atc aac aag ttt gct caa tgc tac agt tcc tac agc cgc gtt<br>His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val<br>180 185 190     | 576 |
| ata gga ggc acg gtt ttc gtg gca tat cat agg gac agt tat gaa aac<br>Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn<br>195 200 205     | 624 |
| aaa acc atg caa tta att ccc gac gat tat tcc aac acc cac agt acc<br>Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr<br>210 215 220     | 672 |
| cgt tac gtg acg gtc aag gat cag tgg cac agc cgc ggc agc acc tgg<br>Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp<br>225 230 235 240 | 720 |
| ctc tat cgt gag acc tgt aat ctg aac tgt atg ctg acc atc act act<br>Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr<br>245 250 255     | 768 |
| gcg cgc tcc aag tat cct tat cat ttt ttt gca act tcc acg ggt gat<br>Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp<br>260 265 270     | 816 |
| gtg gtt tac att tct cct ttc tac aac gga acc aat cgc aat gcc agc<br>Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser<br>275 280 285     | 864 |
| tac ttt gga gaa aac gcc gac aag ttt ttc att ttc ccg aac tac acc<br>Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr<br>290 295 300     | 912 |

# ES 2 429 338 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| atc gtt tcc gac ttt gga aga ccc aac gct gcg cca gaa acc cat agg<br>Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg<br>305 310 315 320 | 960  |
| ttg gtg gct ttt ctc gaa cgt gcc gac tcg gtg atc tct tgg gat ata<br>Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile<br>325 330 335     | 1008 |
| cag gac gag aag aat gtc acc tgc cag ctc acc ttc tgg gaa gcc tcg<br>Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser<br>340 345 350     | 1056 |
| gaa cgt act atc cgt tcc gaa gcc gaa gac tcg tac cac ttt tct tct<br>Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser<br>355 360 365     | 1104 |
| gcc aaa atg act gca act ttt ctg tct aag aaa caa gaa gtg aac atg<br>Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met<br>370 375 380     | 1152 |
| tcc gac tcc gcg ctg gac tgc gta cgt gat gag gct ata aat aag tta<br>Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu<br>385 390 395 400 | 1200 |
| cag cag att ttc aat act tca tac aat caa aca tat gaa aaa tac gga<br>Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly<br>405 410 415     | 1248 |
| aac gtg tcc gtc ttc gaa acc agc ggc ggt ctg gtg gtg ttc tgg caa<br>Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln<br>420 425 430     | 1296 |
| ggc atc aag caa aaa tct ttg gtg gaa ttg gaa cgt ttg gcc aat cga<br>Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg<br>435 440 445     | 1344 |
| tcc agt ctg aat atc act cat agg acc aga aga agt acg agt gac aat<br>Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Arg Thr Arg Arg Ser Thr Ser Asp Asn<br>450 455 460     | 1392 |
| aat aca act cat ttg tcc agc atg gaa tcg gtg cac aat ctg gtc tac<br>Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr<br>465 470 475 480 | 1440 |
| gcc cag ctg cag ttc acc tat gac acg ttg cgc ggt tac atc aac cgg<br>Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg<br>485 490 495     | 1488 |
| gcg ctg gcg caa atc gca gaa gcc tgg tgt gtg gat caa cgg cgc acc<br>Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr<br>500 505 510     | 1536 |
| cta gag gtc ttc aag gaa ctc agc aag atc aac ccg tca gcc att ctc<br>Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu<br>515 520 525     | 1584 |
| tcg gcc att tac aac aaa ccg att gcc gcg cgt ttc atg ggt gat gtc<br>Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val<br>530 535 540     | 1632 |
| ttg ggc ctg gcc agc tgc gtg acc atc aac caa acc agc gtc aag gtg                                                                                       | 1680 |

# ES 2 429 338 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val<br>545 550 555 560                                                                    |      |
| ctg cgt gat atg aac gtg aag gaa tcg cca gga cgc tgc tac tca cga<br>Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg<br>565 570 575     | 1728 |
| ccc gtg gtc atc ttt aat ttc gcc aac agc tcg tac gtg cag tac ggt<br>Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly<br>580 585 590     | 1776 |
| caa ctg ggc gag gac aac gaa atc ctg ttg ggc aac cac cgc act gag<br>Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu<br>595 600 605     | 1824 |
| gaa tgt cag ctt ccc agc ctc aag atc ttc atc gcc ggg aac tcg gcc<br>Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala<br>610 615 620     | 1872 |
| tac gag tac gtg gac tac ctc ttc aaa cgc atg att gac ctc agc agt<br>Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser<br>625 630 635 640 | 1920 |
| atc tcc acc gtc gac agc atg atc gcc ctg gat atc gac ccg ctg gaa<br>Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu<br>645 650 655     | 1968 |
| aat acc gac ttc agg gta ctg gaa ctt tac tcg cag aaa gag ctg cgt<br>Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg<br>660 665 670     | 2016 |
| tcc agc aac gtt ttt gac ctc gaa gag atc atg cgc gaa ttc aac tcg<br>Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser<br>675 680 685     | 2064 |
| tac aag cag cgg gta aag tac gtg gag gac aag gta gtc gac ccg cta<br>Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu<br>690 695 700     | 2112 |
| ccg ccc tac ctc aag ggt ctg gac gac ctc atg agc ggc ctg ggc gcc<br>Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala<br>705 710 715 720 | 2160 |
| gcg gga aag gcc gtt ggc gta gcc att ggg gcc gtg ggt ggc gcg gtg<br>Ala Gly Lys Ala Val Gly Val Ala Ile Gly Ala Val Gly Gly Ala Val<br>725 730 735     | 2208 |
| gcc tcc gtg gtc gaa ggc gtt gcc acc ttc ctc aaa aac ccc ttc gga<br>Ala Ser Val Val Glu Gly Val Ala Thr Phe Leu Lys Asn Pro Phe Gly<br>740 745 750     | 2256 |
| gcc ttc acc atc atc ctc gtg gcc ata gcc gta gtc att atc act tat<br>Ala Phe Thr Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val Ile Ile Thr Tyr<br>755 760 765     | 2304 |
| ttg atc tat act cga cag cgg cgt ctg tgc acg cag ccg ctg cag aac<br>Leu Ile Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Leu Cys Thr Gln Pro Leu Gln Asn<br>770 775 780     | 2352 |
| ctc ttt ccc tat ctg gtg tcc gcc gac ggg acc acc gtg acg tcg ggc<br>Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser Gly<br>785 790 795     | 2400 |

# ES 2 429 338 T3

| 785                                                             | 790 | 795 | 800 |      |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|------|
| agc acc aaa gac acg tcg tta cag gct ccg cct tcc tac gag gaa agt |     |     |     | 2448 |
| Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser | 805 | 810 | 815 |      |
| gtt tat aat tct ggt cgc aaa gga ccg gga cca ccg tcg tct gat gca |     |     |     | 2496 |
| Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro Ser Ser Asp Ala | 820 | 825 | 830 |      |
| tcc acg gcg gct ccg cct tac acc aac gag cag gct tac cag atg ctt |     |     |     | 2544 |
| Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu | 835 | 840 | 845 |      |
| ctg gcc ctg gcc cgt ctg gac gca gag cag cga gcg cag cag aac ggt |     |     |     | 2592 |
| Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly | 850 | 855 | 860 |      |
| aca gat tct ttg gac gga cag act ggc acg cag gac aag gga cag aag |     |     |     | 2640 |
| Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln Lys | 865 | 870 | 875 | 880  |
| cct aac ctg cta gac cgg ctg cga cat cgc aaa aac ggc tac aga cac |     |     |     | 2688 |
| Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His | 885 | 890 | 895 |      |
| ttg aaa gac tcc gac gaa gaa gag aac gtc                         |     |     |     | 2718 |
| Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val                         | 900 | 905 |     |      |

<210> 12

<211> 906

5 <212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 12

|                                                                 |    |    |    |  |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|--|
| Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile |    |    |    |  |
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |  |
| Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr     |    |    |    |  |
| 20                                                              | 25 | 30 |    |  |
| Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln |    |    |    |  |
| 35                                                              | 40 | 45 |    |  |
| .                                                               |    |    |    |  |
| Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser |    |    |    |  |
| 50                                                              | 55 | 60 |    |  |
| His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp |    |    |    |  |
| 65                                                              | 70 | 75 | 80 |  |
| Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met |    |    |    |  |
| 85                                                              | 90 | 95 |    |  |

10

# ES 2 429 338 T3

Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr  
100 105 110

Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val  
115 120 125

Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln  
130 135 140

Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr  
145 150 155 160

Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile  
165 170 175

His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val  
180 185 190

Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn  
195 200 205

Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr  
210 215 220

Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp  
225 230 235 240

Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr  
245 250 255

Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp  
260 265 270

Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser  
275 280 285

Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr  
290 295 300

Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg  
305 310 315 320

Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile  
325 330 335

# ES 2 429 338 T3

Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser  
 340 345 350  
 Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser  
 355 360 365  
 Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met  
 370 375 380  
 Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly  
 405 410 415  
 Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln  
 420 425 430  
 Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg  
 435 440 445  
 Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Arg Thr Arg Arg Ser Thr Ser Asp Asn  
 450 455 460  
 Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr  
 465 470 475 480  
 Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg  
 485 490 495  
 Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr  
 500 505 510  
 Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu  
 515 520 525  
 Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val  
 530 535 540  
 Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val  
 545 550 555 560  
 Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg  
 565 570 575  
 Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly

ES 2 429 338 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     | 590 |     |     |     |     |     |  |
| Gln | Leu | Gly | Glu | Asp | Asn | Glu | Ile | Leu | Leu | Gly | Asn | His | Arg | Thr | Glu |  |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |  |
| Glu | Cys | Gln | Leu | Pro | Ser | Leu | Lys | Ile | Phe | Ile | Ala | Gly | Asn | Ser | Ala |  |
|     |     | 610 |     |     |     |     | 615 |     |     |     |     | 620 |     |     |     |  |
| Tyr | Glu | Tyr | Val | Asp | Tyr | Leu | Phe | Lys | Arg | Met | Ile | Asp | Leu | Ser | Ser |  |
|     |     | 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     | 640 |  |
| Ile | Ser | Thr | Val | Asp | Ser | Met | Ile | Ala | Leu | Asp | Ile | Asp | Pro | Leu | Glu |  |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     |     |     | 650 |     |     | 655 |     |  |
| Asn | Thr | Asp | Phe | Arg | Val | Leu | Glu | Leu | Tyr | Ser | Gln | Lys | Glu | Leu | Arg |  |
|     |     |     |     | 660 |     |     |     |     |     |     | 665 |     |     | 670 |     |  |
| Ser | Ser | Asn | Val | Phe | Asp | Leu | Glu | Glu | Ile | Met | Arg | Glu | Phe | Asn | Ser |  |
|     |     |     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |  |
| Tyr | Lys | Gln | Arg | Val | Lys | Tyr | Val | Glu | Asp | Lys | Val | Val | Asp | Pro | Leu |  |
|     |     |     |     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |  |
| Pro | Pro | Tyr | Leu | Lys | Gly | Leu | Asp | Asp | Leu | Met | Ser | Gly | Leu | Gly | Ala |  |
|     |     |     |     | 705 |     |     |     |     |     |     | 710 |     |     | 720 |     |  |
| Ala | Gly | Lys | Ala | Val | Gly | Val | Ala | Ile | Gly | Ala | Val | Gly | Gly | Ala | Val |  |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     |     |     | 730 |     |     | 735 |     |  |
| Ala | Ser | Val | Val | Glu | Gly | Val | Ala | Thr | Phe | Leu | Lys | Asn | Pro | Phe | Gly |  |
|     |     |     |     | 740 |     |     |     |     |     |     | 745 |     |     | 750 |     |  |
| Ala | Phe | Thr | Ile | Ile | Leu | Val | Ala | Ile | Ala | Val | Val | Ile | Ile | Thr | Tyr |  |
|     |     |     |     | 755 |     |     |     |     |     |     | 760 |     |     | 765 |     |  |
| Leu | Ile | Tyr | Thr | Arg | Gln | Arg | Arg | Leu | Cys | Thr | Gln | Pro | Leu | Gln | Asn |  |
|     |     |     |     | 770 |     |     |     |     |     |     | 775 |     |     | 780 |     |  |
| Leu | Phe | Pro | Tyr | Leu | Val | Ser | Ala | Asp | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Ser | Gly |  |
|     |     |     |     | 785 |     |     |     |     |     |     |     |     | 790 | 800 |     |  |
| Ser | Thr | Lys | Asp | Thr | Ser | Leu | Gln | Ala | Pro | Pro | Ser | Tyr | Glu | Glu | Ser |  |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 815 |  |
| Val | Tyr | Asn | Ser | Gly | Arg | Lys | Gly | Pro | Gly | Pro | Pro | Ser | Ser | Asp | Ala |  |
|     |     |     |     | 820 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 830 |  |

# ES 2 429 338 T3

Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala Tyr Gln Met Leu  
835 840 845

Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala Gln Gln Asn Gly  
850 855 860

Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp Lys Gly Gln Lys  
865 870 875 880

Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His  
885 890 895

Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val  
900 905

<210> 13

<211> 2139

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de hCMV gB optimizada por códones

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (2139)

<400> 13

atg gaa tcc agg atc tgg tgc ctg gta gtc tgc gtt aac ctg tgt atc 48  
Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile  
1 5 10 15

gtc tgt ctg ggt gct gcc gtt tcc tct tct agt act tcc cat gca act 96  
Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr  
20 25 30

tct tct act cac aat gga agc cat act tct cgc acc acc tct gct caa 144  
Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln  
35 40 45

acc cgg tca gtc tat tct caa cac gta acc tct tct gaa gcc gtc agt 192  
Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser  
50 55 60

cat aga gcc aac gag act atc tac aac act acc ctc aag tac gga gat 240  
His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp  
65 70 75 80

gtg gtg gga gtc aac act acc aag tac ccc tat cgc gtg tgt tct atg 288  
Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met  
85 90 95

gcc cag ggt acc gat ctt att cgc ttt gaa cgc aat atc atc tgc acc 336

# ES 2 429 338 T3

|                                                                 |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|
| Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr |      |
| 100 105 110                                                     |      |
| tcc atg aag cct atc aat gaa gac ttg gat gag ggc atc atg gtg gtc | 384  |
| Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val |      |
| 115 120 125                                                     |      |
| tac aag cgc aac atc gtg gcc cac acc ttt aag gta cgg gtc tac caa | 432  |
| Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln |      |
| 130 135 140                                                     |      |
| aag gtt ttg acc ttt cgc cgc agc tac gct tac atc tac acc act tat | 480  |
| Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Tyr Ile Tyr Thr Thr Tyr |      |
| 145 150 155 160                                                 |      |
| ctg ctg ggc agc aat acc gaa tac gtg gcc cct cct atg tgg gag att | 528  |
| Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile |      |
| 165 170 175                                                     |      |
| cat cac atc aac aag ttt gct caa tgc tac agt tcc tac agc cgc gtt | 576  |
| His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val |      |
| 180 185 190                                                     |      |
| ata gga ggc acc gtt ttc gtg gca tat cat agg gac agt tat gaa aac | 624  |
| Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn |      |
| 195 200 205                                                     |      |
| aaa acc atg caa tta att ccc gac gat tat tcc aac acc cac agt acc | 672  |
| Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr |      |
| 210 215 220                                                     |      |
| cgc tac gtg acc gtc aag gat cag tgg cac agc cgc ggc agc acc tgg | 720  |
| Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp |      |
| 225 230 235 240                                                 |      |
| ctc tat cgc gag acc tgt aat ctg aac tgt atg ctg acc atc act act | 768  |
| Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr |      |
| 245 250 255                                                     |      |
| gcc cgc tcc aag tat cct tat cat ttt ttt gca act tcc acc ggt gat | 816  |
| Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp |      |
| 260 265 270                                                     |      |
| gtg gtt tac att tct cct ttc tac aac gga acc aat cgc aat gcc agc | 864  |
| Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser |      |
| 275 280 285                                                     |      |
| tac ttt gga gaa aac gcc gac aag ttt ttc att ttc ccc aac tac acc | 912  |
| Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr |      |
| 290 295 300                                                     |      |
| atc gtt tcc gac ttt gga aga ccc aac gct gcc cca gaa acc cat agg | 960  |
| Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg |      |
| 305 310 315 320                                                 |      |
| ttg gtg gct ttt ctc gaa cgc gcc gac tcc gtg atc tct tgg gat ata | 1008 |
| Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile |      |
| 325 330 335                                                     |      |
| cag gac gag aag aat gtc acc tgc cag ctc acc ttc tgg gaa gcc tcc | 1056 |
| Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser |      |

