

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 022**

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/38 (2006.01)

C12N 15/36 (2006.01)

C12N 15/17 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2004** **E 04768811 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.03.2014** **EP 1685251**

54 Título: **Construcciones de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

10.10.2003 US 509936 P

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

24.04.2014

73 Titular/es:

POWDERJECT VACCINES, INC. (100.0%)
235 East 42nd Street
New York, NY 10017-5755, US

72 Inventor/es:

FULLER, JAMES

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 457 022 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

Construcciones de ácidos nucleicos

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere a los campos de la biología molecular en la inmunología y, en general, a reactivos útiles en técnicas de inmunización de ácidos nucleicos. Más específicamente, la invención se refiere a construcciones de ácidos nucleicos para la expresión de polipéptidos antigénicos, y a estrategias de inmunización de ácidos nucleicos usando dichos reactivos.

Antecedentes de la invención

- 10 La terapia génica y la inmunización de ácidos nucleicos son enfoques prometedores para el tratamiento y prevención de enfermedad tanto adquirida como heredada. Estas técnicas permiten la transferencia de un ácido nucleico deseado a un sujeto con expresión *in vivo* posterior. La transferencia puede conseguirse transfectando las células o los tejidos del sujeto *ex vivo* y volviendo a introducir el material transformado en el huésped. Como alternativa, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* directamente al receptor.

- 15 Cada una de estas técnicas requiere expresión eficaz del ácido nucleico en la célula transfectada, para proporcionar una cantidad suficiente del producto génico terapéutico o antigénico. Se conocen varios factores que afectan a los niveles de expresión obtenidos, incluyendo eficacia de transfección, y la eficacia con la que el gen o secuencia de interés se transcribe y se traduce el ARNm.

- 20 Se han descrito un número de sistemas de expresión en la técnica, cada uno de los cuales típicamente consiste en un vector que contiene un gen o secuencia de nucleótidos de interés unido operativamente con secuencias de control de la expresión. Estas secuencias de control incluyen secuencias promotoras de la transcripción y secuencias de inicio y terminación de la transcripción. Los promotores habitualmente usados para sistemas de expresión de células de mamífero incluyen el promotor temprano de SV40, un promotor de citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de CMV (Chapman y col (1991) Nucl. Acids Res. 19:3979-3986), el promotor de repetición terminal larga (LTR) de virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP) y el promotor de virus del herpes simple (VHS), entre otros. También se usan habitualmente promotores no virales, tales como un promotor derivado del gen de metalotioneína murina.

- 30 Los sistemas de expresión con frecuencia incluyen elementos moduladores de la transcripción, denominados "potenciadores". Los potenciadores se definen en general como un agente de acción en cis, que cuando está unido operativamente con una secuencia génica/promotora, aumentará la transcripción de esa secuencia génica. Los potenciadores pueden actuar desde posiciones que están mucho más lejos de una secuencia de interés que otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores); y pueden actuar cuando se sitúan en cualquiera de las orientaciones relativas a la secuencia de interés (Banerji y col. (1981) Cell 27:299-308, de Villeirs y col. (1981) Nucl. Acids Res. 9: 6251-6264). Se han identificado potenciadores de varias fuentes virales incluyendo virus del poliovirus, virus BK, citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus de simio 40 (SV40), virus del sarcoma de Moloney, virus del papiloma bovino y virus del sarcoma de Rous (de Villeirs y col mencionado anteriormente, Rosenthal y col. (1983), Science 222:749-755, Hearing y col. (1983) Cell 33:695-703, Weeks y col. (1983) Mol. Cell. Biol. 3:1222-1234, Levinson y col. (1982) Nature 295: 568-572, y Luciw y col. (1983) Cell 33: 705-716).

- 40 Un número de sistemas de expresión para inmunización de ácidos nucleicos y terapia génica usan el promotor temprano inmediato de hCMV. Véase, por ejemplo las Patentes de Estados Unidos N ° 5.168.062 y 5.385.839 de Stinski, y la memoria descriptiva de la Patente EP 0323997 B1. Los vectores de expresión que usan el promotor temprano inmediato del hCMV incluyen, por ejemplo, pWRG7128 (Roy y col, Vaccine 19, 764-778, 2001), y pBC12/CMV y pJW4303 que se mencionan en el documento WO 95/20660. Chapman y col (1991) presentan niveles reducidos de expresión del promotor temprano inmediato del hCMV en ausencia el intrón A de hCMV. Los documentos WO 0231137 y WO 03011334 describen construcciones de ácido nucleico adecuadas para su uso en inmunización de ácidos nucleicos.

Sumario de la invención

- 50 Se ha desarrollado una construcción de ácido nucleico usando secuencias de expresión/promotoras virales manipuladas, que proporcionan expresión potenciada de secuencias codificantes heterólogas en células hospedadoras. La construcción es adecuada para expresión eficaz de genes que codifican antígenos, y pueden usarse por lo tanto en inmunización de ácidos nucleicos. En particular, la construcción puede proporcionarse en partículas vehículo, para su uso en inmunización de ácidos nucleicos mediada por partículas.

En consecuencia, la presente invención proporciona:

1. Una construcción de ácido nucleico que comprende:

- (i) una secuencia promotora quimérica que comprende:

- (a) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV;
 (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV, siendo dicho exón 1 y al menos una parte del exón 2 contiguos; y
 (c) un intrón heterólogo que reemplaza completa o parcialmente el intrón A nativo del gen temprano inmediato principal de hCMV;
- (ii) una secuencia codificante unida operativamente con la secuencia promotora (i) y;
 (iii) una secuencia potenciadora 3' de y unida operativamente con la secuencia codificante (ii); en la que la secuencia potenciadora deriva de una 3'UTR de una secuencia HBsAg, y la secuencia codificante (ii) es heteróloga de la secuencia potenciadora.
2. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 1 que comprende además una secuencia líder no traducida derivada de la secuencia de antígeno preS2 de VHB, secuencia de antígeno e de VHB y secuencia de antígeno gD de VHS de tipo 2, en la que la secuencia líder está unida operativamente con el promotor y la secuencia codificante, y la secuencia codificante es heteróloga de la secuencia líder no traducida.
3. Una construcción de ácido nucleico que comprende:
- (i) una secuencia promotora quimérica que comprende:
- (a) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV;
 (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV, siendo dicho exón 1 y al menos una parte del exón 2 contiguos; y
 (c) un intrón heterólogo que reemplaza completa o parcialmente el intrón A nativo del gen temprano inmediato principal de hCMV;
- (ii) una secuencia codificante en unión operativa con el promotor quimérico;
 (iii) una secuencia líder no traducida que se selecciona de la secuencia del antígeno preS2 de VHB, secuencia de antígeno e de HBV y secuencia de antígeno de VHS de tipo 2gD y que está en unión operativa con el promotor quimérico; y
 (iv) una secuencia potenciadora que deriva de una región no traducida 3' (UTR) de una secuencia de HBsAg, que está en unión operativa con el promotor quimérico y que está corriente abajo de la secuencia codificante.
4. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes en la que:
- (i) la secuencia promotora temprana inmediata de hCMV (a) comprende SEC ID N° 1, una variante funcional de la misma con al menos 80 % de identidad o un fragmento funcional de una de las dos; y/o
 (ii) la secuencia del exón (b) comprende SEC ID N° 2, una variante funcional de la misma con al menos 80 % de identidad o un fragmento funcional de una de las dos.
5. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes en la que el intrón heterólogo (c) comprende una secuencia seleccionada de la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata, la secuencia del intrón A del gen de queratina de pollo, la secuencia del intrón A del gen de actina cardiaca de pollo, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una secuencia de dicho intrón A y un fragmento funcional de una secuencia de dicho intrón A o de dicha variante funcional de los mismos.
6. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 5 en la que la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata comprende SEC ID N° 3, una variante funcional de la misma con al menos 80 % de identidad, o un fragmento funcional de una de las dos.
7. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes, en la que:
- (i) la secuencia líder no traducida se selecciona de SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de SEC ID N° 5 a 7 o un fragmento funcional de una cualquiera de SEC ID N° 5 a 7 o de dicha variante de los mismos, y/o
 (ii) la secuencia potenciadora se selecciona de SEC ID N° 8, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con SEC ID N° 8 o un fragmento funcional de SEC ID N° de dicha variante de los mismos.
8. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes que comprende:
- (i) una secuencia de poliadenilación; y/o
 (ii) una secuencia que codifica un péptido señal.
9. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 8 en la que:
- (i) la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de un gen seleccionado del gen de β -globina de conejo, gen temprano o tardío del virus del papiloma humano (VPH), el gen de VHS2gB, un gen temprano inmediato de CMV de simio y gen tardío de VHSgD, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de dichas secuencias o un fragmento funcional de una cualquiera de dichas

- secuencias de poliadenilación o dichas variantes funcionales de los mismos; y/o
- (ii) el péptido señal se selecciona de péptido señal de activador del plasminógeno tisular humano (hTPAsp), péptido señal de aprotinina, péptido señal de extensina del tabaco, péptido señal de lisozima de pollo, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de dichas secuencias o un fragmento funcional de cualquiera de dichas secuencias que codifica el péptido señal o dicha variante funcional del mismo.
- 5
10. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 9 en la que la secuencia de poliadenilación se selecciona de SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de SEC ID N° 10 a 13 o un fragmento funcional de uno cualquiera de SEC ID N° 10 a 13 o de dicha variante de los mismos.
- 10
11. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes en la que la secuencia codificante codifica un antígeno.
12. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 11 en la que el antígeno es un antígeno de un patógeno viral, bacteriano, parasitario o fúngico, un antígeno de alergia o un antígeno de cáncer.
- 15
13. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 12 en la que el antígeno viral es un antígeno de VPH, VIH, VHS1, VHS2, virus de la gripe, virus de hepatitis A o virus de hepatitis B.
14. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 13 en la que el antígeno es HBsAg.
15. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 10, en la que la secuencia codificante codifica una subunidad A y/o subunidad B bacteriana que ribosila ADP, un homólogo activo de una o ambas de dichas subunidades en el que cada homólogo tiene al menos 80 % de identidad con dicha subunidad respectiva o un fragmento activo de dicha subunidad o de dicho homólogo activo de las mismas.
- 20
16. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 15 en la que la subunidad bacteriana se selecciona de la subunidad A de la toxina del cólera, subunidad B de la toxina del cólera, subunidad A de toxina lábil por calor de *E. coli*, subunidad B de toxina lábil por calor de *E. coli*, un homólogo activo que tiene al menos 80 % de homología con una cualquiera de dichas subunidades o un fragmento activo de una cualquiera de dichas subunidades o dichos homólogos activos.
- 25
17. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes que es un plásmido de ADN.
18. Partículas revestidas, adecuadas para suministro desde un dispositivo de suministro mediado por partículas, comprendiendo dichas partículas partículas vehículo revestidas con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos precedentes.
- 30
19. Partículas revestidas de acuerdo con el punto 18 en las que las partículas vehículo son de oro o wolframio.
20. Un receptáculo de dosificación para un dispositivo de suministro mediado por partículas que comprende partículas revestidas de acuerdo con el punto 18 o 19.
- 35
21. Un dispositivo de administración mediado por partículas cargado con partículas revestidas de acuerdo con el punto 18 o 19.
22. Un dispositivo de administración mediado por partículas de acuerdo con el punto 21 que es una jeringa sin aguja.
- 40
23. Una preparación farmacéutica que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
24. Una vacuna que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11 a 14.
25. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende además una construcción adyuvante de acuerdo con el punto 15 o 16.
- 45
26. Un procedimiento *in vitro* para obtener expresión en células de mamífero de un polipéptido de interés, comprendiendo dicho procedimiento transferir a dichas células una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 17 o partículas revestidas de acuerdo con el punto 18 o 19.
27. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 11 a 14 para su uso en inmunización.
- 50
28. Un ácido nucleico de acuerdo con el punto 27, en el que la inmunización es contra infección por un patógeno,

alergia o cáncer.

29. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con el punto 27 o 28 en la que el administración es para ser por inyección, administración de partículas transdérmico, inhalación, vía tópica, vía oral, vía intranasal o vía transmucosa.

- 5 Estos y otros objetos, aspectos, realizaciones y ventajas de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos habituales en la materia a la vista de la divulgación dla presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 ilustra los niveles de expresión del antígeno de superficie de virus de hepatitis B (HBsAg) obtenido usando diversos vectores de expresión plasmídicos.
- 10 La Figura 2 muestra el efecto de la inclusión de intrones en la expresión de HBsAg en células SCC15 y de beta-gal en células B16 (media de tres experimentos).
- La Figura 3 muestra el efecto del intrón A de insulina de rata y 3'UTR de VHB en la expresión de beta-gal en células SCC15 (media de tres experimentos).
- 15 La Figura 4 muestra el efecto del intrón A de insulina de rata y 3'UTR de VHB en la expresión de gD de VHS en células SCC15 (media de tres experimentos).
- La Figura 5 muestra el efecto del intrón A de insulina de rata y 3'UTR de VHB en la expresión de SEAP en células SCC15 y B16 (tres repeticiones por línea celular).
- La Figura 6 muestra la capacidad de los péptidos señal heterólogos para dirigir la secreción de SEAP o fragmento hFc en células B16.
- 20 La Figura 7 ilustra niveles de anticuerpos detectados en los sueros de ratones inmunizados con ácidos nucleicos que codifican antígenos contenidos en una diversidad de vectores de expresión plasmídicos.
- La Figura 8 es una representación en diagrama del vector de expresión pJV.
- La Figura 9 es una representación en diagrama de pJV7389.
- La Figura 10 es una representación en diagrama de pJV7400.
- 25 La Figura 11 es una representación en diagrama de pJV7468.
- La Figura 12 es una representación en diagrama de pJV7563.
- La Figura 13 expone la composición básica para pJV7563.