# ES 2 429 338 T3

| 340                                                                                                                                                   | 345 | 350 |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|-----|------|
| gaa cgc act atc cgc tcc gaa gcc gaa gac tcc tac cac ttt tct tct<br>Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser<br>355 360 365     |     |     | 1104 |
| gcc aaa atg act gca act ttt ctg tct aag aaa caa gaa gtg aac atg<br>Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met<br>370 375 380     |     |     | 1152 |
| tcc gac tcc gcc ctg gac tgc gta cgc gat gag gct ata aat aag tta<br>Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu<br>385 390 400     |     |     | 1200 |
| cag cag att ttc aat act tca tac aat caa aca tat gaa aaa tac gga<br>Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly<br>405 410 415     |     |     | 1248 |
| aac gtg tcc gtc ttc gaa acc agc ggc ggt ctg gtg gtg ttc tgg caa<br>Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln<br>420 425 430     |     |     | 1296 |
| ggc atc aag caa aaa tct ttg gtg gaa ttg gaa cgc ttg gcc aat cga<br>Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg<br>435 440 445     |     |     | 1344 |
| tcc agt ctg aat atc act cat agg acc aga aga agt acc agt gac aat<br>Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Arg Thr Arg Arg Ser Thr Ser Asp Asn<br>450 455 460     |     |     | 1392 |
| aat aca act cat ttg tcc agc atg gaa tcc gtg cac aat ctg gtc tac<br>Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr<br>465 470 475 480 |     |     | 1440 |
| gcc cag ctg cag ttc acc tat gac acc ttg cgc ggt tac atc aac cgg<br>Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg<br>485 490 495     |     |     | 1488 |
| gcc ctg gcc caa atc gca gaa gcc tgg tgt gtg gat caa cgg cgc acc<br>Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr<br>500 505 510     |     |     | 1536 |
| cta gag gtc ttc aag gaa etc agc aag atc aac ccc tca gcc att ctc<br>Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu<br>515 520 525     |     |     | 1584 |
| tcc gcc att tac aac aaa ccc att gcc gcc cgc ttc atg ggt gat gtc<br>Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val<br>530 535 540     |     |     | 1632 |
| ttg ggc ctg gcc agc tgc gtg acc atc aac caa acc agc gtc aag gtg<br>Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val<br>545 550 555 560 |     |     | 1680 |
| ctg cgc gat atg aac gtg aag gaa tcc cca gga cgc tgc tac tca cga<br>Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg<br>565 570 575     |     |     | 1728 |
| ccc gtg gtc atc ttt aat ttc gcc aac agc tcc tac gtg cag tac ggt<br>Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly<br>580 585 590     |     |     | 1776 |

caa ctg ggc gag gac aac gaa atc ctg ttg ggc aac cac cgc act gag 1824  
Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu  
595 600 605

gaa tgt cag ctt ccc agc ctc aag atc ttc atc gcc ggg aac tcc gcc 1872  
Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala  
610 615 620

tac gag tac gtg gac tac ctc ttc aaa cgc atg att gac ctc agc agt 1920  
Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser  
625 630 635 640

atc tcc acc gtc gac agc atg atc gcc ctg gat atc gac ccc ctg gaa 1968  
Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu  
645 650 655

aat acc gac ttc agg gta ctg gaa ctt tac tcc cag aaa gag ctg cgc 2016  
Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg  
660 665 670

tcc agc aac gtt ttt gac ctc gaa gag atc atg cgc gaa ttc aac tcc 2064  
Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser  
675 680 685

tac aag cag cgg gta aag tac gtg gag gac aag gta gtc gac cca cta 2112  
Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu  
690 695 700

cct ccc tac ctc aag ggt ctg gac gac 2139  
Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp  
705 710

<210> 14

<211> 713

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de hCMV gB optimizada por códones

<400> 14

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

Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr  
20 25 30

Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln  
35 40 45

Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser  
50 55 60

His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp

# ES 2 429 338 T3

|                 |                     |                 |                 |     |  |    |
|-----------------|---------------------|-----------------|-----------------|-----|--|----|
| 65              |                     | 70              |                 | 75  |  | 80 |
| Val Val Gly Val | Asn Thr Thr Lys Tyr | Pro Tyr Arg Val | Cys Ser Met     |     |  |    |
|                 | 85                  | 90              | 95              |     |  |    |
| Ala Gln Gly Thr | Asp Leu Ile Arg     | Phe Glu Arg Asn | Ile Ile Cys Thr |     |  |    |
|                 | 100                 | 105             | 110             |     |  |    |
| Ser Met Lys Pro | Ile Asn Glu Asp     | Leu Asp Glu Gly | Ile Met Val Val |     |  |    |
|                 | 115                 | 120             | 125             |     |  |    |
| Tyr Lys Arg Asn | Ile Val Ala His     | Thr Phe Lys Val | Arg Val Tyr Gln |     |  |    |
|                 | 130                 | 135             | 140             |     |  |    |
| Lys Val Leu Thr | Phe Arg Arg Ser     | Tyr Ala Tyr Ile | Tyr Thr Thr Tyr |     |  |    |
|                 | 145                 | 150             | 155             | 160 |  |    |
| Leu Leu Gly Ser | Asn Thr Glu Tyr     | Val Ala Pro Pro | Met Trp Glu Ile |     |  |    |
|                 | 165                 | 170             | 175             |     |  |    |
| His His Ile Asn | Lys Phe Ala Gln     | Cys Tyr Ser Ser | Tyr Ser Arg Val |     |  |    |
|                 | 180                 | 185             | 190             |     |  |    |
| Ile Gly Gly Thr | Val Phe Val Ala     | Tyr His Arg Asp | Ser Tyr Glu Asn |     |  |    |
|                 | 195                 | 200             | 205             |     |  |    |
| Lys Thr Met Gln | Leu Ile Pro Asp     | Asp Tyr Ser Asn | Thr His Ser Thr |     |  |    |
|                 | 210                 | 215             | 220             |     |  |    |
| Arg Tyr Val Thr | Val Lys Asp Gln     | Trp His Ser Arg | Gly Ser Thr Trp |     |  |    |
|                 | 225                 | 230             | 235             | 240 |  |    |
| Leu Tyr Arg Glu | Thr Cys Asn Leu     | Asn Cys Met Leu | Thr Ile Thr Thr |     |  |    |
|                 | 245                 | 250             | 255             |     |  |    |
| Ala Arg Ser Lys | Tyr Pro Tyr His     | Phe Phe Ala Thr | Ser Thr Gly Asp |     |  |    |
|                 | 260                 | 265             | 270             |     |  |    |
| Val Val Tyr Ile | Ser Pro Phe Tyr     | Asn Gly Thr Asn | Arg Asn Ala Ser |     |  |    |
|                 | 275                 | 280             | 285             |     |  |    |
| Tyr Phe Gly Glu | Asn Ala Asp Lys     | Phe Phe Ile Phe | Pro Asn Tyr Thr |     |  |    |
|                 | 290                 | 295             | 300             |     |  |    |
| Ile Val Ser Asp | Phe Gly Arg Pro     | Asn Ala Ala Pro | Glu Thr His Arg |     |  |    |
|                 | 305                 | 310             | 315             | 320 |  |    |

# ES 2 429 338 T3

Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile  
 325 330 335  
 Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser  
 340 345 350  
 Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser  
 355 360 365  
 Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met  
 370 375 380  
 Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu  
 385 390 395 400  
 Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly  
 405 410 415  
 Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln  
 420 425 430  
 Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg  
 435 440 445  
 Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Arg Thr Arg Arg Ser Thr Ser Asp Asn  
 450 455 460  
 Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr  
 465 470 475 480  
 Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg  
 485 490 495  
 Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr  
 500 505 510  
 Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu  
 515 520 525  
 Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val  
 530 535 540  
 Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val  
 545 550 555 560

Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg  
565 570 575

Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly  
580 585 590

Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu  
595 600 605

Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala  
610 615 620

Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser  
625 630 635 640

Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu  
645 650 655

Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg  
660 665 670

Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser  
675 680 685

Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu  
690 695 700

Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp  
705 710

<210> 15  
<211> 2718  
5 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> secuencia de hCMV gB optimizada por códones

<400> 15

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggagagca ggaatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctgggc | 60  |
| gccgccgtga gcagcagcag caccagccac gccaccagca gcaccacaaa cggcagccac  | 120 |
| accagcagga ccaccagcgc ccagaccagg agcgtgtaca gccagcacgt gaccagcagc  | 180 |
| gaggccgtga gccacagggc caacgagacc atctacaaca ccaccctgaa gtacggcgac  | 240 |
| gtggtgggcy tgaacaccac caagtacccc tacagggtgt gcagcatggc ccagggcacc  | 300 |
| gacctgatca ggttcgagag gaacatcatc tgcaccagca tgaagcccat caacgaggac  | 360 |

ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag aggaacatcg tggccacac cttcaagggtg 420  
 aggggtgtacc agaagggtgct gaccttcagg agggagctacg cctacatcta caccacctac 480  
 ctgctgggca gcaacaccga gtacgtggcc cccccaatgt gggagatcca ccacatcaac 540  
 aagttcgccc agtctacag cagctacagc aggggtgatcg gcggcaccgt gttcgtggcc 600  
 taccacaggg acagctacga gaacaagacc atgcagctga tccccgacga ctacagcaac 660  
 acccacagca ccaggtagct gaccgtgaag gaccagtggc acagcagggg cagcacctgg 720  
 ctgtacaggg agacctgcaa cctgaactgc atgctgacca tcaccaccgc caggagcaag 780  
 taccctacc acttcttcgc caccagcacc ggcgacgtgg tgtacatcag ccccttctac 840  
 aacggcacca acaggaacgc cagctacttc ggcgagaacg ccgacaagtt cttcatcttc 900  
 cccaactaca ccactgtgag cgacttcggc agggccaacg ccgccccga gaccacaggg 960  
 ctggtggcct tcctggagag gcccgacagc gtgatcagct gggacatcca ggacgagaag 1020  
 aacgtgacct gccagctgac cttctgggag gccagcgaga ggaccatcag gagcgaggcc 1080  
 gaggacagct accacttcag cagcgccaag atgaccgcca ccttcctgag caagaagcag 1140  
 gagggtgaaca tgagcgacag cgccctggac tgcgtgaggg acgaggccat caacaagctg 1200  
 cagcagatct tcaacaccag ctacaaccag acctacgaga agtacggcaa cgtgagcgtg 1260  
 ttcgagacca gcggcgccct ggtggtgttc tggcagggca tcaagcagaa gagcctggtg 1320  
 gagctggaga ggctggccaa caggagcagc ctgaacatca cccacaggac caggaggagc 1380  
 accagcgaca acaacaccac ccacctgagc agcatggaga gcgtgcacaa cctggtgtac 1440  
 gccagctgc agttcaccta cgacaccctg aggggctaca tcaacagggc cctggcccag 1500  
 atcgccgagg cctggtgctg ggaccagagg aggaccctgg aggtgttcaa ggagctgagc 1560  
 aagatcaacc ccagcgccat cctgagcgcc atctacaaca agcccatcgc cgccagggtc 1620  
 atgggcgagc tgctgggcct ggcagctgc gtgacatca accagaccag cgtgaagggtg 1680  
 ctgagggaca tgaacgtgaa ggagagcccc ggcaggtgct acagcaggcc cgtggtgatc 1740  
 ttcaacttcg ccaacagcag ctacgtgcag tacggccagc tggcgaggga caacgagatc 1800  
 ctgctgggca accacaggac cgaggagtgc cagctgcccc gcctgaagat cttcatcgcc 1860  
 ggcaacagcg cctacagta cgtggactac ctgttcaaga ggatgatcga cctgagcagc 1920  
 atcagaccg tggacagcat gatcgccctg gacatcgacc ccctggagaa caccgacttc 1980  
 aggggtgctg agctgtacag ccagaaggag ctgaggagca gcaacgtgtt cgacctggag 2040  
 gagatcatga gggagttaa cagctacaag cagaggtga agtacgtgga ggacaagggtg 2100  
 gtggaccccc tgcccccta cctgaagggc ctggacgacc tgatgagcgg cctgggcgcc 2160  
 gccggcaagg ccgtgggcgt ggcacatcgc gccgtgggcg gcgccgtggc cagcgtgggtg 2220  
 gagggcggtg ccaccttctt gaagaacccc ttcggcgccct tcaccatcat cctggtggcc 2280  
 atcgccgtgg tgatcatcac ctacctgac tacaccaggc agaggaggct gtgcacccag 2340  
 cccctgcaga acctgttccc ctacctggtg agcgccgagc gcaccaccgt gaccagcggc 2400  
 agcaccaagg acaccagcct gcaggccccc ccagctacg aggagagcgt gtacaacagc 2460  
 ggcagggaagg gcccggcccc cccagcagc gacgccagca ccgccgcccc cccctacacc 2520  
 aacgagcagg cctaccagat gctgctggcc ctggccaggc tggacgccga gcagagggcc 2580  
 cagcagaacg gcaccgacag cctggacggc cagaccggca cccaggacaa gggccagaag 2640  
 cccaacctgc tggacaggct gaggcacagg aagaacggct acaggcacct gaaggacagc 2700  
 gacgaggagg agaacgtg 2718

5 <210> 16  
 <211> 2718  
 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de hCMV gB optimizada por códon

5

<400> 16

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| atggaatcca ggatctggtg tctcgtcgtc tgtgtcaacc tttgtatcgt ttgcttggga  | 60  |
| gctgccgtta gtagcagctc cacaagtcac gccaccagca gtaccataa cggtagccac   | 120 |
| acctcacgga caacgagcgc tcagactcgt tccgtgtact cgcagcacgt tacctcctca  | 180 |
| gaggcagtgt cccatcgctc taacgaaact atctacaaca ccacactcaa gtatggcgac  | 240 |
| gtagtgggtg taaatacgac aaaataccca tatagagtgt gctcaatggc ccagggcacc  | 300 |
| gatctgatcc ggttcgagag aaatataatc tgcacctcta tgaacctat caatgaggat   | 360 |
| ctggacgagg ggatcatggt ggtgtataag agaaatattg tcgcccatac ctttaaagt   | 420 |
| cgcgtttatc aaaaggtgtt aactttcaga aggtcctacg cttatatcta caccacgtac  | 480 |
| ctgctcggct ccaatacaga gtacgtcgtc cctcccatgt gggaaattca ccatatcaac  | 540 |
| aagttcgccc agtgctactc ctcttactca cgcgtgatcg gagggaccgt gtctgtggca  | 600 |
| tatcaccgag attcttacga aaacaagaca atgcagctga tccctgatga ctactcta    | 660 |
| acacactcaa cccgttatgt gaccgtaaaag gatcaatggc actcccgcgg gtctacctgg | 720 |
| ctctacaggg aaacgtgcaa cctgaattgt atgctgacaa taacgactgc taggtcaaag  | 780 |
| tacccctacc acttttttgc aacctctacc ggcgacgtgg tttatattag tcctttctac  | 840 |
| aacggaacca accgtaatgc gagttatttc ggtgaaaacg cagacaagtt tttcattttc  | 900 |
| cccaactata ctatcgtgag tgacttcgga agacctaatg cagccccaga gactcatcgc  | 960 |

```

ctggtggcct tcctcgaaag agccgatagc gtgatctcct gggatattca ggacgagaag 1020
aacgtgactt gccaaactcac cttttgggag gcgtctgagc gcactatacg aagcgaagcc 1080
gaagactcctt atcatttcag cagtgc aaag atgacagcca ctttcttgtc caaaaaacag 1140
gagggttaaca tgtctgactc agcgctagac tgtgtgcggg acgagggcat caacaaactg 1200
caacaaatat tcaacacgag ctacaaccag acctacgaga agtatggcaa tgtgtcagta 1260
tttgagacta gcggcggact ggtagtattt tggcagggga ttaacagaa gtctctcgtc 1320
gaactcgagc ggctggccaa tcgcagtagt ctgaacatca cacacaggac acgaaggtct 1380
acttccgata ataataccac ccacctctcc tctatggagt cgggtgcaca cctgggtgtac 1440
gctcagttgc agtttataca cgacaccctg cgcggggtata ttaacagagc gctggcacag 1500
atcgccgaag catggtgcgt cgaccaacgt cgaacgctgg aggtcttcaa ggagctatcc 1560
aagattaacc caagtgccat tctatctgca attacaata agccgattgc cgctaggttt 1620
atgggcgagtg ttctgggact ggcgagctgt gtgactataa accaaacgtc agtcaaggtg 1680
cttagggaca tgaacgttaa ggaatcccc ggccgggtgt attcgcggcc tgttgtcata 1740
tttaattttg ccaattcctc ttacgtgagc tacggccagt taggcgagga caacgaaatt 1800
ttattgggca atcatcgac cgaggaatgc cagttgccga gcctgaaaat ctttatagct 1860
gggaacagcg cttacagta cgtcgactat ctctttaagc ggatgattga tctgagctcg 1920
atcagcacag tcgactctat gatcgccctg gatattgacc cgctggagaa tacagatttc 1980
agagtgcctt aattatattc acagaaagag ctgcggagct caaatgtgtt cgatcttgag 2040
gaaattatgc gggaattcaa cagctacaag caacgggtca agtacgtgga ggacaaggtg 2100
gtggacccac tgcccccta cttgaaaggt ctggatgac tcattgagcg tcttgagcg 2160
gctggcaaaag ccgttgagtg agcaatcggc gccgttgag gggccgtggc ttctgtagtg 2220
gagggcggtg ctaccttttt gaagaacccc ttcggggcct ttactatcat tctagtcgct 2280
attgcagtcg tgataatcac atatttgatc tatactcggc agagacgctt atgcacacag 2340
ccccctcaga atctcttccc ctatctggtc tccgcagatg ggacaacagt gacaagtggc 2400
tcgactaagg ataccagctt gcaagctccc ccaagttacg aagagagcgt ttataactcc 2460
ggtaggaaag gaccaggctc acctagctca gatgcatcaa ccgctgcccc accctatact 2520
aatgagcagg cctatcagat gctgcttgca ctgccagac tggacgccga gcagcgagcc 2580
cagcagaatg ggacagactc cctcgacggg cagactggaa cccaggataa aggacagaaa 2640
cctaactctg ttgaccgact aagacacagg aaaaatggct acaggcacct taaagatagt 2700
gatgaagaag agaacgtc 2718

```

<210> 17

<211> 2718

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de hCMV gB optimizada por códones

10

<400> 17

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atggagagcc ggatttggtg tctggctgtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt ctgtttgggc  | 60   |
| gctgccgttt catcctccag tacttcccat gctacatcct cgacacacaa tggctcacat  | 120  |
| accagcagaa ctacttctgc acaaactcgc tccgtgtact cacagcacgt cacttctagc  | 180  |
| gaagcagtgt cccacagggc aaacgaacg atctacaaca ccacctgaa gtatggtgac    | 240  |
| gtggtggggg tgaacaccac taaatatcct tatagagttt gtagtatggc acaagggaca  | 300  |
| gatctgatca ggttcgagcg aaacattatt tgcacctcca tgaagcctat aaacgaagat  | 360  |
| ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag cgtaatatag tcgcccatac ctttaaggta  | 420  |
| aggggtgacc agaaggtcct cacatttcgc agaagctatg cctatattta cactacctat  | 480  |
| ctactgggct ccaacactga atacgttgca cccccatgt gggaattca ccacatcaat    | 540  |
| aaattcgccc agtgttattc cagctattct aggggttagg gaggcaccgt gtttggggc   | 600  |
| taccaccggg atagctacga gaataagact atgcagctca tccctgacga ctacagcaat  | 660  |
| acacattcca caagatacgt caccgtcaag gatcagtgcc attctagggg atctacatgg  | 720  |
| ctttatcgcg agacatgcaa cttgaactgt atgcttacca tcaccacagc gcgttctaaa  | 780  |
| taccatatac atttttttgc gactagtacg ggagacgtgg tgtatatctc accgttttat  | 840  |
| aacggtacta accgtaatgc tagctatttt ggcgagaatg cagataaatt ttttatcttc  | 900  |
| cccaactaca caatcgtaag tgacttcgga aggcccaatg ccgccccga aacgcacagg   | 960  |
| ctggtggcct tcctcgagcg agccgatagc gtaatttcat gggatataca ggatgagaaa  | 1020 |
| aatgtgacct gccagcttac cttctgggaa gcttcagaga ggactatccg gagtgaagcc  | 1080 |
| gaggattcct atcacttttc cagtgtctaag atgacggcaa cctttctctc aaagaagcag | 1140 |
| gagggtgaaca tgagcgactc ggctcttgat tgcgtgcggg acgaagcaat caacaaactg | 1200 |
| cagcaaatct tcaacaccag ctacaaccag acatacgaaa aatatggaaa tgtgagcgtc  | 1260 |
| ttcgagacta gcgggtgggt ggtggtgttc tggcagggaa ttaagcagaa gtccttggtg  | 1320 |
| gaactggagc ggctggctaa ccggtcgtct ctaaatatca ccacagaac acgacgctct   | 1380 |
| acgtctgata ataacaccac acacctcagc agcatggaat ctgttcacaa cctcgtctac  | 1440 |
| gccccactac agttcaccta tgacactttg aggggggata tcaatagagc tttagcccaa  | 1500 |
| attgccgaag cctggtgtgt ggatcaacgg agaacactgg aggtttttaa ggagctctca  | 1560 |

```

aagattaacc cttcagcgat actgagcgcc atttacaata agccaatcgc agctagattc 1620
atgggtgacg tattgggctt agcaagttgt gttaccataa atcagacctc cgtgaaggtc 1680
ttacgcgaca tgaatgttaa ggagagccct gggcggtgct actcacggcc agttgtaatc 1740
ttcaatttcg caaactcctc atatgtccag tatggccaac taggagagga caacgagatt 1800
ctgctcggca accataggac agaggagtgc caactaccct ccctgaaaat tttcatcgct 1860
gggaattcgc cctatgagta cgtcgattac ctcttcaaac ggatgattga tctgagttct 1920
attagtaccg tggactccat gatcgctctt gacatagatc cactcgagaa taccgacttc 1980
cgggtccttg aactgtatag ccagaaagag cttecgctctt ctaacgtctt tgacttggaa 2040
gaaattatgc gagaatttaa ttcatataag cagcgtgtta aatacgttga agataagggt 2100
gtggacccgt tacctcctta cctcaaaggc cttgacgac tcattgagcgg gctcggcgca 2160
gccgggaaag cggtaggagt ggccatcggg gccggttgag gcgccgtagc cagtgtcgtg 2220
gaaggagtag caacgttctt gaaaaacccc ttcggtgctt ttacaattat cctcgtggcg 2280
atcgccgtgg tgatcattac ctacctgata tacactcgcc agcgacgcct gtgcacacaa 2340
ccattgcaga acttgtttcc ctacctgggc tcggcggacg ggactaccgt gacatctggg 2400
agtaccaaag atacgagctt acagggtccc ccatcttacg aggagtcagt gtacaattcc 2460
ggtagaaagg gtcctggccc tccgagtagt gacgctagca ccgctgcgcc ccatacaca 2520
aacgagcagg cctaccagat gctgctggcc ctggccagac tggatgctga gcagagagca 2580
cagcagaatg gaactgactc cctggatggg cagacaggca cgcaagataa gggccagaaa 2640
ccaaacttgc tggaccgcct tcgacaccgc aaaaatggct acaggcatct gaaggactct 2700
gacgaagaag agaatgtc 2718

```

<210> 18

<211> 2718

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> secuencia de hCMV gB optimizada por códones

<400> 18

```

atggagagta ggatttggtg tctggtggtt tgcgtcaacc ttgcatcgt gtgcctgggg 60
gcagctgttt cgtcgtctag cactagccat gccacctcta gtactcaca cgggtcacac 120
acatctcgga ccacatccgc acagaccagg agcgtataca gccagcatgt tacaagttcg 180
gaggcagtga gtcacgagc aaatgagacc atctataata ccacactcaa gtatggcgac 240
gtcgtgggag tgaatacaac caagtatcct taccgggtgt gcagcatggc acagggtacc 300

```

gatctcattc gcttcgagcg gaacattatc tgtacgagca tgaagcctat taacgaggac 360  
ctcgtatgaag gtatcatggt tgtttataaa cgcaatattg ttgccacac gtttaaagtg 420  
agagtttacc agaaggtgct gacattcagg aggtcgtacg cttacattta tactacatat 480  
ctattagggc ccaacacaga gtacgtggcc ccgcccattg gggaaatcca ccatatcaat 540  
aagttcgctc agtgttattc ttcgtattcc aggggtgatcg gcgggaccgt atttgtggct 600  
taccacagag actcctacga gaacaaaaca atgcaactga ttcccgatga ctactctaact 660  
actcacagca ctcgctacgt gactgtcaag gatcagtggt actctagggg ctcaacctgg 720  
ctgtacaggg aaacatgtaa tctgaattgc atgctgacca ttactactgc acgcagcaag 780  
tatccctatc actttttcgc cacctccaca ggggatgtcg tttatatcag cccattttac 840  
aacggcacca atagaacgc ttcctacttt ggagaaaatg ctgataaatt cttcatattc 900  
ccgaattaca ctatcgtgag tgatttcggc cgaccaaacg cggcgcccga aaccacacaga 960  
ctggttgccct tccttgaacg ggctgacagc gttatcagtt gggatatcca ggatgagaag 1020  
aacgtgacct gccagctgac tttttgggaa gcatcagaga ggaccattag gtccgaagcc 1080  
gaggactcct accatttcag cagtgcctaa atgaccgcca ctttcctgtc aaaaaagcag 1140  
gaggtgaaca tgtcagactc tgcactggat tgtgtccggg acgaagcaat caacaagctg 1200  
cagcagatat tcaataacct ctacaaccaa acctacgaaa aatacggcaa tgtgtcagtg 1260  
tttgagacgt ctggcgactc ggtggtattt tggcagggaa taaaacagaa atccctcgtc 1320  
gagttggagc gcttagccaa cagaagtagc ctgaacatca ctcacaggac acgccggtca 1380  
acgagtata ataataccac ccacctgagc agcatggagt ccgtccataa cctagtgtac 1440  
gcccactcc aattcactta tgacacactt cgagggtaca ttaaccgagc actcgcccag 1500  
attgcagagg cctggtgtgt tgatcagcgg agaaccttg aagtgtttaa ggaactctct 1560  
aagataaacc cttccgctat cttatccgcc atttataata aacctatcg agcacgcttc 1620  
atgggtgacg tactggggct tgcctcttgt gtgacgatca accagacatc tgtgaaagtc 1680  
ctgcgggata tgaatgtcaa ggagtcacca ggacgttgct acagccgccc agtcgtgatt 1740  
tttaacttcg ctaattccag ctatgtgcaa tatgggcagt tgggagagga caatgagatc 1800  
ctccttggtc atcatcgac tgaagaatgc cagttgcctt ctctgaagat ctttatcgcc 1860  
ggcaacagcg cgtatgagta cgtagattac ctctttaagc gtatgataga cctttcctca 1920  
atctccacag ttgatagtat gattgccctg gacatcgacc ccctggagaa cactgatttc 1980  
agagtcctcg agttgtattc tcagaaggaa ttaagatcct ctaacgtatt tgacctcgag 2040  
gagattatgc gcgaatttaa tagctacaag caacgagtca aatatgtgga agataaggtc 2100  
gtggacccac taccgcccta tctaaggggc ctggacgacc tgatgagtg gttaggagcg 2160  
gccgaaaaag ccgtgggagt ggcgattggt gctgtgggag gggctgtagc cagtgtggtc 2220  
gagggagtcg ctacctttct caagaatccc ttcggcgctt ttacaatcat tctggtggcc 2280  
atagctgttg tcataatcac gtacttgata tacacccggc agagacggct gtgcactcag 2340  
cctctgcaa atcttttccc ttatctagtc tctgccgacg ggacaaccgt aacaagcggc 2400  
agcacaaaag atacttcact ccaggccccc ccacccctacg aagaatcagt gtataactcc 2460  
ggccgaaaag gaccggcccc tccaagctca gacgcatcaa ccgcccgc cccttacacc 2520  
aacgagcagg cttaccagat gttgttggtc ctgcccgtc tggatgcgga acagcgtgcc 2580  
caacaaaacg gaacggacag tcttgatggc cagacgggta cacaagacaa gggccagaag 2640  
ccaaaccttc tggacaggtt gcggcacaga aaaaacggtt atagacatct gaaagactct 2700  
gatgaggagg aaaatgtg 2718

<212> DNA  
<213> Citomegalovirus humano

<220>

5 <221> CDS

<222> (1) .. (1473)

<400> 19

|                                                                 |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|
| atg gag tcc tct gcc aag aga aag atg gac cct gat aat cct gac gag | 48  |
| Met Glu Ser Ser Ala Lys Arg Lys Met Asp Pro Asp Asn Pro Asp Glu |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |
| ggc cct tcc tcc aag gtg cca cgg ccc gag aca ccc gtg acc aag gcc | 96  |
| Gly Pro Ser Ser Lys Val Pro Arg Pro Glu Thr Pro Val Thr Lys Ala |     |
| 20 25 30                                                        |     |
| acg acg ttc ctg cag act atg ttg agg aag gag gtt aac agt cag ctg | 144 |
| Thr Thr Phe Leu Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu |     |
| 35 40 45                                                        |     |
| agt ctg gga gac ccg ctg ttt cca gag ttg gcc gaa gaa tcc ctc aaa | 192 |
| Ser Leu Gly Asp Pro Leu Phe Pro Glu Leu Ala Glu Glu Ser Leu Lys |     |
| 50 55 60                                                        |     |
| act ttt gaa caa gtg acc gag gat tgc aac gag aac ccc gag aaa gat | 240 |
| Thr Phe Glu Gln Val Thr Glu Asp Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |
| gtc ctg gca gaa ctc gtc aaa cag att aag gtt cga gtg gac atg gtg | 288 |
| Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val |     |
| 85 90 95                                                        |     |
| cgg cat aga atc aag gag cac atg ctg aaa aaa tat acc cag acg gaa | 336 |
| Arg His Arg Ile Lys Glu His Met Leu Lys Lys Tyr Thr Gln Thr Glu |     |
| 100 105 110                                                     |     |

10

# ES 2 429 338 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gag aaa ttc act ggc gcc ttt aat atg atg gga gga tgt ttg cag aat<br>Glu Lys Phe Thr Gly Ala Phe Asn Met Met Gly Gly Cys Leu Gln Asn<br>115 120 125     | 384  |
| gcc tta gat atc tta gat aag gtt cat gag cct ttc gag gag atg aag<br>Ala Leu Asp Ile Leu Asp Lys Val His Glu Pro Phe Glu Glu Met Lys<br>130 135 140     | 432  |
| tgt att ggg cta act atg cag agc atg tat gag aac tac att gta cct<br>Cys Ile Gly Leu Thr Met Gln Ser Met Tyr Glu Asn Tyr Ile Val Pro<br>145 150 155 160 | 480  |
| gag gat aag cgg gag atg tgg atg gct tgt att aag gag ctg cat gat<br>Glu Asp Lys Arg Glu Met Trp Met Ala Cys Ile Lys Glu Leu His Asp<br>165 170 175     | 528  |
| gtg agc aag ggc gcc gct aac aag ttg ggg ggt gca ctg cag gct aag<br>Val Ser Lys Gly Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys<br>180 185 190     | 576  |
| gcc cgt gct aaa aag gat gaa ctt agg aga aag atg atg tat atg tgc<br>Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys<br>195 200 205     | 624  |
| tac agg aat ata gag ttc ttt acc aag aac tca gcc ttc cct aag acc<br>Tyr Arg Asn Ile Glu Phe Phe Thr Lys Asn Ser Ala Phe Pro Lys Thr<br>210 215 220     | 672  |
| acc aat ggc tgc agt cag gcc atg gcg gca ctg cag aac ttg cct cag<br>Thr Asn Gly Cys Ser Gln Ala Met Ala Ala Leu Gln Asn Leu Pro Gln<br>225 230 235 240 | 720  |
| tgc tcc cct gat gag att atg gct tat gcc cag aaa ata ttt aag att<br>Cys Ser Pro Asp Glu Ile Met Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile<br>245 250 255     | 768  |
| ttg gat gag gag aga gac aag gtg ctc acg cac att gat cac ata ttt<br>Leu Asp Glu Glu Arg Asp Lys Val Leu Thr His Ile Asp His Ile Phe<br>260 265 270     | 816  |
| atg gat atc ctc act aca tgt gtg gaa aca atg tgt aat gag tac aag<br>Met Asp Ile Leu Thr Thr Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr Lys<br>275 280 285     | 864  |
| gtc act agt gac gct tgt atg atg acc atg tac ggg ggc atc tct ctc<br>Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu<br>290 295 300     | 912  |
| tta agt gag ttc tgt cgg gtg ctg tgc tgc tat gtc tta gag gag act<br>Leu Ser Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr<br>305 310 315 320 | 960  |
| agt gtg atg ctg gcc aag cgg cct ctg ata acc aag cct gag gtt atc<br>Ser Val Met Leu Ala Lys Arg Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile<br>325 330 335     | 1008 |
| agt gta atg aag cgc cgc att gag gag atc tgc atg aag gtc ttt gcc<br>Ser Val Met Lys Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala<br>340 345 350     | 1056 |
| cag tac att ctg ggg gcc gat cct ctg aga gtc tgc tct cct agt gtg                                                                                       | 1104 |

# ES 2 429 338 T3

Gln Tyr Ile Leu Gly Ala Asp Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val  
 355 360 365

gat gac cta cgg gcc atc gcc gag gag tca gat gag gaa gag gct att 1152  
 Asp Asp Leu Arg Ala Ile Ala Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile  
 370 375 380

gta gcc tac act ttg gcc acc gct ggt gtc agc tcc tct gat tct ctg 1200  
 Val Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu  
 385 390 395 400

gtg tca ccc cca gag tcc cct gta ccc gcg act atc cct ctg tcc tca 1248  
 Val Ser Pro Pro Glu Ser Pro Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser  
 405 410 415

gta att gtg gct gag aac agt gat cag gaa gaa agt gag cag agt gat 1296  
 Val Ile Val Ala Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp  
 420 425 430

gag gaa gag gag gag ggt gct cag gag gag cgg gag gac act gtg tct 1344  
 Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gln Glu Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser  
 435 440 445

gtc aag tct gag cca gtg tct gag ata gag gaa gtt gcc cca gag gaa 1392  
 Val Lys Ser Glu Pro Val Ser Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu  
 450 455 460

gag gag gat ggt gct gag gaa ccc acc gcc tct gga ggc aag agc acc 1440  
 Glu Glu Asp Gly Ala Glu Glu Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr  
 465 470 475 480

cac cct atg gtg act aga agc aag gct gac cag 1473  
 His Pro Met Val Thr Arg Ser Lys Ala Asp Gln  
 485 490

<210> 20

<211> 491

5 <212> PRT

<213> Citomegalovirus humano

<400> 20

Met Glu Ser Ser Ala Lys Arg Lys Met Asp Pro Asp Asn Pro Asp Glu  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Ser Lys Val Pro Arg Pro Glu Thr Pro Val Thr Lys Ala  
 20 25 30

Thr Thr Phe Leu Gln Thr Met Leu Arg Lys Glu Val Asn Ser Gln Leu  
 35 40 45

Ser Leu Gly Asp Pro Leu Phe Pro Glu Leu Ala Glu Glu Ser Leu Lys  
 50 55 60

Thr Phe Glu Gln Val Thr Glu Asp Cys Asn Glu Asn Pro Glu Lys Asp  
 65 70 75 80

10

# ES 2 429 338 T3

Val Leu Ala Glu Leu Val Lys Gln Ile Lys Val Arg Val Asp Met Val  
 85 90 95  
 Arg His Arg Ile Lys Glu His Met Leu Lys Lys Tyr Thr Gln Thr Glu  
 100 105 110  
 Glu Lys Phe Thr Gly Ala Phe Asn Met Met Gly Gly Cys Leu Gln Asn  
 115 120 125  
 Ala Leu Asp Ile Leu Asp Lys Val His Glu Pro Phe Glu Glu Met Lys  
 130 135 140  
 Cys Ile Gly Leu Thr Met Gln Ser Met Tyr Glu Asn Tyr Ile Val Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Asp Lys Arg Glu Met Trp Met Ala Cys Ile Lys Glu Leu His Asp  
 165 170 175  
 Val Ser Lys Gly Ala Ala Asn Lys Leu Gly Gly Ala Leu Gln Ala Lys  
 180 185 190  
 Ala Arg Ala Lys Lys Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys  
 195 200 205  
 Tyr Arg Asn Ile Glu Phe Phe Thr Lys Asn Ser Ala Phe Pro Lys Thr  
 210 215 220  
 Thr Asn Gly Cys Ser Gln Ala Met Ala Ala Leu Gln Asn Leu Pro Gln  
 225 230 235 240  
 Cys Ser Pro Asp Glu Ile Met Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile  
 245 250 255  
 Leu Asp Glu Glu Arg Asp Lys Val Leu Thr His Ile Asp His Ile Phe  
 260 265 270  
 Met Asp Ile Leu Thr Thr Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr Lys  
 275 280 285  
 Val Thr Ser Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu  
 290 295 300  
 Leu Ser Glu Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr  
 305 310 315 320