Breve descripción de las secuencias

- SEC ID N° 1 es una secuencia de promotor temprano inmediato de hCMV (GenBank N° M60321, X17403)
- 30 SEC ID N° 2 es una secuencia de los exones 1 y 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV (GenBank N° M60321, X17403)
- SEC ID N° 3 es la secuencia del intrón A de insulina de rata (GenBank N° J00748)
- SEC ID N° 4 es la secuencia de un promotor quimérico de acuerdo con la presente invención
- SEC ID N° 5 es una secuencia líder de la secuencia de 5'UTR del antígeno preS2 de VHB (GenBank N° M54923)
- 35 SEC ID N° 6 es una secuencia líder de la secuencia 5'UTR de gD del VHS de tipo 2 (GenBank N° Z86099)
- SEC ID N° 7 es una secuencia líder de la secuencia 5'UTR del antígeno e de VHB (GenBank N° M54923)
- SEC ID N° 8 es la secuencia 3'UTR de enh de VHB (GenBank N° AF143308)
- SEC ID N° 9 es la secuencia 3'UTR del gen temprano inmediato de simio (GenBank N° M16019)
- SEC ID N° 10 es la secuencia de poli A de β globina de conejo (GenBank N° K03256)
- 40 SEC ID N° 11 es la secuencia de poli A del gen temprano inmediato de sCMV (GenBank N° M16019)
- SEC ID N° 12 es la secuencia de poli A del gen gB de VHS2 (GenBank N° Z86099)

SEC ID N° 13 es la secuencia de poli A del gen temprano de VPH16 (GenBank N° K02718)

SEC ID N° 14 es la secuencia del vector de expresión PJV

SEC ID N° 15 es el cebador de PCR JF93

SEC ID N° 16 es el cebador de PCR F110

5 SEC ID N° 17 es el cebador de PCR GW1

SEC ID N° 18 es el cebador de PCR JF254

SEC ID N° 19 es el cebador de PCR GW150

SEC ID N° 20 es el cebador de PCR JF255

SEC ID N° 21 es el cebador de PCR DS1

10 SEC ID N° 22 es el cebador de PCR DA1

SEC ID N° 23 es el cebador de PCR JF301

SEC ID N° 24 es el cebador de PCR JF302

SEC ID N° 25 es el cebador de PCR JF84

SEC ID N° 26 es el cebador de PCR JF225

15 SEC ID N° 27 es el cebador de PCR JF335

SEC ID N° 28 es el cebador de PCR JF336

SEC ID N° 29 es el cebador de PCR JF357

SEC ID N° 30 es el cebador de PCR JF365

SEC ID N° 31 es el cebador de PCR JF393

20 SEC ID N° 32 es el cebador de PCR JF406

SEC ID N° 33 es el cebador de PCR JF256

SEC ID N° 34 es el cebador de PCR JF257

SEC ID N° 35 es el cebador de PCR JF320

SEC ID N° 36 es el cebador de PCR JF321

25 SEC ID N° 37 es el cebador de PCR JF386

SEC ID N° 38 es el cebador de PCR FcAS

SEC ID N° 39 es el oligonucleótido JF354

SEC ID N° 40 es el cebador de PCR JF355

SEC ID N° 41 es el cebador de PCR JF356

30 SEC ID N° 42 es el oligonucleótido JF348

SEC ID N° 43 es el cebador de PCR JF349

SEC ID N° 44 es el cebador de PCR JF350

SEC ID N° 45 es el oligonucleótido JF351

SEC ID N° 46 es el cebador de PCR JF352

35 SEC ID N° 47 es el cebador de PCR JF353

SEC ID N° 48 es el cebador de PCR JF430

SEC ID N° 49 es el cebador de PCR JF442

SEC ID N° 50 es el cebador de PCR JF421

SEC ID N° 51 es el cebador de PCR JF444

SEC ID N° 52 es la secuencia promotora del virus de la seudorrabia (PRV)

SEC ID N° 53 es la secuencia del promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV).

5 **Descripción detallada**

Antes de describir la presente invención en detalle, debe entenderse que la presente invención no está limitada a moléculas o parámetros de procedimiento ejemplificados particularmente ya que tales pueden, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria es para el fin de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no debe entenderse que sea limitante. Además, la práctica de la presente invención empleará, a no ser que se indique de otro modo, procedimientos convencionales de virología, microbiología, biología molecular, técnicas de ADN recombinante e inmunología todos los cuales están dentro de la experiencia habitual de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, y col, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2ª edición, 1989); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I, y 1 (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); y Fundamental Virology, 2ª Edición, vol. I & II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.).

Debe hacerse notar que, como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un” y “el” incluyen referentes plurales a no ser que el contenido claramente dicte otra cosa.

A. Definiciones

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. Aunque pueden usarse varios procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica de la presente invención, los materiales y procedimientos preferidos se describen en la presente memoria.

Al describir la presente invención, se emplearán los siguientes términos, y se pretende que se definan como se indica a continuación.

La expresión “inmunización de ácido nucleico” se usa en la presente memoria para referirse a la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos seleccionados en una célula huésped para la expresión *in vivo* del antígeno o los antígenos. La molécula de ácido nucleico puede introducirse directamente en el sujeto receptor, tal como por inyección intramuscular o intradérmica convencional; suministro de partículas transdérmicas; inhalación; por vía tópica, o por modos de administración oral, intranasal o mucoso. La molécula como alternativa puede introducirse *ex vivo* en células que se han retirado de un sujeto. En este último caso, las células que contienen la molécula de ácido nucleico de interés se vuelven a introducir en el sujeto de modo que pueda montarse una respuesta inmunitaria contra el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico usadas en dicha inmunización generalmente se denominan en la presente memoria “vacunas de ácido nucleico”.

Se entiende que el término “adyuvante” es un material o composición capaz de alterar, mejorar, dirigir, redirigir, potenciar o iniciar de forma específica o no específica una respuesta inmunitaria específica de antígeno. Por lo tanto, la coadministración de un adyuvante con un antígeno puede dar como resultado que sea necesaria una dosis menor o menos dosis del antígeno para conseguir una respuesta inmunitaria deseada en el sujeto al que se administra el antígeno, o la co-administración puede dar como resultado una respuesta inmunitaria cualitativa y/o cuantitativamente diferente en el sujeto. En particular, la administración del adyuvante puede dar como resultado una respuesta inmunitaria potenciada tal como una de mayor magnitud y/o duración. La eficacia de un adyuvante puede determinarse administrando el adyuvante con una composición de vacuna en paralelo con una composición de vacuna solamente a animales y comparando la inmunidad mediada por anticuerpos y/o células en los dos grupos usando ensayos convencionales tales como radioinmunoensayos, ELISA y ensayos de CTL.

Por “vehículo nuclear” se entiende un vehículo que se reviste con un ácido nucleico ajeno (por ejemplo, ADN, ARN) para proporcionar un tamaño de partícula definido así como densidad suficientemente alta para conseguir el impulso necesario para penetración de la membrana celular, de modo que pueda suministrarse la molécula ajena usando técnicas mediadas por partículas (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos N° 5.100.792). Los vehículos nucleares típicamente incluyen materiales tales como wolframio, oro, platino, ferrita, poliestireno y látex. Véase, por ejemplo, Particle Bombardment Technology for Gene Transfer, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, Nueva York, NY páginas 10-11.

Por “jeringa sin aguja” se entiende un instrumento que suministra una composición en partículas por vía transdérmica sin la ayuda de una aguja convencional para atravesar la piel. Se analizan en la presente memoria agujas sin jeringas para su uso con la presente invención.

Se entiende que el término suministro “transdérmico” es administración intradérmica (por ejemplo, en la dermis o epidermis), transdérmica (por ejemplo, “percutánea”) y transmucosa, es decir, suministro por pase de un agente en o a través de la piel o tejido mucoso. Véase, por ejemplo, *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft y Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson y Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus y Berner (eds.), CRC Press, (1987). Por lo tanto, el término abarca suministro de una jeringa sin aguja como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.630.796, así como suministro mediado por partículas como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 5.865.796.

Un “polipéptido” se usa en su sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos subunitarios, análogos de aminoácidos u otros peptidomiméticos. La subunidad puede estar unida por enlaces peptídicos o por otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Como se usa en la presente memoria, el término “aminoácido” se refiere a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos; incluyendo glicina y los isómeros ópticos tanto D como L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos se denomina habitualmente un oligopéptido si la cadena peptídica es corta. Si la cadena peptídica es larga, el péptido se denomina típicamente un polipéptido o una proteína.

Un “antígeno” se refiere a cualquier agente, generalmente una macromolécula, que puede inducir una respuesta inmunológica en un individuo. El término puede usarse para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Como se usa en la presente memoria, “antígeno” se usa generalmente para referirse a una molécula proteica o parte de la misma que contiene uno o más epítomos. Para el fin de la presente invención, los antígenos pueden obtenerse o derivarse de cualquier fuente apropiada. Además, para los fines de la presente invención, un “antígeno” incluye una proteína que tiene modificaciones, tales como delecciones, adiciones y sustituciones (generalmente de naturaleza conservativa) de la secuencia nativa, siempre que la proteína mantenga suficiente inmunogenicidad. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo mediante mutagénesis dirigida, o pueden ser accidentales, tal como mediante mutaciones de huéspedes que producen los antígenos.

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

Las expresiones “molécula de ácido nucleico” y “polinucleótido” se usan de forma intercambiable en la presente memoria y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, bien desoxirribonucleótidos o bien ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional, y pueden realizar cualquier función, conocida o desconocida. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento génico, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de transferencia, ARN ribosómico, ribozimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácido nucleico y cebadores.

Un polinucleótido está compuesto típicamente de una secuencia específica de cuatro bases nucleotídicas: adenina (A); citosina (C); guanina (G) y timina (T) (uracilo (U) en lugar de timina (T) cuando el polinucleótido sea ARN). Por lo tanto, la expresión secuencia de ácido nucleico es la representación alfabética de una molécula polinucleotídica. Esta representación alfabética puede introducirse en bases de datos en un ordenador que tenga una unidad de procesamiento central y usarse para aplicaciones bioinformáticas tales como genómica funcional y búsqueda de homología.

Un “vector” es capaz de transferir secuencias de ácido nucleico a células diana (por ejemplo, vectores virales, vectores no virales, vehículos de partículas y liposomas). Típicamente, “construcción de vector”, “vector de expresión” y “vector de transferencia génica” significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias génicas a células diana. Por lo tanto, la expresión incluye vehículos de clonación y expresión, así como vectores virales. Un “plásmido” es un vector en forma de un elemento genético extracromosómico.

Una secuencia de ácido nucleico que “codifica” un antígeno seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso del ARNm) en un polipéptido *in vivo* cuando se sitúa bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante se determinan por un codón de partida en el extremo 5' (amino) terminal y un codón de parada de traducción en el extremo 3' (carboxilo) terminal. Para los fines de la invención, dichas secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero sin limitación, ADNc de ARNm viral, procariota o eucariota, secuencias genómicas de ADN o ARN viral o procariota, e incluso secuencias de ADN sintético. Una secuencia de terminación de la transcripción puede estar localizada 3' de la secuencia codificante.

Un “promotor” es una secuencia de nucleótidos que inicia y regula la transcripción de un polinucleótido que codifica polipéptidos. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (en los que la expresión de una secuencia

polinucleotídica unida operativamente con el promotor se induce por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (en los que la expresión de una secuencia polinucleotídica unida operativamente con el promotor está reprimida por un analito, cofactor, proteína reguladora, etc.), y promotores constitutivos. Se entiende que la expresión "promotor" o "elemento de control" incluye regiones promotoras de longitud completa y segmentos funcionales (por ejemplo, que controlan la transcripción o traducción) de estas regiones.

"Unido operativamente" se refiere a un ordenamiento de elementos en el que los componentes descritos de este modo están configurados para realizar su función habitual. Por lo tanto, un promotor dado unido operativamente con una secuencia de ácido nucleico es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia cuando están presentes las enzimas apropiadas. No es necesario que el promotor sea contiguo a la secuencia, siempre que actúe para dirigir la expresión de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias no traducidas pero transcritas intermedias entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico y la secuencia promotora aún puede considerarse "unida operativamente" con la secuencia codificante.

"Recombinante" se usa en la presente memoria para describir una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) de origen genómico, de ADNc, semisintético o sintético que, según su origen o manipulación no está asociada con todo o una parte del polinucleótido con el que está asociada en la naturaleza y/o está unida con un polinucleótido distinto de con el que está unida en la naturaleza. Dos secuencias de ácido nucleico que están contenidas dentro de una única molécula de ácido nucleico recombinante son "heterólogas" entre sí cuando no están normalmente asociadas entre sí en la naturaleza.