# ES 2 429 338 T3

Ser Val Met Leu Ala Lys Arg Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile  
325 330 335

Ser Val Met Lys Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala  
340 345 350

Gln Tyr Ile Leu Gly Ala Asp Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val  
355 360 365

Asp Asp Leu Arg Ala Ile Ala Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile  
370 375 380

Val Ala Tyr Thr Leu Ala Thr Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu  
385 390 395 400

Val Ser Pro Pro Glu Ser Pro Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser  
405 410 415

Val Ile Val Ala Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp  
420 425 430

Glu Glu Glu Glu Glu Gly Ala Gln Glu Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser  
435 440 445

Val Lys Ser Glu Pro Val Ser Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu  
450 455 460

Glu Glu Asp Gly Ala Glu Glu Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr  
465 470 475 480

His Pro Met Val Thr Arg Ser Lys Ala Asp Gln  
485 490

<210> 21  
<211> 20  
5 <212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
10 <223> cebador oligonucleotídico T7

<400> 21

taatacgact cactataggg 20

15 <210> 22  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

20 <220>  
<223> cebador oligonucleotídico 65-delta-rev

<400> 22  
25 aggatgctga gccggcgg 18

<210> 23  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> cebador oligonucleotídico M13rev  
 5 <400> 23  
 cccagtcacg acgttgtaaa acg 23  
 <210> 24  
 <211> 18  
 10 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> cebador oligonucleotídico 65-delta-for  
 15 <400> 24  
 ccgccggctc agcatcct 18  
 <210> 25  
 <211> 22  
 20 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> cebador oligonucleotídico VR1051FOR  
 25 <400> 25  
 gagcagtact cgttgctgcc gc 22  
 30 <210> 26  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <223> cebador oligonucleotídico hCMVpp65-R  
 <400> 26  
 gttacgtcta gatcaacctc ggtgctttt gg 32  
 40 <210> 27  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 45 <220>  
 <223> cebador oligonucleotídico hCMVgB-R  
 <400> 27  
 50 tctagatcag tcgtccagac ccttgagg 28  
 <210> 28  
 <211> 1236  
 55 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> secuencia de IE1 optimizada por códones  
 60 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (16)..(1227)  
 65 <400> 28

# ES 2 429 338 T3

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| gatatcgccg ccacc atg gag tct agc gcc aag agg aag atg gac ccc gac | 51  |
| Met Glu Ser Ser Ala Lys Arg Lys Met Asp Pro Asp                  |     |
| 1 5 10                                                           |     |
| aac cct gat gag ggc cct agc agc aag gtg ccc cgg gtg aag cag atc  | 99  |
| Asn Pro Asp Glu Gly Pro Ser Ser Lys Val Pro Arg Val Lys Gln Ile  |     |
| 15 20 25                                                         |     |
| aag gtg cgg gtg gac atg gtg cgg cac agg atc aag gaa cac atg ctg  | 147 |
| Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg Ile Lys Glu His Met Leu  |     |
| 30 35 40                                                         |     |
| aag aag tac acc cag acc gag gag aag ttc acc ggc gcc ttc aat atg  | 195 |
| Lys Lys Tyr Thr Gln Thr Glu Glu Lys Phe Thr Gly Ala Phe Asn Met  |     |
| 45 50 55 60                                                      |     |
| atg ggc ggc tgc ctg cag aat gcc ctg gac atc ctg gac aag gtg cac  | 243 |
| Met Gly Gly Cys Leu Gln Asn Ala Leu Asp Ile Leu Asp Lys Val His  |     |
| 65 70 75                                                         |     |
| gag ccc ttc gag gag atg aag tgc atc ggc ctg acc atg cag agc atg  | 291 |
| Glu Pro Phe Glu Glu Met Lys Cys Ile Gly Leu Thr Met Gln Ser Met  |     |
| 80 85 90                                                         |     |
| tac gag aac tac atc gtg ccc gag gac aag agg gag atg tgg atg gcc  | 339 |
| Tyr Glu Asn Tyr Ile Val Pro Glu Asp Lys Arg Glu Met Trp Met Ala  |     |
| 95 100 105                                                       |     |
| tgc atc gac gag ctg cgg cgg aag atg atg tac atg tgc tac cgg aac  | 387 |
| Cys Ile Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn  |     |
| 110 115 120                                                      |     |
| atc gag ttc ttc acc aag aac agc gcc ttc ccc aag acc acc aac gga  | 435 |
| Ile Glu Phe Phe Thr Lys Asn Ser Ala Phe Pro Lys Thr Thr Asn Gly  |     |
| 125 130 135 140                                                  |     |
| tgc tct cag gcc atg gcc gcc ctg cag aat ctg cct cag tgc agc ccc  | 483 |
| Cys Ser Gln Ala Met Ala Ala Leu Gln Asn Leu Pro Gln Cys Ser Pro  |     |
| 145 150 155                                                      |     |

# ES 2 429 338 T3

gat gag atc atg gcc tac gcc cag aag atc ttc aag atc ctg gac gag 531  
 Asp Glu Ile Met Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Asp Glu  
 160 165 170

gag agg gat aag gtg ctg acc cac atc gac cac atc ttc atg gac atc 579  
 Glu Arg Asp Lys Val Leu Thr His Ile Asp His Ile Phe Met Asp Ile  
 175 180 185

ctg acc acc tgc gtg gag acc atg tgc aac gag tac aag gtg acc agc 627  
 Leu Thr Thr Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr Lys Val Thr Ser  
 190 195 200

gac gcc tgc atg atg aca atg tac ggc ggc atc agc ctg ctg agc gag 675  
 Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu Leu Ser Glu  
 205 210 215 220

ttc tgc aga gtg ctg tgc tgc tac gtg ctg gag gag acc tct gtg atg 723  
 Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Thr Ser Val Met  
 225 230 235

ctg gcc aag agg ccc ctg atc acc aag cct gag gtg atc agc gtg atg 771  
 Leu Ala Lys Arg Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile Ser Val Met  
 240 245 250

aag cgg cgg atc gag gag atc tgc atg aag gtg ttc gcc cag tac atc 819  
 Lys Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala Gln Tyr Ile  
 255 260 265

ctg gga gcc gac cct ctg aga gtg tgt agc ccc agc gtg gat gac ctg 867  
 Leu Gly Ala Asp Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val Asp Asp Leu  
 270 275 280

aga gcc atc gcc gag gaa tct gat gaa gag gag gcc atc gtg gcc tat 915  
 Arg Ala Ile Ala Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr  
 285 290 295 300

aca ctg gcc aca gcc ggc gtg tct agc agc gat agc ctg gtg agc cct 963  
 Thr Leu Ala Thr Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu Val Ser Pro  
 305 310 315

cct gag tct cct gtg cct gcc aca atc cct ctg agc agc gtg atc gtg 1011  
 Pro Glu Ser Pro Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser Val Ile Val  
 320 325 330

gcc gag aac agc gat cag gag gag agc gag cag tct gat gag gaa gag 1059  
 Ala Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu  
 335 340 345

gaa gag gga gcc cag gag gag aga gag gat acc gtg agc gtg aag agc 1107  
 Glu Glu Gly Ala Gln Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser Val Lys Ser  
 350 355 360

gag cct gtg agc gag atc gaa gag gtg gcc cct gag gaa gaa gag gat 1155  
 Glu Pro Val Ser Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu Glu Glu Asp  
 365 370 375 380

ggc gcc gag gag cct aca gcc agc ggc ggc aag tca aca cac ccc atg 1203  
 Gly Ala Glu Glu Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr His Pro Met  
 385 390 395

gtg acc aga agc aag gcc gac cag taaggatcc 1236

Val Thr Arg Ser Lys Ala Asp Gln  
 400

5 <210> 29  
 <211> 404  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de IE1 optimizada por códones  
 <400> 29

# ES 2 429 338 T3

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

# ES 2 429 338 T3

Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr Lys Val Thr Ser Asp Ala Cys Met  
195 200 205

Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu Leu Ser Glu Phe Cys Arg Val  
210 215 220

Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met Leu Ala Lys Arg  
225 230 235 240

Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile Ser Val Met Lys Arg Arg Ile  
245 250 255

Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala Gln Tyr Ile Leu Gly Ala Asp  
260 265 270

Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val Asp Asp Leu Arg Ala Ile Ala  
275 280 285

Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Thr Leu Ala Thr  
290 295 300

Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu Val Ser Pro Pro Glu Ser Pro  
305 310 315 320

Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser Val Ile Val Ala Glu Asn Ser  
325 330 335

Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu Glu Gly Ala  
340 345 350

Gln Glu Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser Val Lys Ser Glu Pro Val Ser  
355 360 365

Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ala Glu Glu  
370 375 380

Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr His Pro Met Val Thr Arg Ser  
385 390 395 400

Lys Ala Asp Gln

<210> 30

<211> 1236

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de IE1 optimizada por códones

<220>

<221> CDS

<222> (16) .. (1227)

15 <400> 30

# ES 2 429 338 T3

|                                                                  |     |
|------------------------------------------------------------------|-----|
| gaattcgccg ccacc atg gag tcc tct gcc aag aga aag atg gac cct gat | 51  |
| Met Glu Ser Ser Ala Lys Arg Lys Met Asp Pro Asp                  |     |
| 1 5 10                                                           |     |
| aat cct gac gag ggc cct tcc tcc aag gtg cca cgg gtc aaa cag att  | 99  |
| Asn Pro Asp Glu Gly Pro Ser Ser Lys Val Pro Arg Val Lys Gln Ile  |     |
| 15 20 25                                                         |     |
| aag gtt cga gtg gac atg gtg cgg cat aga atc aag gag cac atg ctg  | 147 |
| Lys Val Arg Val Asp Met Val Arg His Arg Ile Lys Glu His Met Leu  |     |
| 30 35 40                                                         |     |
| aaa aaa tat acc cag acg gaa gag aaa ttc act ggc gcc ttt aat atg  | 195 |
| Lys Lys Tyr Thr Gln Thr Glu Glu Lys Phe Thr Gly Ala Phe Asn Met  |     |
| 45 50 55 60                                                      |     |
| atg gga gga tgt ttg cag aat gcc tta gat atc tta gat aag gtt cat  | 243 |
| Met Gly Gly Cys Leu Gln Asn Ala Leu Asp Ile Leu Asp Lys Val His  |     |
| 65 70 75                                                         |     |
| gag cct ttc gag gag atg aag tgt att ggg cta act atg cag agc atg  | 291 |
| Glu Pro Phe Glu Glu Met Lys Cys Ile Gly Leu Thr Met Gln Ser Met  |     |
| 80 85 90                                                         |     |
| tat gag aac tac att gta cct gag gat aag cgg gag atg tgg atg gct  | 339 |
| Tyr Glu Asn Tyr Ile Val Pro Glu Asp Lys Arg Glu Met Trp Met Ala  |     |
| 95 100 105                                                       |     |
| tgt att gat gaa ctt agg aga aag atg atg tat atg tgc tac agg aat  | 387 |
| Cys Ile Asp Glu Leu Arg Arg Lys Met Met Tyr Met Cys Tyr Arg Asn  |     |
| 110 115 120                                                      |     |
| ata gag ttc ttt acc aag aac tca gcc ttc cct aag acc acc aat ggc  | 435 |
| Ile Glu Phe Phe Thr Lys Asn Ser Ala Phe Pro Lys Thr Thr Asn Gly  |     |
| 125 130 135 140                                                  |     |
| tgc agt cag gcc atg gcg gca ctg cag aac ttg cct cag tgc tcc cct  | 483 |
| Cys Ser Gln Ala Met Ala Ala Leu Gln Asn Leu Pro Gln Cys Ser Pro  |     |
| 145 150 155                                                      |     |
| gat gag att atg gct tat gcc cag aaa ata ttt aag att ttg gat gag  | 531 |
| Asp Glu Ile Met Ala Tyr Ala Gln Lys Ile Phe Lys Ile Leu Asp Glu  |     |
| 160 165 170                                                      |     |
| gag aga gac aag gtg ctc acg cac att gat cac ata ttt atg gat atc  | 579 |
| Glu Arg Asp Lys Val Leu Thr His Ile Asp His Ile Phe Met Asp Ile  |     |
| 175 180 185                                                      |     |
| ctc act aca tgt gtg gaa aca atg tgt aat gag tac aag gtc act agt  | 627 |
| Leu Thr Thr Cys Val Glu Thr Met Cys Asn Glu Tyr Lys Val Thr Ser  |     |
| 190 195 200                                                      |     |

# ES 2 429 338 T3

|                                                                                                                                                       |      |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| gac gct tgt atg atg acc atg tac ggg ggc atc tct ctc tta agt gag<br>Asp Ala Cys Met Met Thr Met Tyr Gly Gly Ile Ser Leu Leu Ser Glu<br>205 210 215 220 | 675  |
| ttc tgt cgg gtg ctg tgc tgc tat gtc tta gag gag act agt gtg atg<br>Phe Cys Arg Val Leu Cys Cys Tyr Val Leu Glu Glu Thr Ser Val Met<br>225 230 235     | 723  |
| ctg gcc aag cgg cct ctg ata acc aag cct gag gtt atc agt gta atg<br>Leu Ala Lys Arg Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile Ser Val Met<br>240 245 250     | 771  |
| aag cgc cgc att gag gag atc tgc atg aag gtc ttt gcc cag tac att<br>Lys Arg Arg Ile Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala Gln Tyr Ile<br>255 260 265     | 819  |
| ctg ggg gcc gat cct ctg aga gtc tgc tct cct agt gtg gat gac cta<br>Leu Gly Ala Asp Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val Asp Asp Leu<br>270 275 280     | 867  |
| cgg gcc atc gcc gag gag tca gat gag gaa gag gct att gta gcc tac<br>Arg Ala Ile Ala Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr<br>285 290 295 300 | 915  |
| act ttg gcc acc gct ggt gtc agc tcc tct gat tct ctg gtg tca ccc<br>Thr Leu Ala Thr Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu Val Ser Pro<br>305 310 315     | 963  |
| cca gag tcc cct gta ccc gcg act atc cct ctg tcc tca gta att gtg<br>Pro Glu Ser Pro Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser Val Ile Val<br>320 325 330     | 1011 |
| gct gag aac agt gat cag gaa gaa agt gag cag agt gat gag gaa gag<br>Ala Glu Asn Ser Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu<br>335 340 345     | 1059 |
| gag gag ggt gct cag gag gag cgg gag gac act gtg tct gtc aag tct<br>Glu Glu Gly Ala Gln Glu Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser Val Lys Ser<br>350 355 360     | 1107 |
| gag cca gtg tct gag ata gag gaa gtt gcc cca gag gaa gag gag gat<br>Glu Pro Val Ser Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu Glu Glu Asp<br>365 370 375 380 | 1155 |
| ggt gct gag gaa ccc acc gcc tct gga ggc aag agc acc cac cct atg<br>Gly Ala Glu Glu Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr His Pro Met<br>385 390 395     | 1203 |
| gtg act aga agc aag gct gac cag tgaggatcc<br>Val Thr Arg Ser Lys Ala Asp Gln<br>400                                                                   | 1236 |

<210> 31

<211> 404

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> secuencia de IE1 optimizada por códones

<400> 31

# ES 2 429 338 T3

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

# ES 2 429 338 T3

Pro Leu Ile Thr Lys Pro Glu Val Ile Ser Val Met Lys Arg Arg Ile  
245 250 255

Glu Glu Ile Cys Met Lys Val Phe Ala Gln Tyr Ile Leu Gly Ala Asp  
260 265 270

Pro Leu Arg Val Cys Ser Pro Ser Val Asp Asp Leu Arg Ala Ile Ala  
275 280 285

Glu Glu Ser Asp Glu Glu Glu Ala Ile Val Ala Tyr Thr Leu Ala Thr  
290 295 300

Ala Gly Val Ser Ser Ser Asp Ser Leu Val Ser Pro Pro Glu Ser Pro  
305 310 315 320

Val Pro Ala Thr Ile Pro Leu Ser Ser Val Ile Val Ala Glu Asn Ser  
325 330 335

Asp Gln Glu Glu Ser Glu Gln Ser Asp Glu Glu Glu Glu Gly Ala  
340 345 350

Gln Glu Glu Arg Glu Asp Thr Val Ser Val Lys Ser Glu Pro Val Ser  
355 360 365

Glu Ile Glu Glu Val Ala Pro Glu Glu Glu Glu Asp Gly Ala Glu Glu  
370 375 380

Pro Thr Ala Ser Gly Gly Lys Ser Thr His Pro Met Val Thr Arg Ser  
385 390 395 400

Lys Ala Asp Gln

<210> 32

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Ala Tyr Ala Gly Leu Phe Thr Pro Leu

10 1 5

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Artificial

<220>

<223> cebador sintético 2944S

20 <400> 33

ctgcgcctta tccgtaact 20

<210> 34

<211> 20

25 <212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> cebador sintético 5876

30 <400> 34

cagtgaggca cctatctcag 20

<210> 35

|    |                              |    |
|----|------------------------------|----|
|    | <211> 20                     |    |
|    | <212> DNA                    |    |
|    | <213> Artificial             |    |
| 5  | <220>                        |    |
|    | <223> cebador sintético 5760 |    |
|    | <400> 35                     |    |
| 10 | caccatgagt gacgactgaa        | 20 |
|    | <210> 36                     |    |
|    | <211> 20                     |    |
|    | <212> DNA                    |    |
|    | <213> Artificial             |    |
| 15 | <220>                        |    |
|    | <223> cebador sintético 5761 |    |
|    | <400> 36                     |    |
| 20 | ttaatcgagg cctcgagcaa        | 20 |
|    | <210> 37                     |    |
|    | <211> 20                     |    |
|    | <212> DNA                    |    |
| 25 | <213> Artificial             |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> cebador sintético 5762 |    |
| 30 | <400> 37                     |    |
|    | ggctcatgtc caacattacc        | 20 |
|    | <210> 38                     |    |
|    | <211> 20                     |    |
| 35 | <212> DNA                    |    |
|    | <213> Artificial             |    |
|    | <220>                        |    |
|    | <223> cebador sintético 931S |    |
| 40 | <400> 38                     |    |
|    | gagacgcat ccacgtgtt          | 20 |
|    | <210> 39                     |    |
| 45 | <211> 20                     |    |
|    | <212> DNA                    |    |
|    | <213> Artificial             |    |
|    | <220>                        |    |
| 50 | <223> cebador sintético 5874 |    |
|    | <400> 39                     |    |
|    | cagactagg cacagcaca          | 20 |
| 55 | <210> 40                     |    |
|    | <211> 20                     |    |
|    | <212> DNA                    |    |
|    | <213> Artificial             |    |
| 60 | <220>                        |    |
|    | <223> cebador sintético 5104 |    |
|    | <400> 40                     |    |
| 65 | gagcgaggaa gcggaagagt        | 20 |

|    |                               |    |
|----|-------------------------------|----|
| 5  | <210> 41                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
|    | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador sintético 3054A |    |
| 10 | <400> 41                      |    |
|    | ccgcctacat acctcgctct         | 20 |
|    | <210> 42                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
| 15 | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador sintético 5767  |    |
|    | <400> 42                      |    |
|    | gagcattacg ctgacttgac         | 20 |
| 20 | <210> 43                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
|    | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
| 25 | <223> cebador sintético 5768  |    |
|    | <400> 43                      |    |
|    | atgcctcttc cgaccatcaa         | 20 |
|    | <210> 44                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
| 30 | <212> DNA                     |    |
|    | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador sintético 5770  |    |
|    | <400> 44                      |    |
| 35 | ggcggtaatg ttggacatga         | 20 |
|    | <210> 45                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
|    | <213> Artificial              |    |
| 40 | <220>                         |    |
|    | <223> cebador sintético 847A  |    |
|    | <400> 45                      |    |
|    | ggcggagtgtg ttacgacatt        | 20 |
|    | <210> 46                      |    |
| 45 | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
|    | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador sintético 5772  |    |
| 50 | <400> 46                      |    |
|    | cattgtgctg tgcctaagtc         | 20 |
|    | <210> 46                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
| 55 | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
|    | <223> cebador sintético 5772  |    |
|    | <400> 46                      |    |
|    | cattgtgctg tgcctaagtc         | 20 |
| 60 | <210> 46                      |    |
|    | <211> 20                      |    |
|    | <212> DNA                     |    |
|    | <213> Artificial              |    |
|    | <220>                         |    |
| 65 | <223> cebador sintético 5772  |    |
|    | <400> 46                      |    |
|    | cattgtgctg tgcctaagtc         | 20 |
|    | <210> 46                      |    |
|    | <211> 20                      |    |

|    |                                  |    |
|----|----------------------------------|----|
|    | <210> 47                         |    |
|    | <211> 20                         |    |
|    | <212> DNA                        |    |
| 5  | <213> Artificial                 |    |
|    | <220>                            |    |
|    | <223> cebador sintético GA seqF1 |    |
| 10 | <400> 47                         |    |
|    | ccagaccgag gagaagttca            | 20 |
|    | <210> 48                         |    |
|    | <211> 20                         |    |
| 15 | <212> DNA                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
|    | <220>                            |    |
|    | <223> cebador sintético GA seqF2 |    |
| 20 | <400> 48                         |    |
|    | tgctggagga gacctctgtg            | 20 |
|    | <210> 49                         |    |
| 25 | <211> 20                         |    |
|    | <212> DNA                        |    |
|    | <213> Artificial                 |    |
|    | <220>                            |    |
| 30 | <223> cebador sintético GA seqR2 |    |
|    | <400> 49                         |    |
|    | tcgatccgcc gcttcacac             | 20 |
| 35 | <210> 50                         |    |
|    | <211> 1236                       |    |
|    | <212> DNA                        |    |
|    | <213> Homo sapiens               |    |
| 40 | <400> 50                         |    |

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| gaattcgccg ccacccatgga gtcctctgcc aagagaaaga tggaccctga taatcctgac | 60   |
| gagggccctt cctccaaggt gccacgggtc aaacagatta aggttcgagt ggacatggtg  | 120  |
| cggcatagaa tcaaggagca catgctgaaa aaatataccc agacggaaga gaaattcact  | 180  |
| ggcgcttta atatgatggg aggatgtttg cagaatgcct tagatatctt agataaggtt   | 240  |
| catgagcctt tcgaggagat gaagtgtatt gggctaacta tgcagagcat gtatgagaac  | 300  |
| tacattgtac ctgaggataa gcgggagatg tggatggctt gtattgatga acttaggaga  | 360  |
| aagatgatgt atatgtgcta caggaatata gaggcttta ccaagaactc agccttcctt   | 420  |
| aagaccacca atggctgcag tcaggccatg gcggcactgc agaacttgcc tcagtgtctc  | 480  |
| cctgatgaga ttatggctta tgcccagaaa atatttaaga ttttgatga ggagagagac   | 540  |
| aaggtgtca cgcacattga tcacatattt atggatatcc tctacatg tgtggaaca      | 600  |
| atgtgtaatg agtacaaggt cactagtgc gcttgatga tgaccatga cgggggcac      | 660  |
| tctctcttaa gtgagttctg tcgggtgctg tgctgctatg tcttagagga gactagtgtg  | 720  |
| atgctggcca agcgccctct gataaccaag cctgaggta tcagtgaat gaagcgccgc    | 780  |
| attgaggaga tctgcatgaa ggtctttgcc cagtacattc tgggggccga tcctctgaga  | 840  |
| gtctgctctc ctagtgtgga tgacctacgg gccatcgccg aggagtcaga tgaggaagag  | 900  |
| gctattgtag cctacacttt ggccaccgct ggtgtcagct cctctgattc tctggtgtca  | 960  |
| ccccagagt cccctgtacc cgcgactatc cctctgtcct cagtaattgt ggtgagaac    | 1020 |
| agtgatcagg aagaaagtga gcagagtgat gaggaagagg aggaggtgc tcaggaggag   | 1080 |
| cgggaggaca ctgtgtctgt caagtctgag ccagtgtctg agatagagga agttgcccc   | 1140 |
| gaggaagagg aggatgggtc tgaggaacc accgcctctg gaggaagag caccaccct     | 1200 |
| atggtgacta gaagcaaggc tgaccagtga ggatcc                            | 1236 |

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un polinucleótido aislado que comprende la SEC ID N°: 5.
2. La composición de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende un polinucleótido aislado que comprende la SEC ID N°: 13.
- 5 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que la composición comprende un plásmido que comprende el polinucleótido aislado insertado en un vector de expresión eucariota, tal como VR10551, pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2 y pCI.
- 10 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que adicionalmente comprende un polinucleótido adicional que codifica un polipéptido HCMV, o fragmento inmunogénico del mismo, o un componente de vacuna de tipo convencional seleccionado del grupo que consiste en virus inactivados, virus atenuado, un vector viral que expresa un polipéptido HCMV aislado y un polipéptido aislado de una proteína viral HCMV, o fragmento inmunogénico del mismo.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que dicho polinucleótido adicional comprende una región codificante optimizada por codones que codifica dicho polipéptido HCMV o fragmento inmunogénico del mismo.
- 15 6. La composición de la reivindicación 5, en la que dicho polipéptido HCMV es IE-1.
7. La composición de la reivindicación 6, en la que dicho polinucleótido adicional comprende la SEC ID N°: 28.
8. La composición de la reivindicación 6, en la que la composición comprende un plásmido que comprende el polinucleótido adicional insertado en un vector de expresión eucariota, tal como VR10551, pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2 y pCI.
- 20 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende un componente seleccionado del grupo que consiste en un adyuvante y un compuesto facilitador de la transfección.
10. La composición de la reivindicación 9, en la que dicho adyuvante o dicho compuesto facilitador de la transfección se selecciona del grupo que consiste en:  
 25 bromuro de ( $\pm$ )-N-(3-aminopropil)-N,N-dimetil-2,3-bis(syn-9-tetradeceniloxi)-1-propanaminio (GAPDMORIE) y un lípido neutro;  
 una citocina;  
 monofosforil lípido A y trehalosadicatorinomicolato AF (MPL+TDM);  
 una formulación de monofosforil lípido A solubilizada;  
 CRL1005/BAK; y  
 30 bromuro de ( $\pm$ )-N-(2-hidroxietil)-N,N-dimetil-2,3-bis(tetradeciloxi)-1-propanaminio (DMRIE).
11. La composición de la reivindicación 9, en la que dicho adyuvante o dicho compuesto facilitador de la transfección comprende CRL 1005 y cloruro de benzalconio (BAK).
12. La composición de la reivindicación 1, que adicionalmente comprende un adyuvante o un compuesto facilitador de la transfección que comprende CRL1005 y cloruro de benzalconio (BAK), en la que dicho CRL1005 y BAK están  
 35 presentes a concentraciones seleccionadas del grupo que consiste en:  
 BAK 0,3 mM y CRL 10057,5 mg/ml,  
 BAK 0,3 mM y CRL 100534 mg/ml, y  
 BAK 0,3 mM y CRL 100550 mg/ml.
13. La composición de la reivindicación 12, que se formula combinando entre sí el CRL1005, BAK y un  
 40 polinucleótido a una temperatura por debajo del punto de turbidez, sin ciclado térmico a una temperatura por encima del punto de turbidez.
14. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método para suscitar una respuesta inmunitaria contra CMV en un ser humano.

Figura 1

```

1  atg gag tcg cgc ggt cgc cgt tgt ccc gaa atg ata tcc gta ctg ggt ccc
   M  E  S  R  G  R  R  C  P  E  M  I  S  V  L  G  P

52  att tcg ggg cac gtg ctg aaa gcc gtg ttt agt cgc ggc gat acg ccg gtg
   I  S  G  H  V  L  K  A  V  F  S  R  G  D  T  P  V

103 ctg ccg cac gag acg cga ctc ctg cag acg ggt atc cac gta cgc gtg agc
   L  P  H  E  T  R  L  L  Q  T  G  I  H  V  R  V  S

154 cag ccc tcg ctg atc ttg gta tcg cag tac acg ccc gac tcg acg cca tgc
   Q  P  S  L  I  L  V  S  Q  Y  T  P  D  S  T  P  C

205 cac cgc ggc gac aat cag ctg cag gtg cag cac acg tac ttt acg ggc agc
   H  R  G  D  N  Q  L  Q  V  Q  H  T  Y  F  T  G  S

256 gag gtg gag aac gtg tcg gtc aac gtg cac aac ccc acg ggc cga agc atc
   E  V  E  N  V  S  V  N  V  H  N  P  T  G  R  S  I

307 tgc ccc agc cag gag ccc atg tcg atc tat gtg tac gcg ctg ccg ctc aag
   C  P  S  Q  E  P  M  S  I  Y  V  Y  A  L  P  L  K

358 atg ctg aac atc ccc agc atc aac gtg cac cac tac ccg tcg gcg gcc gag
   M  L  N  I  P  S  I  N  V  H  H  Y  P  S  A  A  E

409 cgc aaa cac cga cac ctg ccc gta gct gac gct gtg att cac gcg tcg ggc
   R  K  H  R  H  L  P  V  A  D  A  V  I  H  A  S  G

460 aag cag atg tgg cag gcg cgt ctc acg gtc tcg gga ctg gcc tgg acg cgt
   K  Q  M  W  Q  A  R  L  T  V  S  G  L  A  W  T  R

511 cag cag aac cag tgg aaa gag ccc gac gtc tac tac acg tca gcg ttc gtg
   Q  Q  N  Q  W  K  E  P  D  V  Y  Y  T  S  A  F  V

562 ttt ccc acc aag gac gtg gca ctg cgg cac gtg gtg tgc gcg cac gag ctg
   F  P  T  K  D  V  A  L  R  H  V  V  C  A  H  E  L

613 gtt tgc tcc atg gag aac acg cgc gca acc aag atg cag gtg ata ggt gac
   V  C  S  M  E  N  T  R  A  T  K  M  Q  V  I  G  D

664 cag tac gtc aag gtg tac ctg gag tcc ttc tgc gag gac gtg ccc tcc ggc
   Q  Y  V  K  V  Y  L  E  S  F  C  E  D  V  P  S  G

715 aag ctc ttt atg cac gtc acg ctg ggc tct gac gtg gaa gag gac ctg acg
   K  L  F  M  H  V  T  L  G  S  D  V  E  E  D  L  T

766 atg acc cgc aac ccg caa ccc ttc atg cgc ccc cac gag cgc aac ggc ttt
   M  T  R  N  P  Q  P  F  M  R  P  H  E  R  N  G  F

817 acg gtg ttg tgt ccc aaa aat atg ata atc aaa ccg ggc aag atc tcg cac
   T  V  L  C  P  K  N  M  I  I  K  P  G  K  I  S  H

868 atc atg ctg gat gtg gct ttt acc tca cac gag cat ttt ggg ctg ctg tgt
   I  M  L  D  V  A  F  T  S  H  E  H  F  G  L  L  C

919 ccc aag agc atc ccg ggc ctg agc atc tca ggt aac ctg ttg atg aac ggg
   P  K  S  I  P  G  L  S  I  S  G  N  L  L  M  N  G

970 cag cag atc ttc ctg gag gta caa gcc ata cgc gag acc gtg gaa ctg cgt
   Q  Q  I  F  L  E  V  Q  A  I  R  E  T  V  E  L  R

```

**Figura 1 (continuación)**

|      |                                                                     |
|------|---------------------------------------------------------------------|
| 1021 | cag tac gat ccc gtg gct gcg ctc ttc ttt ttc gat atc gac ttg ctg ctg |
|      | Q Y D P V A A L F F F D I D L L L                                   |
| 1072 | cag cgc ggg cct cag tac agc gag cac ccc acc ttc acc agc cag tat cgc |
|      | Q R G P Q Y S E H P T F T S Q Y R                                   |
| 1123 | atc cag ggc aag ctt gag tac cga cac acc tgg gac cgg cac gac gag ggt |
|      | I Q G K L E Y R H T W D R H D E G                                   |
| 1174 | gcc gcc cag ggc gac gac gac gtc tgg acc agc gga tcg gac tcc gac gaa |
|      | A A Q G D D D V W T S G S D S D E                                   |
| 1225 | gaa ctc gta acc acc gag cgc aag acg ccc cgc gtc acc ggc ggc ggc gcc |
|      | E L V T T E R K T P R V T G G G A                                   |
| 1276 | atg gcg ggc gcc tcc act tcc gcg ggc cgc aaa cgc aaa tca gca tcc tcg |
|      | M A G A S T S A G R K R K S A S S                                   |
| 1327 | gcg acg gcg tgc acg tcg ggc gtt atg aca cgc ggc cgc ctt aag gcc gag |
|      | A T A C T S G V M T R G R L K A E                                   |
| 1378 | tcc acc gtc gcg ccc gaa gag gac acc gac gag gat tcc gac aac gaa atc |
|      | S T V A P E E D T D E D S D N E I                                   |
| 1429 | cac aat ccg gcc gtg ttc acc tgg ccg ccc tgg cag gcc ggc atc ctg gcc |
|      | H N P A V F T W P P W Q A G I L A                                   |
| 1480 | cgc aac ctg gtg ccc atg gtg gct acg gtt cag ggt cag aat ctg aag tac |
|      | R N L V P M V A T V Q G Q N L K Y                                   |
| 1531 | cag gaa ttc ttc tgg gac gcc aac gac atc tac cgc atc ttc gcc gaa ttg |
|      | Q E F F W D A N D I Y R I F A E L                                   |
| 1582 | gaa ggc gta tgg cag ccc gct gcg caa ccc aaa cgt cgc cgc cac cgg caa |
|      | E G V W Q P A A Q P K R R R H R Q                                   |
| 1633 | gac gcc ttg ccc ggg cca tgc atc gcc tcg acg ccc aaa aag cac cga ggt |
|      | D A L P G P C I A S T P K K H R G                                   |

Figura 2

|     |                                                                 |     |
|-----|-----------------------------------------------------------------|-----|
| 1   | atggagtccccgcggtcgccgctgtcccgaatgatatccgtactgggtcccatttcggg     | 60  |
| 1   | M E S R G R R C P E M I S V L G P I S G                         | 20  |
| 61  | cacgtgctgaaagccgtggttagtcgcggcgataacccccgtgctgccccacgagaccga    | 120 |
| 21  | H V L K A V F S R G D T P V L P H E T R                         | 40  |
| 121 | ctcctgcagaccggtatccacgtacgcgtgagccagccctccctgatcttggtatcccag    | 180 |
| 41  | L L Q T G I H V R V S Q P S L I L V S Q                         | 60  |
| 181 | tacacccccgactccaccccatgccaccgcggcgacaatcagctgcaggtgcagcacacc    | 240 |
| 61  | Y T P D S T P C H R G D N Q L Q V Q H T                         | 80  |
| 241 | tactttaccggcagcgcgaggtggagaacgtgtccgtcaacgtgcacaacccccaccggccga | 300 |
| 81  | Y F T G S E V E N V S V N V H N P T G R                         | 100 |
| 301 | agcatctgccccagccaggagcccatgtccatctatgtgtacgccctgcccctcaagatg    | 360 |
| 101 | S I C P S Q E P M S I Y V Y A L P L K M                         | 120 |
| 361 | ctgaacatccccagcatcaacgtgcaccactacccctccgccgcccagcgcgcaaaccga    | 420 |
| 121 | L N I P S I N V H H Y P S A A E R K H R                         | 140 |
| 421 | cacctgcccgtagctgacgctgtgattcacgcctccggcaagcagatgtggcaggccgc     | 480 |
| 141 | H L P V A D A V I H A S G K Q M W Q A R                         | 160 |
| 481 | ctcacgctctccggactggcctggaccgccagcagaaccagtggaaagagcccgacgtc     | 540 |
| 161 | L T V S G L A W T R Q Q N Q W K E P D V                         | 180 |
| 541 | tactacacctcagccttcgtgtttcccaccaaggacgtggcactgcggcacgtgggtgtgc   | 600 |
| 181 | Y Y T S A F V F P T K D V A L R H V V C                         | 200 |
| 601 | gcccacgagctgggtttgctccatggagaacacccgcgcaaccaagatgcaggtgataggt   | 660 |
| 201 | A H E L V C S M E N T R A T K M Q V I G                         | 220 |
| 661 | gaccagtacgtcaaggtgtacctggagtccttctgcgaggacgtgccctccggcaagctc    | 720 |
| 221 | D Q Y V K V Y L E S F C E D V P S G K L                         | 240 |
| 721 | tttatgcacgtcacctgggctctgacgtggaagaggacctgacctgacccgcaacccc      | 780 |
| 241 | F M H V T L G S D V E E D L T M T R N P                         | 260 |
| 781 | caacccttcattgcgccccacgagcgcgaacggctttaccgtgttggtgtcccaaaaatatg  | 840 |
| 261 | Q P F M R P H E R N G F T V L C P K N M                         | 280 |
| 841 | ataatcaaaccggcaagatctcccacatcatgctggatgtggcttttacctcacacgag     | 900 |
| 281 | I I K P G K I S H I M L D V A F T S H E                         | 300 |