Se hace referencia en la presente memoria a homólogos de polinucleótidos. Típicamente un polinucleótido que es homólogo de otro polinucleótido es al menos 70 % homólogo del polinucleótido, preferentemente al menos 80 o 90 % y más preferentemente al menos 95 %, 97 % o 99 % homólogo del mismo. Se conocen bien en la técnica procedimientos para medir la homología y se entenderá por los expertos en la materia que en el presente contexto la homología se calcula basándose en la identidad de los ácidos nucleicos. Dicha homología puede existir sobre una región de al menos 15, preferentemente al menos 30, por ejemplo al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos.

Se conocen en la técnica procedimientos para medir la homología o identidad de polinucleótidos. Por ejemplo, el Paquete UWGCG proporciona el programa BESTFIT que puede usarse para calcular la homología (por ejemplo, usado en sus ajustes por defecto) (Devereux y col (1984) *Nucleic Acids Research* 12, P387-395).

Los algoritmos PILEUP y BLAST también pueden usarse para calcular la homología o alinear secuencias (típicamente en sus ajustes por defecto), por ejemplo como se describe en Altschul SF (1993) *J Mol Evol* 36:290-300; Altschul, S, F y col (1990) *J Mol Biol.* 215:403-10.

Está disponible públicamente software para realizar análisis de BLAST a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que coinciden o satisfacen una puntuación T de umbral de valor positivo con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul y col, mencionado anteriormente). Estos aciertos de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las extensiones para los aciertos de palabra en cada dirección se detienen cuando: la puntuación de alineamiento acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa, o se alcanza el extremo de una de las secuencias. Los parámetros de algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:10915-10919), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4 y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma ($P(N)$), que proporciona un indicio de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos sucedería al azar. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la menor probabilidad de suma al comparar la primera secuencia con la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferentemente menor de aproximadamente 0,1, más preferentemente menor de aproximadamente 0,01, y más preferentemente menor de aproximadamente 0,001.

Los homólogos típicamente hibridan con el polinucleótido relevante a un nivel significativamente por encima del fondo. El nivel de señal generado por la interacción entre el homólogo y el polinucleótido es típicamente al menos 10 veces, preferentemente al menos 100 veces, tan intenso como la "hibridación de fondo". La intensidad de interacción puede medirse, por ejemplo, radiomarcando la sonda, por ejemplo, con ^{32}P . Se consigue típicamente hibridación selectiva usando condiciones de rigurosidad media a alta (por ejemplo, cloruro sódico 0,03 M y citrato sódico 0,003 M de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C).

Las condiciones de hibridación rigurosas pueden incluir formamida al 50 %, solución de Denhardt 5x, SSC 5x, SDS 0,1 % y ADN de esperma de salmón desnaturalizado 100 µg/ml y las condiciones de lavado pueden incluir SSC 2x, SDS 0,1 % a 37 °C seguido de SSC 1x, SDS 0,1 % a 68 °C. La definición de las condiciones de hibridación apropiadas está dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., mencionado anteriormente.

El homólogo puede diferir de una secuencia en el polinucleótido relevante en menos de 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una de las cuales puede ser una sustitución, delección o inserción). Estas mutaciones pueden medirse sobre una región al menos 30, por ejemplo al menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo. Cuando un polinucleótido codifica un polipéptido, las sustituciones preferentemente crean cambios "conservativos" en el aminoácido codificado. Estas se definen de acuerdo con la siguiente tabla. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí en cambios conservativos.

ALIFÁTICOS	No polar	G A P
		I L V
	Polar no cargado	C S T M
		N Q
	Polar cargado	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Los términos "individuo" y "sujeto" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para hacer referencia a cualquier miembro del subfilo cordados, incluyendo, sin limitación, seres humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otras especies de simios y monos; animales de granja tales como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; animales domésticos tales como perros y gatos, animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y cobayas; aves, incluyendo aves domésticas, silvestres y de caza tales como pollos, pavos y otras aves gallináceas, patos, gansos, y similares. Los términos no indican una edad particular. Por lo tanto, se pretende que se abarquen tanto individuos adultos como neonatos. Se pretende que los procedimientos descritos en la presente memoria se usen en cualquiera de las especies vertebradas anteriores, puesto que los sistemas inmunitarios de todos estos vertebrados funcionan de forma similar.

B. Visión general

La invención en su sentido más amplio es como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención se refiere a construcciones de ácido nucleico que permiten expresión eficaz de secuencias codificantes heterólogas, y en particular genes codificantes de antígenos, en células huésped. La divulgación proporciona construcciones de ácido nucleico que comprenden, o en algunas realizaciones consisten esencialmente en una secuencia promotora quimérica y un sitio de clonación, de modo que cuando se inserte una secuencia codificante en el sitio de clonación, la secuencia codificante está en unión operativa con el promotor quimérico.

El promotor quimérico comprende, o consiste esencialmente en:

- (a) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV;
- (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV; y
- (c) un intrón heterólogo proporcionado en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal de hCMV.

La secuencia promotora temprana inmediata de hCMV (a) puede comprender:

- (i) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV nativa;
- (ii) una variante homóloga funcional de la misma; o
- (iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

En general, la secuencia (a) comprende de aproximadamente 100 a 600, preferentemente de 200 a 600, por ejemplo 400 a 600 nucleótidos. Típicamente, la secuencia (a) comprende las secuencias presentes en (i) que se unen con factores de transcripción o la ARN polimerasa, o, en lugar de cualquiera de estas secuencias, homólogos de estas secuencias capaces de unirse con los mismos factores de transcripción y ARN polimerasa. Típicamente dichas secuencias o sus homólogos están presentes en la secuencia promotora (a) en el mismo orden y/o sustancialmente el mismo espaciamiento relativo que en (i).

Generalmente, (i) comprende al menos de los nucleótidos -100 a -1, típicamente -150 a -1, por ejemplo -500 a -1 o -600 a -1, del gen temprano inmediato principal de hCMV. La secuencia (i) típicamente comprende la secuencia promotora de núcleo de hCMV y también puede incluir uno o más elementos potenciadores presentes en el promotor temprano inmediato de hCMV. Por ejemplo, (i) puede comprender de los nucleótidos -118 a -1, o -524 a -1 como en el documento US 6218140, o de los nucleótidos -62 a 1 o -465 a -1 como en el documento US 538 5839.

Generalmente (i) incluye una caja TATA o caja CAAT habitualmente hallada en secuencias promotoras. Preferentemente la secuencia incluye una o más de las secuencias repetidas en el promotor temprano inmediato de hCMV.

En una realización preferida, la secuencia promotora temprana inmediata de hCMV nativa comprende SEC ID N° 1.

Puede obtenerse una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV usando procedimientos conocidos. Puede aislarse un promotor temprano inmediato de hCMV nativo directamente de una muestra del virus, usando técnicas convencionales. El documento US 5385839, por ejemplo, describe la clonación de una región promotora de hCMV. La secuencia de un promotor temprano inmediato de hCMV está disponible en Genbank N° M60321 (cepa Towne de hCMV) y X17403 (cepa Ad169 de hCMV). Una secuencia nativa podría por lo tanto aislarse por PCR usando cebadores de PCR basados en la secuencia conocida. Véase, por ejemplo Sambrook y col, mencionado anteriormente, para una descripción de técnicas usadas para obtener y aislar ADN. Una secuencia promotora de hCMV adecuada también podría aislarse de un vector plasmídico existente. También puede producirse de forma sintética secuencias promotoras.

Una variante (ii) o fragmento (iii) funcional generalmente es uno que conserva y/o complementa la actividad del promotor nativo (i). Típicamente esta actividad es la capacidad para provocar (incluyendo iniciar y regular) la transcripción de un polinucleótido unido operativamente, en particular el gen temprano inmediato principal de hCMV. En una realización, la variante o fragmento sería capaz de complementar la actividad del promotor nativo en un virus hCMV, por ejemplo permitiendo que el virus conserve la capacidad para infectar y/o replicarse en células.

Una variante (ii) o fragmento (iii) homólogo puede ensayarse con respecto a la capacidad para conservar y/o complementar la actividad de (i). Por ejemplo, puede ensayarse una variante o fragmento con respecto a su capacidad para restaurar la funcionalidad (tal como infección y/o capacidad de replicación) a hCMV mutante en el que el promotor temprano inmediato de hCMV nativo es defectuoso.

Puede ensayarse una variante (ii) o fragmento (iii) homólogo con respecto a su utilidad usando el ensayo de expresión comparativa posterior. La secuencia promotora de ensayo sustituye en el vector base al promotor temprano inmediato de hCMV nativo. Típicamente, una variante o fragmento funcional permite al menos 50 %, por ejemplo, 60, 70, 80, 90 % o más de la expresión proporcionada usando el vector base. Generalmente se proporciona expresión en al menos uno pero preferentemente dos tipos celulares de referencia. Típicamente, las células de referencia son células de mamífero HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS.

Adicionalmente, o como alternativa, la secuencia promotora puede ensayarse en el ensayo de inmunogenicidad comparativa posterior. La secuencia promotora de ensayo sustituye en el vector base al promotor temprano inmediato de hCMV nativo. Una secuencia promotora funcional proporciona títulos de anticuerpo que son al menos tan altos como o mayores que los conseguidos por el vector base con al menos uno, preferentemente dos antígenos. Preferentemente los títulos de anticuerpos son al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % mayores que con el vector base. Son antígenos preferidos los antígenos HBsAg, gD de VHS 2 y M2 de la gripe. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de la secuencia promotora nativa (i) es uno que permita los mayores títulos de anticuerpo conseguidos por la secuencia nativa.

Como se ha mencionado anteriormente, la construcción comprende la secuencia de exón (b) que comprende una secuencia derivada del exón 1 y exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV. Los exones son secuencias codificantes que en la naturaleza generalmente están separadas por intrones. En el gen temprano inmediato principal de hCMV nativo, los exones 1 y 2 están habitualmente separados por el intrón nativo A. En la presente construcción quimérica la secuencia del exón 2 se sitúa 3' de la secuencia del exón 1, sin secuencia de intrón intermedia, de modo que las secuencias del exón 1 y el exón 2 son contiguas.

La secuencia del exón (b) puede comprender:

- (i) secuencia de exón nativa, típicamente exón 1 y exón 2 (completo o parcial);
- (ii) una variante homóloga de (i) que es funcional; o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia (i) puede comprender de aproximadamente 50 a 100 % de la secuencia del exón 1 del gen temprano inmediato principal de hCMV nativo, por ejemplo, de 60 a 90 % o de 70 a 80 %. Típicamente al menos el 50 % de la secuencia del exón 1 natural está presente, tal como 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más. La secuencia del exón (b) también comprende al menos una parte de la secuencia del exón 2. En la secuencia (i), típicamente están presentes 2 o más bases del exón nativo 2, por ejemplo de 2 a 9, de 2 a 7 o de 3 a 5 bases. Puede estar presente hasta e incluyendo el 100 % de la secuencia del exón 2 natural, por ejemplo del 5 al 95 %, del 20 al 80 % o del 40 al 60 % de la secuencia del exón 2 natural. Típicamente la variante homóloga tiene cualquiera de las longitudes anteriores mencionadas para la secuencia nativa.

Preferentemente (b) comprende SEC ID N ° 2.

Pueden obtenerse secuencias de exón adecuadas (b) usando procedimientos conocidos. Véase, por ejemplo, Sambrook y col., mencionado anteriormente, para una descripción de técnicas usadas para obtener y aislar ADN. La secuencia del gen temprano inmediato principal de hCMV nativo pueden aislarse directamente de una muestra del virus, usando técnicas convencionales (véase, por ejemplo, MacLean, A (1998) "Preparation of VHS-DNA and Production of Infectious Virus" en Herpes Simplex Virus Protocols S. Brown, A Maclean, editores, Humana Press, Totowa, NJ, pp.19-26). La secuencia de un gen temprano inmediato principal de hCMV, incluyendo la localización del exón 1 y el exón 2, está disponible en Genbank N° M60321, X17403. Las secuencias del exón 1 y 2 nativo podrían por lo tanto aislarse cortando la secuencia del gen principal nativo en sitios de restricción apropiados o por PCR usando cebadores de PCR basados en la secuencia conocida. Las secuencias de exón adecuadas podrían aislarse como alternativa de un vector plasmídico existente, tal como pWRG7128. También pueden producirse secuencias de exón de forma sintética, en lugar de clonarse. Pueden construirse fácilmente secuencias variantes por metodologías rutinarias tales como mutagénesis dirigida.

Generalmente la secuencia de exón, cuando esté presente en la construcción de la invención, potenciará la expresión, típicamente provocando potenciación comparable a la secuencia del exón 1 y exón 2 nativo (i) mencionada anteriormente.

La secuencia del exón puede ensayarse con respecto a funcionalidad usando el ensayo de expresión comparativa posterior. La secuencia del exón de ensayo sustituye en el vector base a la secuencia del exón ya presente. Generalmente la secuencia del exón es funcional si la secuencia no anula la expresión sino que aumenta preferentemente la expresión en al menos uno, pero preferentemente dos tipos celulares de referencia en comparación con el vector base. Típicamente las células de referencia son células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS. Preferentemente la expresión aumenta en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 %. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de la secuencia de exón natural (i) es uno que permite al menos 50 % de la mejora de la expresión proporcionada por la secuencia natural.

Adicionalmente, o como alternativa, la secuencia del exón puede ensayarse en el ensayo de inmunogenicidad comparativa posterior. La secuencia del exón de ensayo sustituye en el vector base a la secuencia de exón ya presente. La secuencia de exón funcional proporciona títulos de anticuerpo que son al menos tan altos como o mayores que los conseguidos por el vector base con al menos uno, preferentemente dos antígenos. Preferentemente los títulos de anticuerpo son de al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % mayores que con el vector base. Son antígenos preferidos los antígenos HBsAg, gD de VHS 2 y M2 de la gripe. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga funcional (ii) o un fragmento funcional (iii) de la secuencia de exón natural (i) es uno que permite los títulos de anticuerpo mayores conseguidos por la secuencia natural.

La construcción promotora quimérica comprende el intrón heterólogo (c) en lugar de la región del intrón A nativo del gen temprano inmediato principal de hCMV. Un intrón es una secuencia no codificante que se corta y empalma a partir del ARNhn transcrito de un gen. Un intrón heterólogo es uno que no está presente en la secuencia codificante en la naturaleza.

El intrón heterólogo (c) reemplaza completa o parcialmente, el intrón A nativo del gen temprano inmediato principal de hCMV. Típicamente, el intrón A nativo está ausente.

En general, el intrón heterólogo (c) está 3' de la secuencia del exón (b).

Típicamente, el intrón heterólogo (c) comprende:

- (i) un intrón natural;
- (ii) una variante homóloga funcional de (i); o
- (iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

El intrón heterólogo (c) es en general un intrón viral o eucariota. Preferentemente el intrón es un intrón de mamífero, en particular un intrón no humano, por ejemplo un intrón de rata o pollo. Preferentemente el intrón es un intrón A, por

ejemplo, intrón A de insulina de rata, intrón A de queratina de pollo o intrón A de acción cardíaca de pollo.

Típicamente el intrón (c) tiene una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 1000 nucleótidos, por ejemplo de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos. El intrón (c) puede por ejemplo, comprender de 50 a 500 nucleótidos, tal como hasta 100, 200, 300 o 400 nucleótidos. Preferentemente el intrón comprende la secuencia hallada en aproximadamente los nucleótidos 50 a 133 del intrón A de insulina de rata nativo, o un homólogo de esta secuencia.

Preferentemente el intrón heterólogo (c) puede cortarse y empalmarse a partir de un transcrito de ARN en una célula huésped eucariótica. En general el intrón comprende una o más de una secuencia donante (tales como GT), una secuencia aceptora (tal como AG), una región rica en pirimidina 3' y una secuencia de punto de ramificación. La región rica en pirimidina, si está presente, puede incluir, por ejemplo, al menos 5, 8, 10 o más pirimidinas. Preferentemente el intrón comprende al menos una secuencia donante, secuencia aceptora y una secuencia de punto de ramificación. Típicamente en la construcción quimérica, el intrón (c) comprende secuencias flanqueantes no intrónicas que derivan de secuencias de exón halladas en los límites de intrón/exón del intrón natural (i). La secuencia de exón flanqueante puede ser secuencia de exón nativa o un homólogo de esta secuencia que conserva sustancialmente la misma actividad que la secuencia nativa, por ejemplo conserva la función de corte y empalme. Típicamente de 5 a 10, preferentemente de 7 a 10 bases de la secuencia de exón se incluyen en cada extremo del intrón.

El intrón (c) puede ser un intrón artificial, siempre que el intrón sea funcional. Por ejemplo, puede usarse un intrón recombinante o quimérico. Dicho intrón puede comprender secuencia de más de un intrón natural.

Típicamente el intrón (c) comprende secuencias presentes en el intrón A de hCMV que se unen con factores de transcripción o proteínas reguladoras o en lugar de cualquiera de estas secuencias, homólogos de estas secuencias capaces de unirse con los mismos factores o proteínas. Típicamente dichas secuencias o sus homólogos están presentes en el intrón (c), en el mismo orden y/o sustancialmente el mismo espaciamiento relativo que en el intrón A de hCMV.

El intrón (c) puede comprender una variante homóloga (ii) en la que la secuencia del intrón natural (i) se ha modificado para retirar un sitio de restricción interno. Por ejemplo, puede usarse "una variante homóloga de intrón A de insulina de rata en la que se ha destruido un sitio *NheI* interno.

Preferentemente, el intrón (c) comprende:

(i) SEC ID N° 3;

(ii) una variante homóloga funcional de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia de intrón (c) puede obtenerse usando técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, la secuencia del intrón A de insulina de rata está disponible en GenBank J00748, la secuencia del intrón A de queratina pollo en GenBank J00847 y la secuencia del intrón A cardíaco de pollo en GenBank X02212. La secuencia de intrón puede aislarse de fuentes naturales usando cebadores basados en una secuencia conocida. La secuencia puede prepararse de forma sintética. Pueden obtenerse secuencias variantes por mutagénesis.

Típicamente una secuencia de intrón funcional, por ejemplo una variante funcional (ii) o un fragmento funcional (iii) es una que tiene sustancialmente la misma actividad que, y/o complementa la actividad de un intrón natural (i). En una realización la actividad es actividad de corte y empalme.

Las secuencias del intrón (c) pueden ensayarse con respecto a actividad de corte y empalme usando un ensayo de corte y empalme rutinario. En general un homólogo funcional (ii) o un fragmento funcional (iii) mostrará al menos 50 %, por ejemplo 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y hasta el 100 % o más de la eficacia de corte y empalme del intrón natural, (i) en el ensayo.

En general, la secuencia de intrón heteróloga, cuando esté presente en la construcción de la invención, potenciará la expresión. Típicamente, una variante (ii) o fragmento (iii) del intrón provocará potenciación comparable a un intrón natural (i).

La funcionalidad de la secuencia de intrón potencial (c) puede ensayarse usando el ensayo de expresión comparativa posterior. El intrón heterólogo se intercambia en el vector base. Generalmente la secuencia de intrón heteróloga es funcional si la adición de la secuencia aumenta la expresión en al menos uno, pero preferentemente dos tipos celulares de referencia en 25 % o más, en comparación con el vector base. Típicamente las células de referencia son células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS. El aumento de la expresión puede ser de al menos 35 %, 45 %, 55 % o más. De acuerdo con este ensayo, una variante funcional (i) o fragmento funcional (ii) de una secuencia de intrón natural (i) es uno que permita más del 50 % de la mejora de expresión conseguida por la secuencia natural.

Una secuencia de intrón heterólogo (c) puede, además o como alternativa ensayarse con respecto a funcionalidad usando el ensayo de inmunogenicidad comparativa posterior. La secuencia del intrón (c) se añade al vector base. Una secuencia de intrón funcional (c) proporciona títulos de anticuerpo que son mayores que los conseguidos por el vector base con al menos uno, preferentemente dos antígenos. Preferentemente, los títulos de anticuerpo son al menos 5 o 10 %, por ejemplo 20 %, 30 % o 40 % mayores que con el vector base. Son antígenos preferidos los antígenos HBsAg, gD de VHS2 y M2 de la gripe. De acuerdo con este ensayo, una variante funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de una secuencia de intrón natural (i) es uno que permite los mayores títulos de anticuerpo conseguidos por la secuencia natural.

Puede obtenerse la secuencia del intrón heterólogo adecuada usando técnicas de clonación convencionales. Por ejemplo, la secuencia del intrón A de insulina de rata está disponible en GenBank J00748, el intrón A de queratina de pollo en GenBank J00847, y el intrón A de actina cardiaca de pollo en X02212. La secuencia de intrón puede aislarse de fuentes nativas usando cebadores basados en los datos de secuencia conocidos. También pueden prepararse de forma sintética secuencias adecuadas.

Las secuencias componentes (a), (b) y (c) puede proporcionarse unidas de forma adecuada entre sí para formar un promotor quimérico usando técnicas de clonación o biología molecular convencionales. Preferentemente se proporciona la secuencia de intrón (c) 3' de la secuencia de exón (b). La construcción de promotor quimérico se une a un sitio de clonación, de tal modo que el promotor efectúe la expresión de una secuencia codificante insertada en el sitio, cuando estén presentes las enzimas apropiadas. Se conocen en la técnica sitios de clonación adecuados, incluyendo sitios de multiclonación, por ejemplo, los sitios de multiclonación pUC19; pBC SK, pBluescript II KS, cDNA3.1, pSP72, pGEM 7Z.

Típicamente, un ácido nucleico para inserción (o insertado) en el sitio de clonación codifica un polipéptido terapéuticamente relevante. Se prefiere que la secuencia codificante sea adecuada para su uso en inmunización de ácido nucleico o terapia génica. La inserción de ácido nucleico puede por lo tanto comprender una secuencia capaz de proporcionar inmunidad, por ejemplo una secuencia inmunogénica que induce una respuesta inmunitaria humoral y/o celular cuando se suministra a un sujeto. Como alternativa, el ácido nucleico puede comprender uno o más genes que codifican un polipéptido terapéutico, por ejemplo, una proteína defectuosa o ausente de un genoma de célula diana o una proteína no nativa que tiene un efecto terapéutico o biológico deseado (por ejemplo, una función antiviral). Para el tratamiento de trastornos genéticos, pueden administrarse genes funcionales correspondientes a genes que se sabe que son deficientes en el trastorno particular a un sujeto. Preferentemente el ácido nucleico es ADN.

Los ácidos nucleicos adecuados para inserción incluyen los usados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, crónicas e infecciosas, incluyendo trastornos tales como SIDA, cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedad cardiovascular, hipercolesterolemia; diversos trastornos sanguíneos incluyendo diversas anemias, talasemia y hemofilia; defectos genéticos tales como fibrosis quística, enfermedad de Gaucher, deficiencia de adenosina desaminasa (ADA), enfisema, etc.

Por ejemplo, en procedimientos para el tratamiento de tumores sólidos, pueden insertarse genes que codifican péptidos tóxicos (es decir, agentes quimioterapéuticos tales como ricina, toxina diftérica y factor del veneno de la cobra), genes supresores de tumores tales como p53, genes que codifican secuencias de ARNm que son antisentido para oncogenes transformantes, péptidos antineoplásicos tales como factor de necrosis tumoral (TNF) y otras citocinas, o mutantes negativos transdominantes de oncogenes transformantes, para expresión en o cerca del sitio tumoral.

De forma similar, también pueden incluirse ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que se sabe que presentan actividad antiviral y/o antibacteriana, o estimulan el sistema inmunitario del huésped. El ácido nucleico puede codificar una de las diversas citocinas (o fragmentos funcionales de las mismas), tales como las interleucinas, interferones y factores estimulantes de colonias. El ácido nucleico puede codificar un antígeno para el tratamiento o prevención de varias afecciones incluyendo pero sin limitación cáncer, alergias, toxicidad e infección por un patógeno tal como, pero sin limitación, hongos, virus, incluyendo virus del papiloma humano (HPV), VIH, VHS2/VHS1, virus de la gripe (tipos A, B y C), virus de la polio, virus RSV, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, grupo de virus Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus paragripal, virus de paperas, virus de varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de la rubéola, virus de linfoma de linfocitos T humano de tipo I, (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D, virus de la viruela, Marburg y Ébola; bacterias incluyendo *M. tuberculosis*, *Chlamydia*, *N. gonorrhoeae*, *Shigella*, *Salmonella*, *Vibrio Cholera*, *Treponema pallidum*, *Pseudomonas*, *Bordetella pertussis*, *Brucella*, *Francisella tularensis*, *Helicobacter pylori*, *Leptospira interrogans*, *Legionella pneumophila*, *Yersinia pestis*, *Streptococcus* (tipos A y B), *Pneumococcus*, *Meningococcus*, *Hemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplasma gondii*, *Compylobacteriosis*, *Moraxella catarrhalis*, *Donovanosis*, y *Actinomyces*; patógenos fúngicos incluyendo *Candidiasis* y *Aspergillosis*; patógenos parasitarios incluyendo *Tenia*, tremátodos, ascárides, amebiasis, *Giardiasis*, *Cryptosporidium*, *Schistosoma*, *Pneumocystis carinii*, *Trichomoniasis* y *Trichinosis*. El ácido nucleico también puede usarse para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra varias enfermedades veterinarias, tales como glosopodia, coronavirus, *Pasteurella multocida*, *Helicobacter*, *Strongylus vulgaris*, *Actinobacillus peripneumoniae*, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* y

Bordetella brochiseptica. Por lo tanto en un aspecto, las construcciones de ácido nucleico de la presente invención pueden encontrar su uso en una vacuna.

En algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico puede codificar un adyuvante. Por lo tanto, las secuencias insertadas en el sitio de clonación para inserción de una secuencia codificante puede codificar un polipéptido que puede actuar como un adyuvante. En un caso preferido, el adyuvante codificado puede ser una toxina bacteriana que ribosila ADP. Estas incluyen toxina diftérica (DT), toxina de pertussis (PT), toxina del cólera (CT), las toxinas lábiles por calor de *E. coli* (LT1 y LT2), endotoxina A de *Pseudomonas*, exotoxina S de *Pseudomonas*, exoenzima de *B. cereus*, toxina de *B. sphaericus*, toxinas C2 y C3 de *C. botulinum*, exoenzima de *C. limosum*, así como toxinas de *C. perfringens*, *C. spiriformis* y *C. difficile* y EDIN de *Staphylococcus aureus*. La mayoría de las toxinas bacterianas que ribosilan ADP contienen subunidades A y B. La construcción puede expresar la subunidad A, la subunidad B y/o ambas subunidades.