Figura 2 (continuación)

|      |                                                                  |      |
|------|------------------------------------------------------------------|------|
| 901  | catttttgggctgctgtgtgtcccaagagcatccccggcctgagcatctcaggtaaacctgttg | 960  |
| 301  | H F G L L C P K S I P G L S I S G N L L                          | 320  |
| 961  | atgaacgggcagcagatcttctctggaggtacaagccatacgcgagaccgtggaactgcgc    | 1020 |
| 321  | M N G Q Q I F L E V Q A I R E T V E L R                          | 340  |
| 1021 | cagtacgatcccgtggctgccctcttctttttcgatatcgacttgctgctgcagcgcggg     | 1080 |
| 341  | Q Y D P V A A L F F F D I D L L L Q R G                          | 360  |
| 1081 | cctcagtacagcgcagcaccacaccttcaccagccagtatcgcatccagggcaagcttgag    | 1140 |
| 361  | P Q Y S E H P T F T S Q Y R I Q G K L E                          | 380  |
| 1141 | taccgacacacctgggaccggcagcagcaggggtgccgccagggcgacgacgacgtctgg     | 1200 |
| 381  | Y R H T W D R H D E G A A Q G D D D V W                          | 400  |
| 1201 | accagcggatccgactccgacgaagaactcgtaaccaccgagcgcgaagacccccgcgtc     | 1260 |
| 401  | T S G S D S D E E L V T T E R K T P R V                          | 420  |
| 1261 | accggcgggcggcgccatggcgggcgcctccacttcgcgcggdgcgaaacgcaaatcagca    | 1320 |
| 421  | T G G G A M A G A S T S A G R K R K S A                          | 440  |
| 1321 | tcctccgccaccgcctgcacctccggcggttatgacacgcggccgccttaaggccgagtc     | 1380 |
| 441  | S S A T A C T S G V M T R G R L K A E S                          | 460  |
| 1381 | accgtcgccccgaagaggacaccgacgaggattccgacaacgaaatccacaatcccgcc      | 1440 |
| 461  | T V A P E E D T D E D S D N E I H N P A                          | 480  |
| 1441 | gtgttcacctggccaccctggcaggccggcatcctggcccgcgaacctgggtgcccatgggtg  | 1500 |
| 481  | V F T W P P W Q A G I L A R N L V P M V                          | 500  |
| 1501 | gctaccgttcagggtcagaatctgaagtaccaggaattcttctctgggacgccaacgacatc   | 1560 |
| 501  | A T V Q G Q N L K Y E E F F W D A N D I                          | 520  |
| 1561 | taccgcatcttcgccgaattggaaggcgtatggcagcccgtgcccacccaaacgccgc       | 1620 |
| 521  | Y R I F A E L E G V W Q P A A Q P K R R                          | 540  |
| 1621 | cgccaccgggaagacgccttgcccgggcatgcatcgctccacccccaaaaagcaccga       | 1680 |
| 541  | R H R Q D A L P G P C I A S T P K K H R                          | 560  |
| 1681 | ggt                                                              | 1700 |
| 561  | G                                                                | 580  |

Figura 3

|              |     |                                                      |
|--------------|-----|------------------------------------------------------|
| SEC ID Nº: 1 | 1   | atggagtcgcgcgggtcgcggttggteccgaaatgatatccgtactgggtcc |
| SEC ID Nº: 8 | 1   | atggagagccgcgggagaagaatgtcccgagatgatcagtgctcctgggcc  |
| SEC ID Nº: 1 | 51  | caattcgggggacgtgcgaaagccgtgttagtcgcggcgatacgtcgg     |
| SEC ID Nº: 8 | 51  | aatatctggccacgtgcgaaagcgtgtcttctcgaggggagatacaccag   |
| SEC ID Nº: 1 | 101 | tgttgcgcgacgagacgcgactcctgcagacgggtatccacgtacgcgtg   |
| SEC ID Nº: 8 | 101 | ttcttctctacgaaacacgactgctccagacaggtattcatgtccgcgtg   |
| SEC ID Nº: 1 | 151 | agccagccctcgtgatcttgggtatcgcagtaacgcgcgactcgagcc     |
| SEC ID Nº: 8 | 151 | tctcagccgtcactcatccttggtagccagtaactccggatagtaactc    |
| SEC ID Nº: 1 | 201 | atgccaccgcggcgacaatcagctgcaggtgcagcacacgtactttacgg   |
| SEC ID Nº: 8 | 201 | atgccataggggcgacaaccagctccaagttcagcatacgtattttacag   |
| SEC ID Nº: 1 | 251 | gcagcgaggtggagaacgtgtcgggtcaacgtgcacaacccacggcgga    |
| SEC ID Nº: 8 | 251 | ggtccgaggtggagaatgtgagcgtcaatgtgcacaacccacggagct     |
| SEC ID Nº: 1 | 301 | agcatctgcccagccaggagcccatgtcgatctatggtacgcggtgcc     |
| SEC ID Nº: 8 | 301 | tcaatatgcccattctcaggaacctatgtctatctacgtttatgcactgcc  |
| SEC ID Nº: 1 | 351 | gctcaagatgctgaacatccccagcatcaacgtgcaccactaccgctgg    |
| SEC ID Nº: 8 | 351 | tttgaagatgctgaacatccccagtattaatgttcaccattaccctctg    |
| SEC ID Nº: 1 | 401 | cggccgagcgcaaacaccgacacctgcccgtagctgacgctgtgattcac   |
| SEC ID Nº: 8 | 401 | ctgctgaacgcaagcacaggcatctccccgtggccgacgctgtgatccat   |
| SEC ID Nº: 1 | 451 | gggtcgggcaaggagatgtggcaggcggtctcacgggtctcgggactggc   |
| SEC ID Nº: 8 | 451 | gctagtggcaacagatgtggcaggcacgattaacagtaagcgggtggc     |
| SEC ID Nº: 1 | 501 | ctggacgctgcagcagaaccagtggaagagcccgacgtctactacagct    |
| SEC ID Nº: 8 | 501 | atggacacggcagcagaatcagtggaagagcccgacgtataclatacca    |
| SEC ID Nº: 1 | 551 | caggttccgtgtttccaccaaggacgtggcactgcggcaccgtgtgtgc    |
| SEC ID Nº: 8 | 551 | gtgctttgtctttcctaccaaggacgtcgcttaagacatgtgtgtctgc    |
| SEC ID Nº: 1 | 601 | gcgcacgagctggtttgctccatggagaacacgcgcgcaaccagatgca    |
| SEC ID Nº: 8 | 601 | gcgcacgagctggtgtgtagcatggaaaacactcgtgcaactaaattgca   |
| SEC ID Nº: 1 | 651 | ggtgataggtgaccagtaactcaaggtgtacctggagtccttctgcagg    |
| SEC ID Nº: 8 | 651 | ggtgatggcgatcagtatgttaaggtctatctggagtcattctgtagg     |
| SEC ID Nº: 1 | 701 | acgtgcctccggcaagctctttatgcacgtacagctgggctctgacgtg    |
| SEC ID Nº: 8 | 701 | acgtcccatccgggaactattcatgcacgtcactcttgggtcggatgtg    |
| SEC ID Nº: 1 | 751 | gaagaggacctgacgatgacccgcaacccgcaacccttcatgcgcccca    |
| SEC ID Nº: 8 | 751 | gaagaagatctgacaatgacccggaaccccaacccttcatggggctca     |
| SEC ID Nº: 1 | 801 | cgagcgcaacggctttacgggtgtgtgtcccaaaaatatgataatcnaac   |
| SEC ID Nº: 8 | 801 | cgaaacggaacgggttcacagtgctatgcccaaaaatatgataatcnaac   |
| SEC ID Nº: 1 | 851 | cgggcaagatctgcacatcatgctggatgtggctttacctcacacgag     |

SEC ID Nº: 8

851 ccggttaagatatcccatatcatgctcgatgtggctttcacttcccacgaa

**Figura 3 (continuación)**

SEC ID Nº: 1

901 caattttgggctgctgtgtcccaagagcatccgggctgagcatctcagg

SEC ID Nº: 8

901 cacttcgggctgctgtgtcccaagtccatccaggactcagcatatccgg

SEC ID Nº: 1

951 taacctgttgatgaacgggcagcagatcttctcagggtacaagccatac

SEC ID Nº: 8

951 caatttatgatgaacggtcaacagatcttctcagggtgcaggcaatca

SEC ID Nº: 1

1001 gcgagaccgtggaactgcgtcagtagcatccgtgggtgcgtctctcttt

SEC ID Nº: 8

1001 gagaacagtggaactccgccagtatgacctgtgggggctctgtttttc

SEC ID Nº: 1

1051 ttcgatatcgacttgctgctgtaggcgggctcagtagcagcgagcaccc

SEC ID Nº: 8

1051 tttagacattgatctgtgtgttcacgaggaccacaatattctgagcatcc

SEC ID Nº: 1

1101 cacttccaccagccagtagtcgcatccaggccaagcttgagtagccgacaca

SEC ID Nº: 8

1101 aacatttacttccagtagcgtatccaggccaagctcgaatcacaggcaca

SEC ID Nº: 1

1151 cctgggacgggcagcagcaggggtgcggcccgaggcagcagcagcctctgg

SEC ID Nº: 8

1151 cgtgggacaggcagcagcaggggggtgcggcaaggaggacgatgacgtatgg

SEC ID Nº: 1

1201 accagcggatcggactccgacgaagaactcgtaacccagagcgcaagac

SEC ID Nº: 8

1201 acatccggctccgatagtgtgaggagcttctgaccaccagagcggaagac

SEC ID Nº: 1

1251 gcccgccgtcacggggcgccgcccatggcgccgctccacttccggcg

SEC ID Nº: 8

1251 cccaagagtgaaggggcagggtgcaatggccggagcatctaccagcgccg

SEC ID Nº: 1

1301 gccgcaaacgcaaatcagcatcctcggcgagggcggtgcacgtcggggctt

SEC ID Nº: 8

1301 ggcggaagcgcaaatctgcctcatcagcaactgcttgcaccagcgggtga

SEC ID Nº: 1

1351 atgacacggcgccggccttaaggccgagtcacccgtcggcgccgaagagga

SEC ID Nº: 8

1351 atgacgaggggacgcctaaaggctgagagcaccgtggcccgctgaggaaga

SEC ID Nº: 1

1401 caccgacgaggattccgacaaacgaaatccacaatccggccgtgttcacct

SEC ID Nº: 8

1401 tactgacgaggactcagacaaacgaaatccacaatccgtgcgggtgttcacat

SEC ID Nº: 1

1451 ggccggcctggcaggccggcatcctggcccgcaactcgggtgccatgggtg

SEC ID Nº: 8

1451 ggccctccttggcaggccggattctggcccggaactcgggtaccgatgggtg

SEC ID Nº: 1

1501 gctacggttcagggtcagaatctgaagtaccagggaattcttctgggacgc

SEC ID Nº: 8

1501 gccactgttccaggccagaacctgaaataccaggagtttttctggggtgc

SEC ID Nº: 1

1551 caacgacatctaccgcatcttcggcgaattggaaggcgtatggcagcccg

SEC ID Nº: 8

1551 caatgacatctacagaatttttgggaactggaggaggtgtggcagccag

SEC ID Nº: 1

1601 ctggcacaaccacaacgtcgcggccaccggcaagacgcttggccggggca

SEC ID Nº: 8

1601 ccgcacaaccacaagggcggggccataggcaggatggcctggccgggccc

SEC ID Nº: 1

1651 tgcattgcctcgacggccaaaagcaccgaggt

SEC ID Nº: 8

1651 tgcattgcgagcacccaaaaagcaccgaggc

Figura 4

```

1 atggaatccaggatctgggtgcctggtagtctgcgttaacctgtgtatcgtctgtctgggt 60
1 M E S R I W C L V V C V N L C I V C L G 20

61 gctgcgggtttcctcttcttagtacttcccatgcaacttcttctactcacaatggaagccat 120
21 A A V S S S S T S H A T S S T H N G S H 40

121 acttctcgtagcagctctgctcaaaccgggtcagtctattctcaacacgtaacgtcttct 180
41 T S R T T S A Q T R S V Y S Q H V T S S 60

181 gaagccgtcagtcatagagccaacgagactatctacaacactaccctcaagtacggagat 240
61 E A V S H R A N E T I Y N T T L K Y G D 80

241 gtgggtgggagtcacactaccaagtaccctatcgcggtgtgttctatggcccagggtacg 300
81 V V G V N T T K Y P Y R V C S M A Q G T 100

301 gatcttattcgctttgaacgtaatatcatctgcacctcgatgaagcctatcaatgaagac 360
101 D L I R F E R N I I C T S M K P I N E D 120

361 ttggatgagggcatcatgggtggtctacaagcgcaacatcgtggcgccacacctttaaggta 420
121 L D E G I M V V Y K R N I V A H T F K V 140

421 cgggtctacaaaaagggttttgacgtttcgtcgttagctacgcttacatctacaccacttat 480
141 R V Y Q K V L T F R R S Y A Y I Y T T Y 160

481 ctgctgggagcagcaatacgggaatacgtggcgccctcctatgtgggagattcatcacatcaac 540
161 L L G S N T E Y V A P P M W E I H H I N 180

541 aagtttgctcaatgctacagttcctacagccgcgttataggaggcacgggttttcgtggca 600
181 K F A Q C Y S S Y S R V I G G T V F V A 200

```

Figura 4 (continuación)

601 tatcatagggacagttatgaaaacaaaaccatgcaattaattcccgacgattattccaac 660  
201 Y H R D S Y E N K T M Q L I P D D Y S N 220

661 acccacagtaccggttacgtgacgggtcaaggatcagtggcacagccgcggcagcacctgg 720  
221 T H S T R Y V T V K D Q W H S R G S T W 240

721 ctctatcgtgagacctgtaatctgaactgtatgctgaccatcactactgcgcgctccaag 780  
241 L Y R E T C N L N C M L T I T T A R S K 260

781 tatccttatcatttttttgcaacttccacgggtgatgtggtttacatttctcctttctac 840  
261 Y P Y H F F A T S T G D V V Y I S P F Y 280

841 aacggaaccaatcgcaatgccagctactttggagaaaacgccgacaagtttttcattttc 900  
281 N G T N R N A S Y F G E N A D K F F I F 300

901 ccgaactacaccatcggtttccgacttttgggaagacccaacgctgcgccagaaaacccatagg 960  
301 P N Y T I V S D F G R P N A A P E T H R 320

961 ttggtggctttttctcgaaactgcccgaactcgggtgatctcttgggatatacaggacgagaag 1020  
321 L V A F L E R A D S V I S W D I Q D E K 340

1021 aatgtcacctgccagctcacettctgggaagcctcggaacgtactatccggttccgaagcc 1080  
341 N V T C Q L T F W E A S E R T I R S E A 360

1081 gaagactcgtaccactttttcttctgccaaaatgactgcaacttttctgtotaagaaacaa 1140  
361 E D S Y H F S S A K M T A T F L S K K Q 380

1141 gaagtgaacatgtccgactccgcgctggactgcgtacgtgatgaggctataaataagtta 1200  
381 E V N M S D S A L D C V R D E A I N K L 400

Figura 4 (continuación)

```

1201 cagcagattttcaatacttcatacaatcaaacatatgaaaaatacggaaacgtgtccgtc 1260
401 Q Q I F N T S Y N Q T Y E K Y G N V S V 420

1261 ttcgaaaccagcggcggtctggtggtgttctggcaaggcatcaagcaaaaatctttggtg 1320
421 F E T S G G L V V F W Q G I K Q K S L V 440

1321 gaattggaacgtttggccaatcgatccagtctgaatatcactcataggaccagaagaagt 1380
441 E L E R L A N R S S L N I T H R T R R S 460

1381 acgagtgacaataatacaactcatttgtccagcatggaatcgggtgcacaatctggtctac 1440
461 T S D N N T T H L S S M E S V H N L V Y 480

1441 gccagctgcagttcacctatgacacgttgcgcggttacatcaaccgggcgctggcgcaa 1500
481 A Q L Q F T Y D T L R G Y I N R A L A Q 500

1501 atcgcagaagcctggtgtgtggatcaacggcgccaccctagaggtcttcaaggaactcagc 1560
501 I A E A W C V D Q R R T L E V F K E L S 520

1561 aagatcaaccgcgtcagccattctctcggccatttacaacaaaccgattgccgcgcgtttc 1620
521 K I N P S A I L S A I Y N K P I A A R F 540

1621 atgggtgatgtcttgggcctggccagctgcgtgaccatcaaccaaaccagcgtcaagggtg 1680
541 M G D V L G L A S C V T I N Q T S V K V 560

1681 ctgcgtgatatgaacgtgaaggaatcgccaggacgctgctactcacgaccgcgtgggtcatc 1740
561 L R D M N V K E S P G R C Y S R P V V I 580

1741 tttaatttcgccaacagctcggtacgtgcagtacggtcaactgggcgaggacaacgaaatc 1800
581 F N F A N S S Y V Q Y G Q L G E D N E I 600