En un caso preferido, la construcción de ácido nucleico puede codificar la toxina lábil por calor de *E. coli* y/o la toxina del cólera y en particular puede expresar toxina lábil por calor de *E. coli*. Una entrada del GenBank para las secuencias completas de los genes de la subunidad A y B de CT puede encontrarse en el locus VIBCTXABB (N° de referencia D30053), mientras que puede encontrarse una entrada de GenBank para las secuencias completas de los genes de la subunidad A y B de LT en el locus AB0116677 (N° de referencia AB011677).

La construcción puede expresar una variante o un fragmento activo de un adyuvante particular. Se dirá que la variante o fragmento está activo si conserva al menos algo de la actividad adyuvante del polipéptido del que deriva. Por lo tanto, la variante y/o fragmento aún podrá potenciar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular en comparación con la respuesta inmunitaria vista cuando no se administra adyuvante con el antígeno. La secuencia codificada puede ser fragmentos o variantes activos de subunidades A y/o B de CT y en particular pueden ser fragmentos activos de subunidades A y/o B de LT.

Puede haberse suprimido la secuencia señal de origen natural de la subunidad de la toxina. Una subunidad de exotoxina de origen natural puede haberse modificado para detoxificar la toxina. La subunidad A puede haberse modificado para alterar o inactivar la actividad ADP-ribosil transferasa.

Por lo tanto, las construcciones de adyuvante de la invención pueden usarse para potenciar una respuesta inmunitaria contra un antígeno particular. La respuesta inmunitaria potenciada puede implicar una respuesta inmunitaria de mayor magnitud o duración. Esto puede significar que cuando se vuelve a enfrentar al antígeno la respuesta inmunitaria es entonces mayor que si no se hubiera administrado adyuvante. La respuesta inmunitaria potenciada puede dar como resultado mayores títulos de anticuerpo. En el caso de algunas construcciones, y en particular las que expresan subunidades de exotoxina, el adyuvante puede dar como resultado aumento de la respuesta celular y una respuesta inmunitaria de tipo T auxiliar 1 contra el antígeno en cuestión.

El ácido nucleico para inserción en el sitio de clonación puede comprender una secuencia de poliadenilación (poliA). Dicha secuencia de poliA generalmente es nativa de la secuencia codificante. Como alternativa, puede proporcionarse una secuencia de poliA heteróloga en la construcción de ácido nucleico de la invención. Típicamente la secuencia de poliA se proporcionará cadena abajo del sitio de clonación, de modo que esté unido operativamente con una secuencia codificante insertada en el sitio de clonación. Puede incluirse cualquier secuencia de poliA adecuada en la construcción usando técnicas de clonación convencionales. Dichas secuencias de poliA se conocen en la técnica.

La secuencia de poli A puede ser:

- (i) una secuencia de poli A natural;
- (ii) una variante homóloga funcional de (i); o
- (iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia de poli A natural (i) puede ser, por ejemplo, una poli A del gen de β globina de conejo, poli A del gen temprano o tardío de virus del papiloma humano (VPH), poli A del gen de gB de VHS 2, una poli A del gen temprano inmediato de CMV de simio o poli A de gen tardío de gD de VHS.

Preferentemente, la secuencia de poli A natural (i) se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N° 10 (GenBank K03256), SEC ID N° 11 (GenBank M16019), SEC ID N° 12 (GenBank Z80699) y SEC ID N° 13 (GenBank K02718).

En general, una secuencia de poli A funcional es una que conserva la actividad de poliadenilación.

Una secuencia de poli A puede ensayarse con respecto a la capacidad para provocar poliadenilación de un transcrito de ARN usando un ensayo de expresión rutinario. Una variante homóloga funcional (ii) o un fragmento funcional (iii) típicamente muestra al menos 50 %, por ejemplo 60 %, 70 %, 80 % o más de la actividad de poli A de la secuencia de poli A natural en el ensayo.

Generalmente la secuencia de poli A, cuando esté presente en la construcción de la invención, potenciará la

expresión, típicamente provocando potenciación comparable con la secuencia de poli A natural (i) mencionada anteriormente.

Una secuencia de poli A también puede ensayarse con respecto a funcionalidad usando el ensayo de expresión comparativa posterior. Una región poli A de ensayo sustituye en el vector base al RBGpA. Una poli A de ensayo se considera funcional si la poli A no anula la expresión sino que aumenta preferentemente la expresión en al menos uno pero preferentemente dos tipos celulares de referencia, en comparación con el vector base. Preferentemente hay un aumento en la expresión de al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 % o más. Son tipos celulares preferidos las células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS. De acuerdo con el ensayo, una variante homóloga (ii) o un fragmento (iii) es funcional si permite más del 50 % de la mejora de expresión conseguida por la secuencia de poli A natural (i).

Como alternativa, o adicionalmente, las secuencias poli A pueden ensayarse con respecto a actividad en el ensayo de inmunogenicidad comparativa posterior. La secuencia de poli A sustituye en el vector base RBGpA. Una secuencia de poli A funcional proporciona títulos de anticuerpo que son al menos tan altos como o mayores que los conseguidos por el vector base con al menos uno, preferentemente dos antígenos. Preferentemente los títulos de anticuerpo son al menos 5 %, 10 %, por ejemplo 20 %, 30 % o 40 % mayores que los conseguidos con el vector base. Son antígenos preferidos los antígenos HBsAg, gD de VHS2 y M2 de la gripe. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es funcional si permite los mayores títulos de anticuerpos conseguidos por la secuencia de poli A natural (i).

La construcción de ácido nucleico puede comprender secuencias de control adicionales que influyen en la expresión de una secuencia codificante insertada en el sitio de clonación. La construcción puede incluir una secuencia líder no traducida. La secuencia se proporciona en la construcción en unión operativa con el promotor quimérico, y por lo tanto también con una secuencia codificante insertada en el sitio de clonación. El líder proporciona un sitio de partida de la traducción para expresión de una secuencia codificante insertada y típicamente incluye una secuencia Kozak.

Típicamente la secuencia líder no traducida comprende:

- (i) una secuencia líder no traducida natural;
- (ii) una variante homóloga funcional de (i); o
- (iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

En general, la secuencia natural (i) es una secuencia eucariota o una secuencia viral, en particular, de un virus que infecta a un eucariota. Preferentemente la secuencia natural (i) es secuencia de VHB o VHS, por ejemplo secuencia de antígeno preS2 de VHB, secuencia de antígeno e de VHB o secuencia de antígeno gD de VHS de tipo 2. De forma particularmente preferente, (i) se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N° 5, SEC ID N° 6 y SEC ID N° 7.

Típicamente, la secuencia líder comprende secuencias presentes en (i) que se unen a componentes de la transcripción o proteínas reguladoras, u homólogos de estas secuencias que son capaces de unirse con los mismos componentes o proteínas. Típicamente dichas secuencias o sus homólogos están presentes en la secuencia líder en el mismo orden y/o sustancialmente el mismo espaciamiento relativo que en (i). En general la secuencia líder comprende un sitio de partida de la traducción para expresión de una secuencia codificante insertada. Típicamente la secuencia líder incluye una secuencia de Kozak.

En general, la secuencia líder no traducida tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos, por ejemplo de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 nucleótidos, preferentemente de 15 a aproximadamente 130 nucleótidos. Pueden usarse secuencias líder que comprenden, por ejemplo, 15, 50, 75 o 100 nucleótidos.

Generalmente una secuencia líder no traducida funcional es una que puede proporcionar un sitio de inicio de la traducción para expresión de una secuencia codificante en unión operativa con la secuencia líder. Típicamente una variante (ii) o fragmento (iii) funcional tiene sustancialmente la misma actividad que y/o complementa la actividad de la secuencia natural (i), habitualmente al facilitar o potenciar la expresión de una secuencia codificante en unión operativa con la secuencia.

Una variante (ii) o fragmento (iii) puede ensayarse con respecto a actividad como una secuencia líder no traducida en relación con la secuencia líder natural usando protocolos convencionales. Por ejemplo, pueden prepararse vectores de expresión que comprenden una secuencia líder natural (i) unida operativamente con su secuencia codificante nativa, y la expresión controlarse en células huésped adecuadas, por ejemplo, células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 y COS. Pueden prepararse construcciones de ensayo en las que la secuencia líder natural se reemplaza por una variante homóloga o fragmento y la expresión se controla de nuevo en las mismas células huésped. En general, una variante (ii) o fragmento (iii) proporciona al menos 50 %, tal como 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % o más de la expresión proporcionada por la secuencia natural.

Una secuencia líder potencial también puede ensayarse con respecto a utilidad en el ensayo de expresión comparativa posterior. Una secuencia líder de ensayo sustituye en el vector base la 5'UTR de preS2 de VHB. Una secuencia líder funcional no anula la expresión sino que aumenta preferentemente la expresión en al menos uno pero preferentemente dos tipos celulares de referencia, en comparación con el vector base. En general la expresión aumenta en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. Son tipos celulares preferidos las células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS. De acuerdo con el ensayo, una variante funcional (ii) o fragmento (iii) es funcional si permite más del 50 % de la mejora de expresión conseguida por la secuencia líder natural.

Como alternativa, o adicionalmente, una secuencia líder puede ensayarse con respecto a actividad en el ensayo de inmunogenicidad comparativa posterior. Una secuencia líder sustituye en el vector base la 5'UTR preS2 de VHB. Una secuencia líder funcional proporciona títulos de anticuerpo que son al menos tan altos como o mayores que los conseguidos por el vector base, con al menos un, preferentemente dos antígenos. Preferentemente los títulos de anticuerpos son al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % mayores que con el vector base. Son antígenos preferidos los antígenos HBsAg, gD de VHS 2 y M2 de la gripe. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es funcional si permite los mayores títulos de anticuerpo permitidos por la secuencia líder natural (i).

Puede obtenerse la secuencia líder adecuada usando protocolos convencionales. Por ejemplo, la secuencia de antígeno preS2 de VHB, secuencia de antígeno e de VHB y secuencia de antígeno gD de VHS de tipo 2 están disponibles en GenBank M54923, M54923 y Z86099 respectivamente. Los cebadores pueden diseñarse basándose en esta secuencia conocida y usarse para aislar secuencias homólogas. Las secuencias líder pueden sintetizarse basándose en secuencias conocidas.

La construcción de ácido nucleico comprende una secuencia potenciadora como se enumera en las reivindicaciones. Una secuencia potenciadora se proporciona típicamente 3' del sitio de clonación, en unión operativa tanto con el promotor quimérico como con una secuencia codificante insertada, y actúa para aumentar la transcripción de la secuencia insertada.

En general, el potenciador comprende:

- (i) un potenciador natural;
- (ii) una variante homóloga funcional de (i); o
- (iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia potenciadora generalmente comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 850 nucleótidos, por ejemplo de aproximadamente 75 a aproximadamente 500 nucleótidos. Pueden usarse potenciadores de aproximadamente 100, 200, 300 o 400 nucleótidos.

El potenciador es de una 3'UTR de una secuencia de Ag de HBs.

Preferentemente (i) comprende SEC ID N° 8.

En general, el potenciador en la construcción comprende secuencias halladas en (i) que se unen con componentes de la transcripción o proteínas reguladoras, por ejemplo factores de la transcripción, u homólogos de estas secuencias que se unen con los mismos componentes o proteínas. Preferentemente estas secuencias están presentes en el potenciador en el mismo orden y/o sustancialmente en el mismo espaciamiento relativo que en (i).

Generalmente un potenciador funcional es uno que potencia o aumenta la expresión de un polinucleótido, por ejemplo, una secuencia codificante, que está unido operativamente con la secuencia potenciadora. Típicamente una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) funcional tiene sustancialmente la misma actividad (por ejemplo, potenciación de la expresión) que y/o complementa la actividad del potenciador natural (i).

La actividad potenciadora puede ensayarse usando un ensayo de trampa de potenciador. Los protocolos se conocen en la técnica. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) funcional preferentemente proporciona al menos 50 % de la actividad potenciadora mostrada por el potenciador natural en dicho ensayo. Típicamente la actividad es al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100% o más de la actividad del potenciador natural. En general, una variante funcional (ii) o fragmento (iii) es capaz de complementar la actividad del potenciador natural (i) en el ensayo.

También puede ensayarse la utilidad de potenciador usando el ensayo de expresión comparativa expuesto posteriormente. Una secuencia de 3'UTR de ensayo se intercambia en el vector base. Una 3'UTR tiene utilidad si no anula la expresión sino que aumenta preferentemente la expresión en al menos uno pero preferentemente dos tipos celulares de referencia en comparación con los vectores base en el ensayo. Preferentemente la expresión aumenta en al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %. Son tipos celulares preferidos las células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga (ii) o un fragmento (iii) es funcional si permite más del 50 % de la mejora de expresión conseguida por la secuencia potenciadora natural (i).

Adicionalmente o como alternativa, las secuencias potenciadoras pueden ensayarse con respecto a actividad en el ensayo de inmunogenicidad comparativa posterior. Una 3'UTR se intercambia en el vector base. Una secuencia

potenciadora funcional proporciona títulos de anticuerpo que son al menos tan altos como o mayores que los conseguidos por el vector base con al menos uno, preferentemente dos antígenos. Preferentemente los títulos de anticuerpo son al menos 5 %, 10 %, 20 %, 30 % o 40 % mayores que con el vector base. Son antígenos preferidos los antígenos HBs Ag, gD de VHS2 y M2 de la gripe. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es funcional si permite el mayor título de anticuerpo permitido por la secuencia potenciadora natural (i).

Puede obtenerse una secuencia potenciadora adecuada usando procedimientos de clonación convencionales. Por ejemplo, puede accederse a la secuencia de 3'UTR de HBsAg o la secuencia 3'UTR del gen temprano inmediato de CMV de simio en GenBank AF143308 y M16019. Los cebadores pueden diseñarse basándose en esta secuencia reconocida y usarse para aislar secuencias homólogas.

En una realización preferida, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia de poli A heteróloga, una secuencia líder heteróloga y un potenciador heterólogo, todos en unión operativa con el promotor quimérico, para expresión eficaz de una secuencia codificante insertada.

En un aspecto adicional, la presente divulgación también proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende, o en ocasiones consiste esencialmente en:

(i) una secuencia promotora

(ii) una secuencia líder no traducida derivada de la secuencia de antígeno preS2 de VHB, secuencia de antígeno e de VHB o secuencia de antígeno gD de VHS de tipo 2; y

(iii) una secuencia codificante unida operativamente con (i) y (ii)

en la que la secuencia codificante es heteróloga de la secuencia líder no traducida.

Típicamente la secuencia promotora (i) deriva de una secuencia promotora viral o eucariota. La secuencia promotora puede ser una secuencia promotora natural, un homólogo funcional de la secuencia natural o un fragmento funcional de una de ellas. Los promotores naturales adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor temprano inmediato de hCMV, promotor de virus de la seudorrabia (PRV), o promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV). Preferentemente el promotor natural comprende SEC ID N° 52 o SEC ID N° 53.

Puede usarse una construcción promotora artificial, tal como el promotor quimérico descrito anteriormente, siempre que el promotor sea funcional.

Una secuencia promotora funcional generalmente es una que puede provocar (incluyendo iniciar y regular) la transcripción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula huésped adecuada.

Una secuencia promotora puede ensayarse con respecto a actividad promotora usando un ensayo de expresión rutinario. Un homólogo o fragmento funcional de una secuencia promotora natural típicamente proporciona al menos 50 %, por ejemplo, al menos 60, 70, 80 o 90 % de la expresión proporcionada por la secuencia natural en dicho ensayo.

La secuencia líder no traducida (ii) es como se ha descrito anteriormente. Las secuencias codificantes adecuadas (iii) incluyen las ya descritas en relación con la construcción promotora quimérica. Sin embargo, en el presente aspecto de la invención, la secuencia codificante es heteróloga de la secuencia líder no traducida. La presente construcción típicamente incluye una secuencia de poli A, que ya se ha descrito, puede ser nativa para la secuencia codificante o se proporciona como una secuencia de poli A heteróloga en la construcción. Ya se han descrito secuencias de poli A adecuadas. La construcción puede incluir adicionalmente una secuencia promotora 3' de la secuencia codificante. Se han descrito anteriormente secuencias potenciadoras adecuadas en relación con la construcción promotora quimérica.

En otro aspecto, la divulgación proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende, o en algunas realizaciones consiste esencialmente en:

(i) una secuencia promotora;

(ii) una secuencia codificante unida operativamente con la secuencia promotora (i); y

(iii) una secuencia potenciadora 3' de y unida operativamente con la secuencia codificante (ii);

en la que la secuencia potenciadora (iii) deriva de una 3'UTR de una secuencia de HBsAg o una 3'UTR de una secuencia de gen temprano inmediato de CMV de simio, y la secuencia codificante (ii) es heteróloga de la secuencia potenciadora.

La construcción puede incluir una secuencia líder no traducida tal como las ya descritas en relación con la construcción promotora quimérica.

Típicamente la secuencia promotora (i) deriva de una secuencia promotora viral o eucariota. La secuencia promotora puede ser una secuencia promotora natural, un homólogo funcional de la secuencia natural o un fragmento funcional de una de ellas. Los promotores naturales adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor temprano inmediato de hCMV, promotor del virus de la seudorrabia (PRV), o promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV).
5 Preferentemente el promotor natural comprende SEC ID N° 52 o SEC ID N° 53.

Puede usarse una construcción promotora artificial, tal como el promotor quimérico descrito anteriormente, siempre que el promotor sea funcional.

Una secuencia promotora funcional es generalmente una que sea capaz de provocar (incluyendo iniciar y regular) la transcripción de una secuencia codificante unida operativamente en una célula huésped adecuada.

10 Puede ensayarse una secuencia promotora con respecto a actividad promotora usando un ensayo de expresión rutinario. Los homólogos o fragmentos funcionales de una secuencia promotora natural típicamente proporcionan al menos 50 %, por ejemplo, o al menos 60, 70, 80 o 90 % de la expresión proporcionada por la secuencia natural en dicho ensayo.

15 Las secuencias codificantes adecuadas (ii) incluyen las ya mencionadas en relación con la construcción promotora quimérica. Sin embargo, en el presente aspecto, la secuencia codificante es heteróloga de la secuencia potenciadora 3'. La secuencia potenciadora (iii) de la construcción se ha descrito anteriormente. La presente construcción también incluye típicamente una secuencia de poli A. Como sucede con la construcción promotora quimérica, esta región de poli A puede ser nativa de la secuencia codificante (ii) o puede proporcionarse como un componente de poli A heterólogo en la construcción.

20 Una construcción de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención puede comprender una secuencia de péptido señal. La secuencia de péptido señal se inserta en unión operativa con el promotor de modo que el péptido señal se exprese y facilite la secreción de un polipéptido codificado por la secuencia codificante también en unión operativa con el promotor.

25 Típicamente una secuencia de péptido señal codifica un péptido de 10 a 30 aminoácidos por ejemplo de 15 a 20 aminoácidos. Con frecuencia los aminoácidos son predominantemente hidrófobos. En una situación típica, un péptido señal se dirige a una cadena polipeptídica creciente que porta el péptido señal al retículo endoplásmico de la célula que lo expresa. El péptido señal se escinde en el retículo endoplásmico, permitiendo la secreción del polipéptido mediante el aparato de Golgi.

Un péptido señal para su uso en la invención puede comprender:

- 30 (i) una secuencia de péptido señal natural;
(ii) una variante homóloga de (i) que conserva la actividad del péptido señal; o
(iii) un fragmento de (i) o (ii) que conserva la actividad del péptido señal.

La secuencia (i) puede ser por ejemplo el péptido señal activador del plasminógeno tisular humano (hTPAsp) (GenBank L00141), el péptido señal de aprotinina (GenBank AAD13685), el péptido señal de extensina del tabaco (GenBank JU0465), o el péptido señal de lisozima de pollo (GenBank AF410481).
35

Un péptido señal, adecuado para su uso en la presente invención, es uno que permite la secreción de proteínas heterólogas. Un péptido señal funcional puede identificarse en un ensayo que compara el efecto de un péptido señal de ensayo con el efecto de un péptido señal conocido, por ejemplo péptido señal activador del plasminógeno tisular humano (hTPAsP), y con el efecto de no tener uno, preferentemente dos polipéptidos. Puede usarse el ensayo de expresión comparativo expuesto posteriormente pero con la siguiente modificación. Se construyen vectores de expresión de secreción que contienen el vector base con el péptido señal de ensayo, hTPAsp o sin péptido señal. Se insertan secuencias codificantes para polipéptidos desprovistos de sus péptidos señal de origen natural en los vectores y los vectores se transforman en células hospedadoras de referencia. Las células preferentemente son células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS. El medio celular se analiza con respecto a los niveles de expresión de polipéptidos. Un péptido señal funcional permite la secreción de polipéptidos a un nivel mayor que un vector que carezca de un péptido señal con al menos uno, preferentemente dos polipéptidos. Típicamente, la secreción es 5 % mayor, o más preferentemente 10 % mayor o más, por ejemplo 20 o 50 % mayor o más. Típicamente, los niveles de secreción son comparables con los obtenidos usando hTPAsp.
40
45

Permitir la secreción de una proteína codificada fuera de una célula de expresión puede tener varias ventajas, en particular cuando la proteína sea un antígeno. Por ejemplo, la secreción de antígeno aumentada podría permitir una mayor captación de antígeno y respuesta por células inmunitarias (macrófagos, células de Langerhans, linfocitos B, linfocitos T, etc.), activar la capacidad del antígeno para alcanzar el torrente sanguíneo y señalizar células (citocinas), permitir que un antígeno encuentre ligandos celulares y efectúe una función (anticuerpos, toxinas tales como toxina del cólera, LT de *E. coli*) y participar en procesos bioquímicos celulares normales (receptores celulares).
50

Una construcción de ácido nucleico de la invención puede estar en forma de un vector de expresión plasmídico. El vector puede incluir entonces elementos adicionales, tales como un origen de replicación, o genes selectores. Dichos elementos se conocen en este campo o pueden incluirse usando técnicas convencionales. En una realización, el vector plasmídico tiene una secuencia en SEC ID N° 14. Como alternativa, la construcción puede incluirse en una construcción de vector viral.

En algunas realizaciones, la construcción de ácido nucleico de la invención puede comprender dos o más de los promotores quiméricos definidos en la presente memoria. Por lo tanto, la construcción puede comprender una pluralidad de promotores quiméricos y en particular la construcción puede tener dos, tres, cuatro, cinco o más promotores quiméricos. Los promotores quiméricos preferentemente estarán unidos operativamente por separado a un sitio de clonación para la inserción de una secuencia codificante. Por lo tanto, la construcción puede expresar dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias codificantes. Las secuencias codificantes expresadas pueden ser cualquiera de las especificadas en la presente memoria. En un caso preferido, la construcción tiene dos promotores quiméricos, teniendo cada uno una secuencia codificante unida operativamente a ellos. En particular, los dos promotores pueden transcribirse en direcciones opuestas.

En particular, las construcciones con dos promotores pueden expresar las subunidades A y B de una toxina bacteriana que ribosila ADP, incluyendo cualquiera de las mencionadas en la presente memoria y preferentemente una subunidad A y B de LT.

En casos en los que la construcción tenga múltiples promotores quiméricos cada uno puede comprender, o estar unido operativamente con, cualquiera de las secuencias mencionadas en la presente memoria. En un caso particularmente preferido, el intrón heterólogo de uno o más de los promotores puede ser la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata. Uno o más de los promotores quiméricos también puede comprender preferentemente la 5'UTR de pre-S2 de gB de VHS-2. Uno o más de los promotores puede comprender la secuencia de poliadenilación del gen de beta globina de rata.

En un caso preferido, la construcción de ácido nucleico de la invención puede comprender dos secuencias promotoras quiméricas, estando cada secuencia promotora unida operativamente con un sitio de clonación que tiene una secuencia codificante insertada en él, en el que cada promotor quimérico comprende

- (a) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV;
- (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV; y
- (c) un intrón heterólogo proporcionado en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal de hCMV,

con la secuencia codificante unida operativamente a un promotor quimérico que codifica una subunidad A de LT y la secuencia codificante unida con el otro que codifica una subunidad B de LT. La construcción puede por lo tanto expresar ambas subunidades. Preferentemente:

- el intrón heterólogo de cada promotor es la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata;
- la secuencia que codifica cada subunidad de LT está unida operativamente con la 5'UTR de pre-S2 de VHB; y/o
- cada secuencia que codifica LT está unida operativamente con la secuencia de poliadenilación del gen de beta globina de rata.

Una construcción polinucleotídica de la invención puede estar sustancialmente sin o asociada con células o con material celular. Puede estar en forma sustancialmente aislada, o puede estar en forma sustancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá al menos 90 %, por ejemplo al menos 95 %, 98 % o 99 % del polinucleótido o masa seca en la preparación.

Las presentes moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse a células huésped adecuadas, para expresión de un polinucleótido en unión operativa con el promotor. Preferentemente las células huésped son células de mamífero, en particular células humanas. Se conocen en la técnica procedimientos adecuados para suministrar ácidos nucleicos a dichas células e incluyen, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, electroporación y microinyección directa en núcleos.

Como se ha descrito anteriormente, una secuencia codificante de ácido nucleico en una construcción puede codificar un polipéptido terapéuticamente relevante. Las presentes construcciones pueden por tanto usarse para inmunización de ácidos nucleicos o terapia génica usando protocolos de suministro génico convencionales. Se conocen en la técnica procedimientos adecuados para suministro génico, como se analiza posteriormente. Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse directamente a un sujeto, o como alternativa suministrarse ex vivo a células derivadas del sujeto después de lo cual las células se vuelven a implantar en el sujeto.

Para su uso en la inmunización de ácido nucleico o terapia génica, las construcciones de ácido nucleico pueden formularse como preparaciones farmacéuticas convencionales. Esto puede realizarse usando química y metodologías de formulación farmacéutica convencionales, que están disponibles para los expertos en la materia.

Por ejemplo, pueden combinarse composiciones que contienen una o más secuencias de ácido nucleico (por ejemplo presentes en una forma de vector adecuada tal como un plásmido de ADN) con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar una preparación líquida.