```

Figura 4 (continuación)

```

1801 ctgttgggcaaccaccgcaactgaggaatgtcagcttcccagcctcaagatcttcatcgcc 1860
601 L L G N H R T E E C Q L P S L K I F I A 620

1861 gggaaactcggcctacgagtacgtggactacctcttcaaacgcatgattgacctcagcagt 1920
621 G N S A Y E Y V D Y L F K R M I D L S S 640

1921 atctccaccgctcgacagcatgatcgccctggatatcgacccgctggaaaataccgacttc 1980
641 I S T V D S M I A L D I D P L E N T D F 660

1981 agggtactggaacttttactcgcagaaagagctgcgttccagcaacgtttttgacctcgaa 2040
661 R V L E L Y S Q K E L R S S N V F D L E 680

2041 gagatcatgcggaattcaactcgtacaagcagcgggtaaagtacgtggaggacaaggta 2100
681 E I M R E F N S Y K Q R V K Y V E D K V 700

2101 gtcgacccgctaccgcccctacctcaaggggtctggacgacctcatgagcggcctgggcgcc 2160
701 V D P L P P Y L K G L D D L M S G L G A 720

2161 gcgggaaaggccggttgccgtagccattggggccggtgggtggcgcggtggcctccgtggtc 2220
721 A G K A V G V A I G A V G G A V A S V V 740

2221 gaaggcggttgccaccttcctcaaaaacccttcggagccttcaccatcatcctcgtggcc 2280
741 E G V A T F L K N P F G A F T I I L V A 760

2281 atagccgtagtcattatcacttatttgatctatactcgacagcggcgtctgtgcacgcag 2340
761 I A V V I I T Y L I Y T R Q R R L C T Q 780

2341 ccgctgcagaacctctttccctatctgggtgtccgccgacgggaccaccgtgacgtcgggc 2400
781 P L Q N L F P Y L V S A D G T T V T S G 800

```

Figura 4 (continuación)

```

2401 agcaccaaagacacgctcggttacaggctccgccttcctacgaggaaagtgtttataattct 2460
801 S T K D T S L Q A P P S Y E E S V Y N S 820

2461 ggtcgcaaaggaccgggaccaccgctcgtctgatgcacccacggcggctccgccttacacc 2520
821 G R K G P G P P S S D A S T A A P P Y T 840

2521 aacgagcaggcttaccagatgcttctggccctggcccgctctggacgcagagcagcgagcg 2580
841 N E Q A Y Q M L L A L A R L D A E Q R A 860

2581 cagcagaacggtacagattctttggacggacagactggcacgcaggacaagggacagaag 2640
861 Q Q N G T D S L D G Q T G T Q D K G Q K 880

2641 cctaacctgctagaccggctgcgacatcgcaaaaacggctacagacacttgaaagactcc 2700
881 P N L L D R L R H R K N G Y R H L K D S 900

2701 gacgaagaagagaacgtc 2718
901 D E E E N V 906

```

Figura 5

```

1 atggaatccaggatctggtgcctggtagtctgcgttaacctgtgtatcgtctgtctgggt 60
1 M E S R I W C L V V C V N L C I V C L G 20

61 gctgccgtttcctcttcttagtacttcccatgcaacttcttctactcacaatggaagccat 120
21 A A V S S S S T S H A T S S T H N G S H 40

121 acttctcgcaccacctctgctcaaaccgggtcagtcctattctcaacacgtaacctcttct 180
41 T S R T T S A Q T R S V Y S Q H V T S S 60

181 gaagccgtcagtcataagagccaacgagactatctacaacactaccctcaagtacggagat 240
61 E A V S H R A N E T I Y N T T L K Y G D 80

241 gtggtgggagtcacaactaccaagtaccctatcgcgtgtgttctatggcccagggtacc 300
81 V V G V N T T K Y P Y R V C S M A Q G T 100

301 gatcttattcgcctttgaacgcaatatcatctgcacctccatgaagcctatcaatgaagac 360
101 D L I R F E R N I I C T S M K P I N E D 120

361 ttggatgagggcatcatggtggtctacaagcgcaacatcgtggcccacacctttaaggta 420
121 L D E G I M V V Y K R N I V A H T F K V 140

421 cgggtctacaaaaagggttttgacctttcgccgcagctacgcttacatctacaccacttat 480
141 R V Y Q K V L T F R R S Y A Y I Y T T Y 160

481 ctgctgggcagcaataccgaatacgtggcccctcctatgtgggagattcatcacatcaac 540
161 L L G S N T E Y V A P P M W E I H H I N 180

541 aagtttgctcaatgctacagttcctacagccgcgttataggaggcacggttttcgtggca 600
181 K F A Q C Y S S Y S R V I G G T V F V A 200

```

Figura 5 (continuación)

```

601 tatcatagggacagttatgaaaacaaaaccatgcaattaattcccgacgattattccaac 660
201 Y H R D S Y E N K T M Q L I P D D Y S N 220

661 acccacagtaccgctacgtgaccgtcaaggatcagtggtcacagccgcgccgagcacctgg 720
221 T H S T R Y V T V K D Q W H S R G S T W 240

721 ctctatcgcgagacctgtaatctgaactgtatgctgaccatcactactgcccgtccaag 780
241 L Y R E T C N L N C M L T I T T A R S K 260

781 tatecttatcatttttttgcgaacttccaccggtgatgtggtttacattttctcctttctac 840
261 Y P Y H F F A T S T G D V V Y I S P F Y 280

841 aacggaaccaatcgcaatgccagctacttttgagaaaacgccgacaagtttttcatttttc 900
281 N G T N R N A S Y F G E N A D K F F I F 300

901 cccaactacaccatcggtttccgacttttgaagacccaacgctgccccagaaacccatagg 960
301 P N Y T I V S D F G R P N A A P E T H R 320

961 ttggtggcttttctcgaacgcgccgactccgtgatctcttgggatatacaggacgagaag 1020
321 L V A F L E R A D S V I S W D I Q D E K 340

1021 aatgtcacctgccagctcaccttctggaagcctccgaacgcactatccgctccgaagcc 1080
341 N V T C Q L T F W E A S E R T I R S E A 360

1081 gaagactcctaccacttttcttctgcaaaaatgactgcaacttttctgtctaagaaacaa 1140
361 E D S Y H F S S A K M T A T F L S K K Q 380

1141 gaagtgaacatgtccgactccgccttggactgcgtacgcgatgaggctataaataagtta 1200
381 E V N M S D S A L D C V R D E A I N K L 400

```

Figura 5 (continuación)

```

1201 cagcagattttcaataacttcatacaatcaaacatatgaaaaatacggaaacgtgtccgtc 1260
401 Q Q I F N T S Y N Q T Y E K Y G N V S V 420

1261 ttcgaaaccagcggcggtctgggtggtgttctggcaaggcatcaagcaaaaatctttggtg 1320
421 F E T S G G L V V F W Q G I K Q K S L V 440

1321 gaattggaacgcttggccaatcgatccagctctgaatatcactcataggaccagaagaagt 1380
441 E L E R L A N R S S L N I T H R T R R S 460

1381 accagtgacaataatacaactcatttgtccagcatggaatccgtgcacaatctggtctac 1440
461 T S D N N T T H L S S M E S V H N L V Y 480

1441 gccagctgcagttcacctatgacaccttgcgcggttacatcaaccgggcccctggcccaa 1500
481 A Q L Q F T Y D T L R G Y I N R A L A Q 500

1501 atcgcagaagcctggtgtgtggatcaacggcgcaccctagaggtcttcaaggaactcagc 1560
501 I A E A W C V D Q R R T L E V F K E L S 520

1561 aagatcaaccctcagccattctctccgccatttacaacaaaccattgccgcccgttc 1620
521 K I N P S A I L S A I Y N K P I A A R F 540

1621 atgggtgatgtcttgggctggccagctgcgtgaccatcaaccaaaccagcgtcaagggtg 1680
541 M G D V L G L A S C V T I N Q T S V K V 560

1681 ctgcgcgatatgaacgtgaaggaatccccaggacgctgctactcacgaccggtgggtcatc 1740
561 L R D M N V K E S P G R C Y S R P V V I 580

1741 tttaatttcgccaacagctcctacgtgcagtacggtcaactgggcgaggacaacgaaatc 1800
581 F N F A N S S Y V Q Y G Q L G E D N E I 600

```

Figura 5 (continuación)

```

1801 ctggttgggcaaccaccgcactgaggaatgtcagcttcccagcctcaagatcttcacgcgc 1860
601 L L G N H R T E E C Q L P S L K I F I A 620

1861 gggaaactccgcctacgagtagctggactacctcttcaaacgcacatgattgacctcagcagt 1920
621 G N S A Y E Y V D Y L F K R M I D L S S 640

1921 atctccaccgtcgacagcatgatcgccctggatatcgacccctggaaaataccgacttc 1980
641 I S T V D S M I A L D I D P L E N T D F 660

1981 aggggtactggaactttactcccagaaagagctgcgctccagcaacgtttttgacctcgaa 2040
661 R V L E L Y S Q K E L R S S N V F D L E 680

2041 gagatcatgcgcgaattcaactcctacaagcagcgggttaaagtagctggaggacaaggta 2100
681 E I M R E F N S Y K Q R V K Y V E D K V 700

2101 gtcgacccactacctccctacctcaagggtctggacgac 2139
701 V D P L P P Y L K G L D D 713

```

### Figura 6

|     |                                                     |     |
|-----|-----------------------------------------------------|-----|
| 1   | ATGGAATCCAGGATCTGGTGCCTGGTAGTCTGCGTTAACCTTGTATCGT   | 50  |
|     |                                                     |     |
| 1   | ATGGAATCCAGGATCTGGTGTCTCGTCGTCTGTGTCAACCTTTGTATCGT  | 50  |
|     |                                                     |     |
| 51  | CTGTCTGGGTGCTGCGGTTTC---CTCTTCTAGTACTTCCCATGCAACTT  | 97  |
|     | .   .                                               |     |
| 51  | TTGCTTGGGAGCTGCCGTTAGTAGCAGCTCCACAAGT---CATGCCACCA  | 97  |
|     |                                                     |     |
| 98  | CTTCTACTCACAATGGAAGCCATACTTCTCGTACGACGTCTGCTCAAACC  | 147 |
|     | ....   .   .   .                                    |     |
| 98  | GCAGTACCCATAACGGTAGCCACACCTCACGGACAACGAGCGCTCAGACT  | 147 |
|     |                                                     |     |
| 148 | CGGTCAGTCTATTCTCAACACGTAACGTCTTCTGAAGCCGTCAGTCATAG  | 197 |
|     | .   .   .   .                                       |     |
| 148 | CGTTCCGTGTACTCGCAGCACGTTACCTCCTCAGAGGCAGTGTCCCATCG  | 197 |
|     |                                                     |     |
| 198 | AGCCAACGAGACTATCTACAACACTACCCTCAAGTACGGAGATGTGGTGG  | 247 |
|     | .   .                                               |     |
| 198 | CGCTAACGAACTATCTACAACACCACACTCAAGTATGGCGACGTAGTGG   | 247 |
|     |                                                     |     |
| 248 | GAGTCAACACTACCAAGTACCCCTATCGCGTGTGTTCTATGGCCCAGGGT  | 297 |
|     | .   .   .   .   .                                   |     |
| 248 | GTGTAAATACGACAAAATACCCATATAGAGTGTGCTCAATGGCCCAGGGC  | 297 |
|     |                                                     |     |
| 298 | ACGGATCTTATTGCGCTTTGAACGTAATATCATCTGCACCTCGATGAAGCC | 347 |
|     | .                                                   |     |
| 298 | ACCGATCTGATCCGGTTCGAGAGAAATATAATCTGCACCTCTATGAAACC  | 347 |
|     |                                                     |     |
| 348 | TATCAATGAAGACTTGGATGAGGGCATCATGGTGGTCTACAAGCGCAACA  | 397 |
|     |                                                     |     |
| 348 | TATCAATGAGGATCTGGACGAGGGGATCATGGTGGTGTATAAGAGAAATA  | 397 |
|     |                                                     |     |

Figura 6 (continuación)

|     |                                                     |     |
|-----|-----------------------------------------------------|-----|
| 398 | TCGTGGCGCACACCTTTAAGGTACGGGTCTACCAAAGGTTTTGACGTTT   | 447 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |     |
| 398 | TTGTCGCCCATACCTTTAAAGTGCGCGTTTATCAAAGGTGTTAACTTTC   | 447 |
| 448 | CGTCGTAGCTACGCTTACATCTACACCACTTATCTGCTGGGCAGCAATAC  | 497 |
|     | . .. ... . . . . . . . . . . . . . . . . . .        |     |
| 448 | AGAAGGTCCTACGCTTATATCTACACCACGTACCTGCTCGGCTCCAATAC  | 497 |
| 498 | GGAATACGTGGCGCCTCCTATGTGGGAGATTCATCACATCAACAAGTTTG  | 547 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |     |
| 498 | AGAGTACGTGCTCCTCCCATGTGGGAAATTCACCATATCAACAAGTTTCG  | 547 |
| 548 | CTCAATGCTACAGTTCCTACAGCCGCGTTATAGGAGGCACGGTTTTTCGTG | 597 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .         |     |
| 548 | CCCAGTGCTACTCCTCTTACTCACGCGTGATCGGAGGGACCGTGTTTCGTG | 597 |
| 598 | GCATATCATAGGGACAGTTATGAAAACAAAACCATGCAATTAATTCCCGA  | 647 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .             |     |
| 598 | GCATATCACCGAGATTCTTACGAAAACAAGACAATGCAGCTGATCCCTGA  | 647 |
| 648 | CGATTATTCCAACACCCACAGTACCCGTTACGTGACGGTCAAGGATCAGT  | 697 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .         |     |
| 648 | TGACTACTCTAATACACACTCAACCCGTTATGTGACCGTAAAGGATCAAT  | 697 |
| 698 | GGCACAGCCGCGGCAGCACCTGGCTCTATCGTGAGACCTGTAATCTGAAC  | 747 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .             |     |
| 698 | GGCACTCCCGCGGGTCTACCTGGCTCTACAGGGAAACGTGCAACCTGAAT  | 747 |
| 748 | TGTATGCTGACCATCACTACTGCGCGCTCCAAGTATCCTTATCATTTTTT  | 797 |
|     | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .             |     |
| 748 | TGTATGCTGACAATAACGACTGCTAGGTCAAAGTACCCCTACCACTTTTT  | 797 |

130



Figura 6 (continuación)

|      |                                                         |      |
|------|---------------------------------------------------------|------|
| 1598 | ACAAACCGATTGCCGCGCGTTTCATGGGTGATGTCTTGGGCCTGGCCAGC      | 1647 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . |      |
| 1598 | ATAAGCCGATTGCCGCTAGGTTTATGGGCGATGTTCTGGGACTGGCGAGC      | 1647 |
| 1648 | TGCGTGACCATCAACCAAACAGCGTCAAGGTGCTGCGTGATATGAACGT       | 1697 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .   |      |
| 1648 | TGTGTGACTATAAACCAAACGTCAGTCAAGGTGCTTAGGGACATGAACGT      | 1697 |
| 1698 | GAAGGAATCGCCAGGACGCTGCTACTCACGACCCGTGGTCATCTTTAATT      | 1747 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . |      |
| 1698 | TAAGGAATCCCCTGGCCGGTGTTATTCGCGGCCTGTTGTCATATTTAATT      | 1747 |
| 1748 | TCGCCAACAGCTCGTACGTGCAGTACGGTCAACTGGGCGAGGACAACGAA      | 1797 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .   |      |
| 1748 | TTGCCAATTCCCTCTTACGTGCAGTACGGCCAGTTAGGCGAGGACAACGAA     | 1797 |
| 1798 | ATCCTGTTGGGCAACCACCGCACTGAGGAATGTCAGCTTCCCAGCCTCAA      | 1847 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .     |      |
| 1798 | ATTTTATTGGGCAATCATCGCACCGAGGAATGCCAGTTGCCGAGCCTGAA      | 1847 |
| 1848 | GATCTTCATCGCCGGGAACTCGGCCTACGAGTACGTGGACTACCTCTTCA      | 1897 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .   |      |
| 1848 | AATCTTTATAGCTGGGAACAGCGCTTACGAGTACGTGACTATCTCTTTA       | 1897 |
| 1898 | AACGCATGATTGACCTCAGCAGTATCTCCACCGTCGACAGCATGATCGCC      | 1947 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .     |      |
| 1898 | AGCGGATGATTGATCTGAGCTCGATCAGCACAGTCGACTCTATGATCGCC      | 1947 |
| 1948 | CTGGATATCGACCCGCTGGAAAATACCGACTTCAGGGTACTGGAACTTTA      | 1997 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |      |
| 1948 | CTGGATATTGACCCGCTGGAGAATACAGATTCAGAGTGCTTGAATTATA       | 1997 |