Pueden estar presentes en el excipiente o vehículo sustancias adyuvantes, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH y similares. Estos excipientes, vehículos y sustancias adyuvantes son generalmente agentes farmacéuticos que pueden administrarse sin toxicidad indebida y que, en el caso de composiciones de vacuna no inducirán una respuesta inmunitaria en el individuo que recibió la composición. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También pueden incluirse en la misma sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales ácidas minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. También se prefiere, aunque no se requiere, que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que actúe como un estabilizador, particularmente para péptidos, proteínas u otras moléculas similares si se van a incluir en la composición. Los ejemplos de vehículos adecuados que también actúan como estabilizadores para péptidos incluyen, sin limitación, usos farmacéuticos de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano, y similares. Otros vehículos adecuados incluyen, de nuevo sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos sódicos o cálcicos, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles de alto peso molecular (PEG), y combinaciones de los mismos. Está disponible un análisis exhaustivo de excipientes, vehículos, y sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991), incorporado en la presente memoria por referencia.

Ciertos facilitadores de la captación y/o expresión de ácidos nucleicos ("agentes facilitadores de la transfección") también pueden incluirse en las composiciones, por ejemplo, facilitadores tales como bupivacaína, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos facilitadores de la transfección tales como preparaciones liposómicas o lipídicas que se usan habitualmente para suministrar moléculas de ácido nucleico. Están disponibles ampliamente liposomas aniónicos y neutros y se conocen bien para suministrar moléculas de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Liposomes: A Practical Approach, (1990) RPC New Ed, IRL Press.). Las preparaciones de lípidos catiónicos también son vehículos bien conocidos para su uso en el suministro de moléculas de ácido nucleico. Las preparaciones lipídicas adecuadas incluyen DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi) propil]-N,N,N-trimetilamonio), disponible bajo el nombre comercial Lipofectin™ y DOTAP (1,2-bis (oleiloxi)-3-(trimetilamonio) propano), véase, por ejemplo, Felgner y col. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:7413-7416; Malone y col. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:6077-6081; Patentes de Estados Unidos Nº 5.283.185 y 5.527.928 y Publicaciones Internacionales Nº WO 90/11092, WO 91/15501 y WO 95/26356. Estos lípidos catiónicos pueden usarse preferentemente en asociación con un lípido neutro, por ejemplo DOPE (dioleil fosfatidiletanolamina). Más composiciones facilitadoras de la transfección que pueden añadirse a las preparaciones lipídicas o liposómicas anteriores incluyen derivados de espermina (véase, por ejemplo, Publicación Internacional Nº WO 93/18759) y compuestos permeabilizadores de membrana tales como GALA, Gramicidina S y sales biliares catiónicas (véase, por ejemplo, Publicación Internacional Nº WO 93/19768).

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

Una vez formuladas las composiciones pueden suministrarse a un sujeto *in vivo* usando una diversidad de vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, las preparaciones líquidas pueden proporcionarse como una solución, suspensión o emulsión inyectable y administrarse mediante inyección parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa usando una aguja y jeringa convencionales, o usando un sistema de inyección de propulsión líquida. Las preparaciones líquidas también pueden administrarse por vía tópica a la piel o el tejido mucoso, o proporcionarse como una pulverización finamente dividida adecuada para administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen administración oral, supositorios y técnicas de suministro transdérmico activas o pasivas.

Como alternativa, las composiciones pueden administrarse *ex vivo*, por ejemplo, se conocen suministro y reimplantación de células transformadas en un sujeto (por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato cálcico, electroporación y microinyección directa en núcleos).

Las composiciones se administran a un sujeto en una cantidad que es compatible con la formulación de dosificación y que será profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. Una cantidad eficaz apropiada quedará en un intervalo relativamente amplio pero puede determinarse fácilmente por un experto en la materia por ensayos rutinarios. El "Physicians Desk Reference" y "Goodman y Gilman The Pharmacological Basis of Therapeutics" son útiles para el fin de determinar la cantidad necesaria. Por ejemplo, se espera generalmente que una dosis eficaz del polinucleótido quede dentro de un intervalo de aproximadamente 0,001 a 1000 µg, más preferentemente de 0,01 a 10,0 µg.

En un caso, puede usarse una construcción de ácido nucleico de la invención junto con otra construcción de ácido nucleico. En un caso, la construcción de ácido nucleico puede ser una de las descritas en la presente memoria para

la expresión de un adyuvante y la otra construcción puede ser una construcción que codifica uno o más antígenos. En un caso preferido, ambas construcciones pueden emplear los promotores químicos de la invención.

En el caso en el que una construcción expresa un adyuvante y la otra un antígeno o antígenos, los antígenos pueden ser en particular de VHS o virus de la hepatitis (particularmente virus de la hepatitis B). Los antígenos pueden ser en particular los antígenos de VHS ICP0, ICP4, ICP22 y/o ICP27 y preferentemente los cuatro. En casos en los que se expresen dichos antígenos, la construcción adyuvante expresará en particular LTA y/o LTB y en particular ambos.

Las dos construcciones pueden administrarse por separado, de forma simultánea o secuencialmente. Las dos pueden administrarse en la misma o diferentes composiciones. En particular, cuando una construcción tiene un efecto adyuvante se administrarán las dos de modo que se vea un efecto adyuvante, es decir la respuesta inmunitaria generada será mayor y/o durante un período más largo que si no se hubiera administrado el adyuvante con el antígeno. En un caso preferido, las dos construcciones pueden suministrarse en la misma composición, preferentemente en las mismas partículas vehículo.

En una realización preferida, las construcciones de ácido nucleico de la invención se suministran a células diana usando una técnica de suministro mediada por partículas. Se conocen en la técnica procedimientos mediados por partículas para suministrar preparaciones de ácido nucleico.

Pueden formarse partículas para suministro mediado por partículas revistiendo partículas vehículo (por ejemplo, vehículos nucleares) con las presentes moléculas de ácido nucleico usando una diversidad de técnicas conocidas en este campo. Se seleccionan partículas vehículo de materiales que tienen una densidad adecuada en el intervalo de tamaños de partículas típicamente usados para suministro intracelular de un dispositivo de suministro mediado por partículas. Típicamente las partículas vehículo tienen un diámetro de 0,1 a 5 μm , por ejemplo de 0,5 a 3 μm , preferentemente de 1 a 2 μm . El tamaño de partícula vehículo óptimo dependerá, por supuesto, del diámetro de las células diana. Como alternativa, pueden usarse partículas de oro coloidal en las que se administra el oro coloidal de revestimiento (por ejemplo, se inyecta) en tejido (por ejemplo, piel o músculo) y posteriormente se capta por células inmunocompetentes.

Habitualmente se seleccionan partículas vehículo de metales inertes. Los metales son inertes porque no son fisiológicamente activos. Para los fines de la invención, pueden usarse partículas vehículo de wolframio, oro, platino e iridio. Se prefieren partículas de wolframio y oro. Las partículas de wolframio están fácilmente disponibles en tamaños medios de 0,5 a 2,0 μm de diámetro. Aunque dichas partículas tienen densidad óptima para su uso en procedimientos de suministro de aceleración de partículas y permiten revestimiento altamente eficaz con ADN, el wolframio puede ser potencialmente tóxico para ciertos tipos celulares. También se usarán con los presentes procedimientos partículas de oro u oro microcristalino (por ejemplo, polvo de oro A1570, disponible de Engelhard Corp., East Newark, NJ). Las partículas de oro proporcionan uniformidad de tamaño (disponible de Alpha Chemicals en tamaños de partícula de 1-3 μm , o disponible de Degussa, South Plainfield, NJ, en un intervalo de tamaños de partículas que incluye 0,95 μm) y toxicidad reducida. El oro microcristalino proporciona una distribución de tamaños de partículas diversa, típicamente en el intervalo de 0,1-5 μm . Sin embargo, el área de superficie irregular del oro microcristalino permite un revestimiento altamente eficaz con ácidos nucleicos.

Se conocen y se han descrito varios procedimientos para revestimiento o precipitación con ADN o ARN de partículas de oro o wolframio. La mayoría de dichos procedimientos generalmente combinan una cantidad predeterminada de oro o wolframio con ADN plasmídico, CaCl_2 y espermidina. La solución resultante se agita vorticialmente continuamente durante el procedimiento de revestimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Después de precipitación del ácido nucleico, las partículas revestidas pueden transferirse a membranas adecuadas y permitir que se sequen antes de su uso, usarse para revestir superficies de un módulo o casete de muestra, o cargarse en un casete de suministro para su uso en instrumentos de suministro mediados por partículas particulares.

Como alternativa, los polinucleótidos de la invención pueden formularse como una composición en partículas. La formulación puede llevarse a cabo usando la química de formulación farmacéutica convencional anteriormente descrita. Por ejemplo, los polinucleótidos pueden combinarse con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proporcionar una composición adecuada. Las composiciones formuladas se prepararon después como partículas usando técnicas convencionales tales como evaporación sencilla (secado al aire), secado al vacío, secado por pulverización, secado por congelación (liofilización), liofilización por pulverización, revestimiento por pulverización, precipitación, formulación de partículas fluidas supercríticas y similares. Si se desea, las partículas resultantes pueden densificarse usando las técnicas descritas en la Publicación Internacional del mismo solicitante N° WO 97/48485, incorporada en la presente memoria por referencia.

Estos procedimientos pueden usarse para obtener partículas de ácido nucleico que tienen un tamaño que varía de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 250 μm , preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 μm , y más preferentemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 60 μm ; y una densidad de partículas que varía de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 25 g/cm^3 , y una densidad aparente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 3,0 g/cm^3 , o mayor.

Una vez formadas, las partículas que comprenden las moléculas de ácido nucleico pueden envasarse en dosificaciones unitarias individuales o recipientes multidosis. Dichos recipientes pueden comprender un recipiente herméticamente sellado que incluye una cantidad adecuada de las partículas. Las partículas pueden envasarse como una formulación estéril, y el recipiente sellado herméticamente puede por lo tanto diseñarse para conservar la esterilidad de la formulación hasta su uso en el suministro a un sujeto. Los recipientes se adaptan preferentemente para su uso directo en un dispositivo de suministro mediado por partículas. Típicamente dichos recipientes toman la forma de cápsulas, bolsas de papel metalizado, bolsitas, casetes y similares. Los dispositivos de suministro de partículas también pueden proporcionarse en una condición precargada que contiene una dosificación adecuada de las partículas. El dispositivo precargado también puede preenvasarse entonces en un recipiente sellado herméticamente.

El recipiente en el que las partículas se envasan puede etiquetarse adicionalmente para identificar las composiciones y proporcionar información de dosificación relevante. Además, el recipiente puede marcarse con un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental, por ejemplo, la administración de alimentos y fármacos, en el que el aviso indica la aprobación por la agencia según la Ley Federal de la fabricación, uso o venta de la preparación de ácido nucleico contenida en el mismo para administración humana.

Se conocen en la técnica dispositivos de aceleración de partículas, adecuados para suministro mediado por partículas. Por ejemplo, los dispositivos de pistola génica actuales emplean una descarga explosiva, eléctrica o gaseosa para propulsar partículas vehículo revestidas hacia células diana. Las partículas vehículo revestidas pueden unirse de forma extraíble con una lámina de vehículo movable o unirse de forma desmontable con una superficie a lo largo de la que pasa una corriente de gas, elevando las partículas de la superficie y acelerándolas hacia la diana. Se describe un ejemplo de un dispositivo de descarga gaseosa en la Patente de Estados Unidos N° 5.204.253. Se describe un dispositivo de tipo explosivo en la Patente de Estados Unidos N° 4.945.050. Se describe un ejemplo de un aparato de descarga eléctrica adecuado para su uso en la presente memoria en la Patente de Estados Unidos N° 5.120.657. Se describe otro aparato de descarga eléctrica en la patente de Estados Unidos N° 5.149.655.

También pueden administrarse partículas usando un dispositivo de jeringa sin aguja, tal como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 5.630.796 de Bellhouse y col ("el dispositivo de jeringa sin aguja PowderJect[®]") y en las Publicaciones Internacionales N° WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513 y WO 96/20022.

Pueden proporcionarse dispositivos tales como el descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.630.796 como un instrumento en forma de bolígrafo que contiene, en orden lineal de arriba abajo, un cilindro de gas, un casete o envase de partículas, y una boquilla supersónica con un medio silenciador asociado. Las partículas se proporcionan dentro de un recipiente adecuado, por ejemplo, un casete formado por dos membranas de polímero rompibles que se sellan por calor con un espaciador en forma de arandela para formar una unidad sellada independiente. Pueden seleccionarse materiales de membrana para conseguir un modo específico de apertura y presión de rotura que dictan las condiciones en las que se inicia el flujo supersónico.

En funcionamiento, el dispositivo se acciona para liberar el gas comprimido del cilindro a una cámara de expansión dentro del dispositivo. El gas liberado entra en contacto con el casete de partículas y, cuando se acumula suficiente presión, rompe repentinamente las membranas del casete barriando las partículas a la boquilla supersónica para suministro posterior. La boquilla está diseñada para conseguir una velocidad de gas y patrón de flujo específicos para suministrar una cantidad de partículas a una superficie diana de área predefinida. El silenciador se usa para atenuar el ruido producido por el flujo de gas supersónico.