Figura 6 (continuación)

|      |                                                     |      |
|------|-----------------------------------------------------|------|
| 1998 | CTCGCAGAAAGAGCTGCGTTCCAGCAACGTTTTTTGACCTCGAAGAGATCA | 2047 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .     |      |
| 1998 | TTCACAGAAAGAGCTGCGGAGCTCAAATGTGTTTCGATCTTGAGGAAATTA | 2047 |
| 2048 | TGCGCGAATTCAACTCGTACAAGCAGCGGGTAAAGTACGTGGAGGACAAG  | 2097 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .     |      |
| 2048 | TGCGGGAATTCAACAGCTACAAGCAACGGGTCAAGTACGTGGAGGACAAG  | 2097 |
| 2098 | GTAGTCGACCCGCTACCGCCCTACCTCAAGGGTCTGGACGACCTCATGAG  | 2147 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .     |      |
| 2098 | GTGGTGGACCCACTGCCCCCTACTTGAAAGGTCTGGATGATCTCATGAG   | 2147 |
| 2148 | CGGCCTGGGCGCCGCGGGAAAGGCCGTTGGCGTAGCCATTGGGGCCGTGG  | 2197 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |      |
| 2148 | CGGTCTTGAGCGGCTGGCAAAGCCGTTGGAGTAGCAATCGGCGCCGTTG   | 2197 |
| 2198 | GTGGCGCGGTGGCCTCCGTGGTTCGAAGGCGTTGCCACCTTCCTCAAAAAC | 2247 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |      |
| 2198 | GAGGGGCCGTGGCTTCTGTAGTGGAGGGCGTTGCTACCTTTTGAAGAAC   | 2247 |
| 2248 | CCCTTCGGAGCCTTCACCATCATCCTCGTGGCCATAGCCGTAGTCATTAT  | 2297 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |      |
| 2248 | CCCTTCGGGGCCTTTACTATCATTCTAGTCGCTATTGCAGTCGTGATAAT  | 2297 |
| 2298 | CACTTATTTGATCTATACTCGACAGCGGCGTCTGTGCACGCAGCCGCTGC  | 2347 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |      |
| 2298 | CACATATTTGATCTATACTCGGCAGAGACGCTTATGCACACAGCCCCTTC  | 2347 |
| 2348 | AGAACCTCTTTCCCTATCTGGTGTCCGCCGACGGGACCACCGTGACGTCG  | 2397 |
|      | . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .       |      |
| 2348 | AGAATCTCTTCCCCTATCTGGTCTCCGCAGATGGGACAACAGTGACAAGT  | 2397 |

Figura 6 (continuación)

|      |                                                           |      |
|------|-----------------------------------------------------------|------|
| 2398 | GGCAGCACCAAAGACACGTCGTTACAGGCTCCGCCTTCCTACGAGGAAAG        | 2447 |
|      | ...   .   .   .   ...   .   .     .   ...     .   .       |      |
| 2398 | GGCTCGACTAAGGATACCAGCTTGCAAGCTCCCCCAAGTTACGAAGAGAG        | 2447 |
| 2448 | TGTTTATAATTCTGGTCGCAAAGGACCGGGACCACCGTCGTCTGATGCAT        | 2497 |
|      | .         .   .   .   .         .   .     .   ...   .     |      |
| 2448 | CGTTTATAACTCCGGTAGGAAAGGACCAGGTCCACCTAGCTCAGATGCAT        | 2497 |
| 2498 | CCACGGCGGCTCCGCCTTACACCAACGAGCAGGCTTACCAGATGCTTCTG        | 2547 |
|      | .   .   .   .   .   .   .   .         .   .         .   . |      |
| 2498 | CAACCGCTGCCCCACCCTATACTAATGAGCAGGCCTATCAGATGCTGCTT        | 2547 |
| 2548 | GCCCTGGCCCGTCTGGACGCAGAGCAGCGAGCGCAGCAGAACGGTACAGA        | 2597 |
|      | .   .   .   .         .         .         .   .           |      |
| 2548 | GCACTCGCCAGACTGGACGCCGAGCAGCGAGCCCAGCAGAATGGGACAGA        | 2597 |
| 2598 | TTCTTTGGACGGACAGACTGGCACGCAGGACAAGGGACAGAAGCCTAACC        | 2647 |
|      | .   ...   .     .         .   .     .   .         .     . |      |
| 2598 | CTCCCTCGACGGGCAGACTGGAACCCAGGATAAAGGACAGAAACCTAATC        | 2647 |
| 2648 | TGCTAGACCGGCTGCGACATCGCAAAAACGGCTACAGACACTTGAAAGAC        | 2697 |
|      | .     .   .   .   .   .     .         .     .   .         |      |
| 2648 | TGCTTGACCGACTAAGACACAGGAAAAATGGCTACAGGCACCTTAAAGAT        | 2697 |
| 2698 | TCCGACGAAGAAGAGAACGTC                                     | 2718 |
|      | ...   .                                                   |      |
| 2698 | AGTGATGAAGAAGAGAACGTC                                     | 2718 |

## Figura 7

```

1 atggagtcctctgccaaagagaaagatggaccctgataatcctgacgagggcccttcctcc 60
1 M E S S A K R K M D P D N P D E G P S S 20

61 aagggtgccacggccccgagacacccgtgaccaaggccacgacgttcctgcagactatgttg 120
21 K V P R P E T P V T K A T T F L Q T M L 40

121 aggaaggaggttaacagtcagctgagctctgggagacccgctgtttccagagttggccgaa 180
41 R K E V N S Q L S L G D P L F P E L A E 60

181 gaatccctcaaaaacttttgaacaagtgaccgaggattgcaacgagaacccccgagaaagat 240
61 E S L K T F E Q V T E D C N E N P E K D 80

241 gtcctggcagaactcgtcaaacagattaagggttcgagtgacatggtgcggcatagaatc 300
81 V L A E L V K Q I K V R V D M V R H R I 100

301 aaggagcacatgctgaaaaaatatacccagacggaagagaaattcactggcgcctttaat 360
101 K E H M L K K Y T Q T E E K F T G A F N 120

361 atgatgggaggatgtttgcagaatgccttagatatcttagataaggttcatgagcctttc 420
121 M M G G C L Q N A L D I L D K V H E P F 140

421 gaggagatgaagtgtattgggctaactatgcagagcatgtatgagaactacattgtacct 480
141 E E M K C I G L T M Q S M Y E N Y I V P 160

481 gaggataagcgggagatgtggatggcttgtattaaggagctgcatgatgtgagcaagggc 540
161 E D K R E M W M A C I K E L H D V S K G 180

541 gccgctaacaagttgggggggtgcactgcaggctaaggccccgtgctaaaaaggatgaactt 600
181 A A N K L G G A L Q A K A R A K K D E L 200

601 aggagaaagatgatgtatatgtgctacaggaatatagagttcctttaccaagaactcagcc 660
201 R R K M M Y M C Y R N I E F F T K N S A 220

661 ttccctaagaccaccaatggetgcagtcaggccatggcggcactgcagaacttgcctcag 720
221 F P K T T N G C S Q A M A A L Q N L P Q 240

721 tgctcccctgatgagattatggcttatgccagaaaaatatttaagattttggatgaggag 780
241 C S P D E I M A Y A Q K I F K I L D E E 260

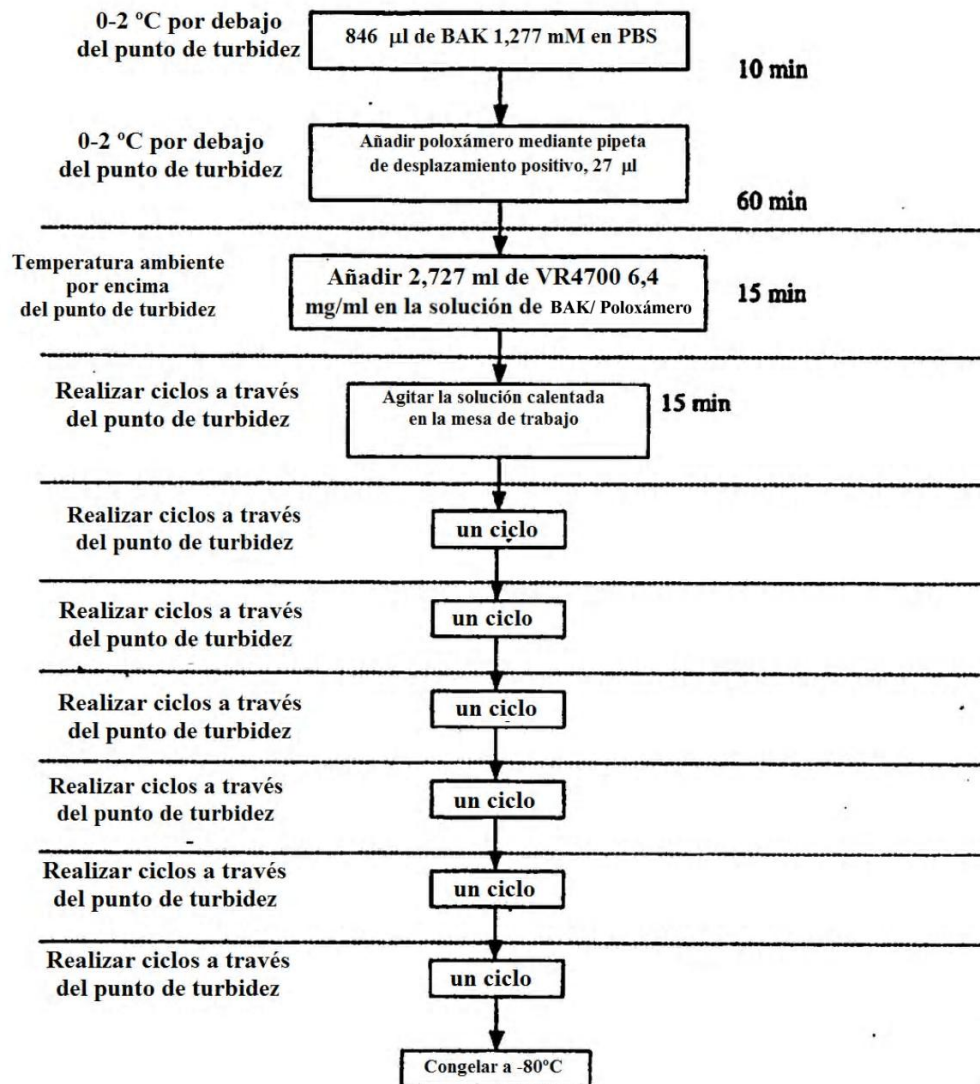
781 agagacaagggtgctcacgcacattgatcacatatatttatggatatcctcactacatgtgtg 840
261 R D K V L T H I D H I F M D I L T T C V 280

841 gaaacaatgtgtaatgagtacaagggtcactagtgacgcttgatgatgaccatgtacggg 900
281 E T M C N E Y K V T S D A C M M T M Y G 300

```

## Figura 7 continuación

901 ggcattctctctcttaagtgagttctgtcgggtgctgtgctgctatgtcttagaggagact 960  
 301 G I S L L S E F C R V L C C Y V L E E T 320  
  
 961 agtgtgatgctggccaagcggcctctgataaccaagcctgaggttatcagtgtaatgaag 1020  
 321 S V M L A K R P L I T K P E V I S V M K 340  
  
 1021 cgccgcattgaggagatctgcatgaaggctcttgcccagtagcattctgggggcccgatcct 1080  
 341 R R I E E I C M K V F A Q Y I L G A D P 360  
  
 1081 ctgagagtctgctctcctagtgtggatgacctacgggccatcgccgaggagtcagatgag 1140  
 361 L R V C S P S V D D L R A I A E E S D E 380  
  
 1141 gaagaggctattgtagcctacactttggccaccgctggtgtcagctcctctgattctctg 1200  
 381 E E A I V A Y T L A T A G V S S S D S L 400  
  
  
 1201 gtgtcacccccagagtcacctgtacccgcgactatccctctgtcctcagtaattgtggct 1260  
 401 V S P P E S P V P A T I P L S S V I V A 420  
  
 1261 gagaacagtgatcaggaagaaagtgagcagagtgatgaggaagaggaggagggtgctcag 1320  
 421 E N S D Q E E S E Q S D E E E E E G A Q 440  
  
 1321 gaggagcgggaggacactgtgtctgtcaagtctgagccagtgtctgagatagaggaagtt 1380  
 441 E E R E D T V S V K S E P V S E I E E V 460  
  
 1381 gccccagaggaagaggaggatggtgctgaggaacccaccgcctctggaggcaagagcacc 1440  
 461 A P E E E E D G A E E P T A S G G K S T 480  
  
 1441 caccctatggtgactagaagcaaggctgaccag 1473  
 481 H P M V T R S K A D Q 491



**FIG. 8**

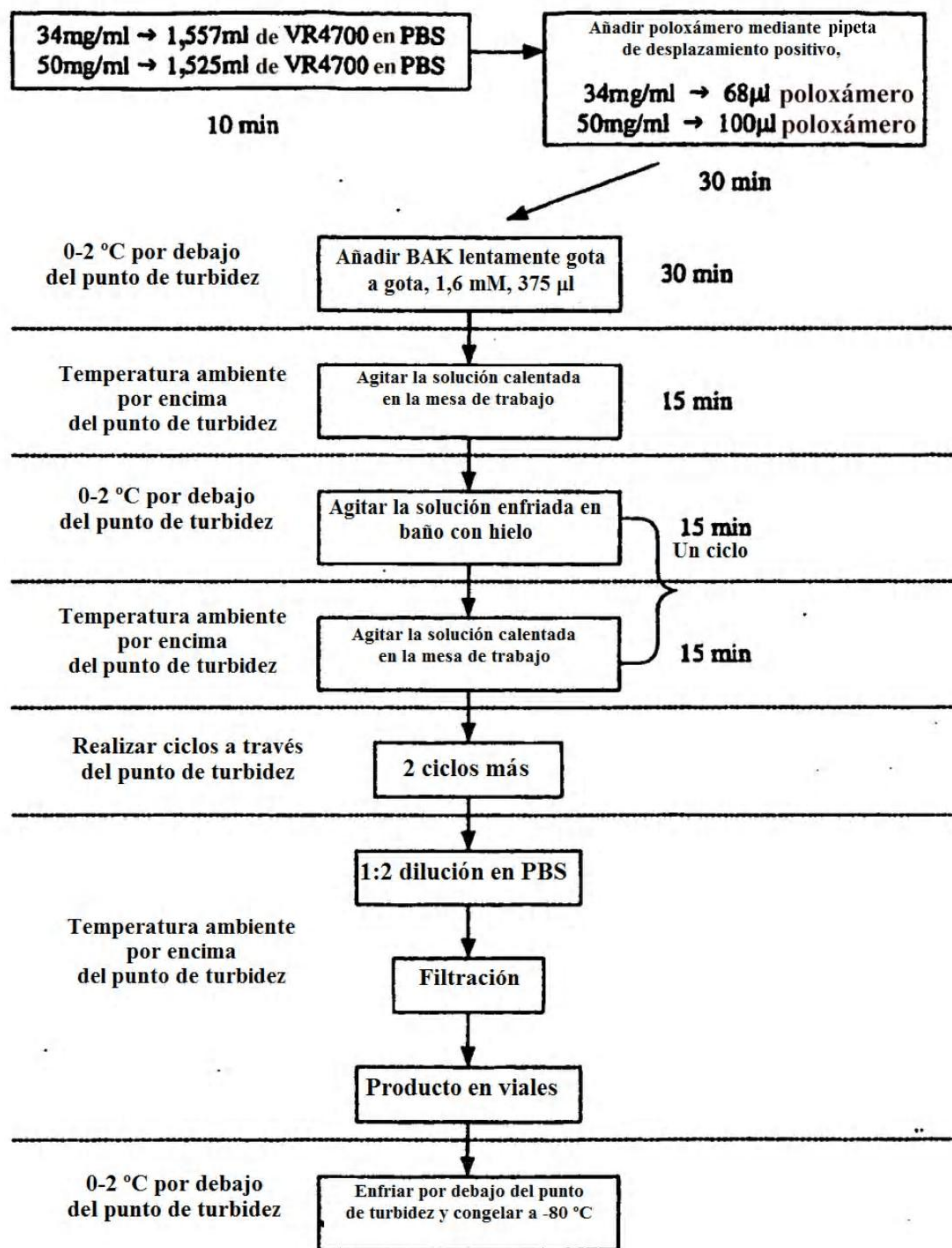
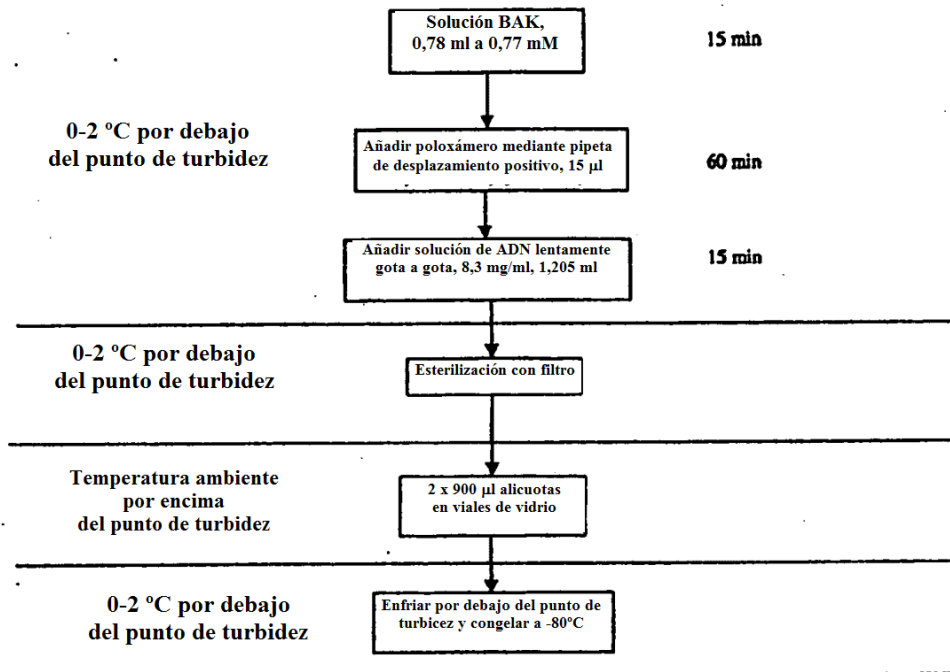


FIG. 9



**FIG. 10**