El sistema de suministro descrito en la Publicación Internacional N° WO 96/20022 también usa la energía de una fuente de gas comprimido para acelerar y suministrar composiciones en polvo. Sin embargo, se distingue del sistema de la patente de Estados Unidos N° 5.630.796 en su uso de una onda de choque en lugar de flujo de gas para acelerar las partículas. Más particularmente, un aumento de la presión instantáneo proporcionado por una onda de choque generada detrás de una cúpula flexible golpea la parte posterior de la cúpula, provocando una eversión repentina de la cúpula flexible en la dirección de una superficie diana. Esta eversión repentina catapulta una composición en polvo (que se localiza en el exterior de la cúpula) a una velocidad, y por lo tanto impulso, suficiente para penetrar en el tejido diana, por ejemplo, tejido mucoso oral. La composición en polvo se libera en el punto de eversión de la cúpula completa. La cúpula también sirve para contener completamente el flujo de gas de alta presión que por lo tanto no entra en contacto con el tejido. Debido a que el gas no se libera durante esta operación de suministro, el sistema es inherentemente silencioso. Este diseño puede usarse en otras aplicaciones cerradas o de otro modo sensibles por ejemplo, para suministrar partículas a sitios quirúrgicos mínimamente invasivos.

Las partículas pueden administrarse *in vivo* directamente a un sujeto, o *ex vivo* a células tomadas de un sujeto, reimplantándose después las células transformadas en el sujeto. Para suministro *in vivo*, la inyección de partículas es típicamente por vía subcutánea, por vía epidérmica, por vía intradérmica, por vía intramucosa (por ejemplo, por vía nasal, vía rectal y/o vía vaginal), por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía oral o por vía intramuscular. Preferentemente, el suministro es a células diferenciadas terminalmente; sin embargo, las partículas también pueden suministrarse a células no diferenciadas o parcialmente diferenciadas tales como células madre de la sangre y fibroblastos cutáneos. Más preferentemente, el suministro es a células epidérmicas de la piel.

Las partículas se administran a un sujeto de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que será profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de las presentes composiciones en partículas será suficiente para proporcionar el tratamiento o prevención de síntomas de la enfermedad o afección, y quedará en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse por ensayos rutinarios. Generalmente, las partículas se suministran en una cantidad de 0,001 a 1000 µg, más preferentemente de 0,01 a 10,0 µg de ácido nucleico por dosis. Sin embargo, la cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y condición general del individuo que se trate y la secuencia de nucleótidos particular seleccionada, así como otros factores. Puede determinarse fácilmente una cantidad eficaz apropiada mediante ensayos clínicos. El "Physicians Desk Reference" y "Goodman y Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" son útiles para el fin propósito de determinar la cantidad necesaria.

Ensayos

Ensayo de expresión comparativa

Un ensayo adecuado para utilidad de elementos determina el efecto que el elemento tiene en la expresión de un polipéptido. La base de la comparación para ensayar la utilidad de los elementos es un "vector base", generalmente (a no ser que se indique de otro modo) un plásmido con un promotor de hCMV, exón 1 de hCMV, 9 bases del exón 2 de hCMV, la 5'UTR de preS2 de VHB y la región de poliadenilación de β globina de conejo, situado para conducir la expresión de una secuencia codificante. Típicamente, el vector base es pJV7384, pJV7401, pJV7450 o pJV7533. Se añaden intrones heterólogos y 3'UTR, o se intercambian secuencias promotoras, exones, 5'UTR y sitios poli A en los vectores base para crear vectores de expresión de ensayo. De este modo pueden ensayarse variantes o fragmentos funcionales.

Los vectores base y vectores de ensayo se transforman en células huésped adecuadas y las células se analizan con respecto a niveles de expresión de polipéptidos. Preferentemente se usan células huésped de mamífero. Las células adecuadas incluyen células de mamífero HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS.

Típicamente, un elemento funcional provoca expresión que es comparable con el vector base, por ejemplo al menos la misma o mayor. Preferentemente se ensaya la expresión en más de un tipo celular y con más de una secuencia codificante.

Se proporciona protocolos experimentales adecuados, por ejemplo, en los Ejemplos 1 a 13 posteriores.

Ensayo de inmunogenicidad comparativa

Cuando el polipéptido para expresar es un antígeno, puede llevarse a cabo un ensayo adicional para identificar elementos de construcción funcionales o particularmente preferidos. En el ensayo, el efecto de un elemento en respuesta inmunitaria se determina después del suministro de un vector de expresión a un organismo de ensayo. Los niveles de anticuerpo contra el antígeno son la forma más fácil de valorar la respuesta inmunitaria. Se vacuna a grupos de ratones con los vectores base o vectores de ensayo construidos como anteriormente. Se recoge suero después de una cantidad de tiempo apropiada y se analiza con respecto a los niveles de anticuerpo.

Este experimento se realiza dos veces, y se representan los niveles de anticuerpo de todos los grupos en ambos experimentos. Los elementos funcionales darán lugar a títulos de anticuerpo al menos tan altos como o mayores en ambos experimentos para un antígeno particular que la base del vector. Preferentemente, el resultado se verá con más de un antígeno para demostrar la amplitud de utilidad del elemento o los elementos en ese panel de expresión.

Se proporcionan protocolos experimentales adecuados por ejemplo en el Ejemplo 14 dado a continuación.

C. Parte experimental

A continuación se dan ejemplos de realizaciones específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para fines únicamente ilustrativos, y no se pretende que limiten el ámbito de la presente invención de ningún modo.

Se han realizado intentos de asegurar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero debería, por supuesto, tenerse en cuenta algún error y desviación experimental.

Procedimientos

Condiciones de PCR convencionales

Las condiciones de PCR convencionales usadas para la construcción de vectores fueron las siguientes: tampón principal de PCR 1x con MgCl₂ 1,5 mM (Promega Corporation, Madison, WI), 0,400 µM de cada uno de los cebadores, 200 µM de cada dNTP (USB, Inc, Cleveland, OH), 2,5 µ de Taq polimerasa (Promega Corporation, Madison, WI), 1,0 ng de ADN molde, agua hasta 100 µl y una capa de aceite mineral (Aldrich Chemical, Inc., Milwaukee, WI). El termociclador PTC-200 (MJ Research, Inc, Waltham, MA) se programó para ejecutar la siguiente

rutina: 4' a 95 °C, 30 ciclos de (1' a 95 °C/1' 15" a 55 °C/1' a 72 °C), 10' a 72 °C, reposo a 4 °C). Los productos de amplificación se retiraron de la reacción de PCR usando el kit de purificación de PCR QIAquick® (Qiagen Inc, Valencia, CA) antes de cortar con enzimas de restricción (new England Biolabs, Beverly, MA).

Todos los productos de PCR se secuenciaron después de clonar para asegurar la fidelidad de la amplificación.

5 Ejemplo 1. Construcción de paneles de vectores del antígeno de superficie de virus de hepatitis B. (HBsAg)

Se construyeron varios vectores de expresión plasmídicos para la expresión de HBsAg.

Materiales de partida

(i) pWRG7128 (Roy, M, y col. Vaccine (2001) 19: 764-778), que contiene la secuencia promotora temprana inmediata de hCMV, el primer exón, el primer intrón, y un segundo exón parcial del gen temprano inmediato principal de hCMV, la secuencia codificante de HBsAg con regiones flanqueantes (secuencia derivada de 5'UTR de preS2 de VHB y elementos de respuesta post-transcripcional 3') y la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGHPA)

(ii) pJV7284, un derivado de pWRG7128 que intercambia BGHPA por la región de poliadenilación de β globina de conejo RBGP A.

(a) pJV7384 (CMV (sin intrón), 5'UTR de preS2 de VHB y RBGP A)

pWRG7128 se sometió a PCR con JF93 (SEC ID N° 15) y F110 (SEC ID N° 16) usando condiciones convencionales y se cortó con *Sal*I y *Bam*H 1 para aislar un fragmento de inserto que contenía el promotor de CMV, exón 1 y parte de la secuencia del exón 2. pAM6 (ATCC, Mannassas, VA) se cortó con *Bam*H1 y *Bst*X1 para aislar un fragmento de inserto que contenía la 5'UTR de HBsAg, y aproximadamente el 70 % de la región codificante de HBsAg. pJV7284 se cortó con *Sal*I y *Bst*X1 para generar un fragmento de vector en el que se ligaron dos fragmentos de inserto, dando como resultado pJV7293.

pWRG7128 se sometió a PCR con los cebadores GW1 (SEC ID N° 17) y JF254 (SEC ID N°: 18) y se cortó con *Bst*X1 y *Bgl*2 para aislar un fragmento de inserto que contenía el extremo 3' de la región codificante de HBsAg. pJV7293 se cortó con *Bst*X1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado el vector pJV7384.

(b) pJV7382 (CMV (sin intrón), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de preS2 de VHB y RBGP A)

pJV7293 se cortó con *Xho*1 y *Xba*1 para generar un fragmento de inserto que contenía el promotor/exones de CMV y la 5'-UTR con el extremo 5' de la secuencia codificante de HBsAg. pWRG7128 se cortó con *Xba*1 y *Bcl*1 para generar un fragmento de inserto que contenía la mayoría de la secuencia codificante de HBsAg y el 3'-UTR. pJV7284 se cortó con *Xho*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector en el que se ligaron los dos fragmentos de inserto, dando como resultado pJV7382.

(c) pJV7389 (CMV (RIA); 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de preS2 de VHB y RBGP A)

El intrón A de insulina de rata (RIA) se sometió a PCR a partir del plásmido p5'rlns (origen desconocido) con los cebadores GW150 (SEC ID N° 19) y JF255 (SEC ID N° 20). El producto de PCR se cortó con *Bam*H1 y se insertó en pJV7382 linealizado con *Bam*H1 dando como resultado pJV7389.

(d) pJV7387 (CMV (RIA), 5'UTR de preS2 de VHB y RBGP A)

pJV7384 se cortó con *Bst*X1 y *Eco*R1 para generar un fragmento de inserto que contenía el extremo 3' de la región codificante de HBsAg y RBGP A. pJV7389 se cortó con *Bst*X1 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7387.

40 Ejemplo 2. Construcción de paneles de vectores del antígeno glucoproteína D del virus del herpes simple (gD de VHS)

Se construyeron varios vectores de expresión plasmídicos para expresión de gD de VHS.

Materiales de partida

(a) pJV7334, un derivado de pWRG7284 (pJV 7284) que reemplaza la secuencia codificante de HBsAg con un *Nhe*1 en fase directamente cadena abajo del codón de partida ATG, seguido de un fragmento de relleno con un *Bam*H1 inmediatamente 5' del Enh de VHB

(b) pWRG7202, un derivado de pGem3Z (Promega) con un fragmento de relleno que permite la fusión de una secuencia codificante con el péptido señal activador de plasminógeno tisular (TPA) humano cadena abajo de un sitio *Nhe*1.

(a) pJV7392 (CMV (intrón nativo), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGP A)

La región codificante de gD de VHS2 se sometió a PCR a partir de una reserva de ADN viral (Advanced Biotech, Inc, Columbia, MD) usando los cebadores DS1 (SEC ID N° 21) y DA1 (SEC ID N° 22) y se cortó con *Nhe*1 y *Eco*R1 para generar un fragmento de inserto. pWRG7202 se cortó con *Nhe*1 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7391.

pJV7391 se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para generar un fragmento de inserto que contenía la secuencia codificante de gD de VHS2. pJV7334 se cortó con *Nhe1* y *BamH1* para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7392. Este vector consiste en los siguientes elementos de expresión: la secuencia promotora temprana inmediata de hCMV, el primer exón, primer intrón y un segundo exón parcial del gen temprano inmediato principal de hCMV, la 5'-UTR de HBsAg, la secuencia codificante del gen gD de VHS2, la 3'-UTR de HBsAg y RBGpA.

(b) pJV7399 (CMV (sin intrón), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se construyó una versión sin intrones de pJV7392 de la siguiente manera. pJV7384 se cortó con *Hind3* y *Nde1* para aislar un fragmento de inserto que contenía los extremos 5' del gen de resistencia a kanamicina y el promotor de CMV. pJV7384 se cortó con *Nde1* y *Ssp1* para aislar un fragmento de inserto que contenía el extremo 3' del promotor de CMV, el exón 1/2 de CMV y el extremo 5' de la 5'-UTR de HBsAg. Estos fragmentos de inserto se insertaron en pJV7392 del que se retiró el fragmento *Hind3-Ssp1*, dando como resultado pJV7399.

(c) pJV7400 (CMV (RIA), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se construyó una versión de RIA de pJV7392 de la siguiente manera. pJV7384 se cortó con *Hind3* y *Nde1* para aislar un fragmento de inserto que contenía los extremos 5' del gen de resistencia a kanamicina y promotor de CMV. pJV7387 se cortó con *Nde1* y *Ssp1* para aislar un fragmento de inserto que contenía el extremo 3' del promotor de CMV, el exón 1/2 (parcial) de CMV, RIA y el extremo 5' de la 5'-UTR de HBsAg. Estos fragmentos de inserto se insertaron en pJV7392 del que se retiró el fragmento *Hind3-Ssp1* dando como resultado pJV7400.

(d) pJV7401 (CMV (sin intrones), 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se construyó una versión sin 3'UTR de pJV7399 de la siguiente manera. pJV7391 se cortó con *Bsp120I* y *Bgl2* para aislar un fragmento de inserto que contenía el extremo 3' del gen gD de VHS2. pJV7284 se cortó con *Bgl2* y *EcoR1* para aislar la señal de RBGpA. Estos fragmentos de inserto se insertaron en pJV7399 del que se retiró el fragmento *Bsp120I - EcoR1*, dando como resultado pJV7401.

(e) pJV7402 (CMV (RIA), 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se construyó una versión sin 3'UTR de pJV7400 de la siguiente manera. pJV7391 se cortó con *Bsp120I* y *Bgl2* para aislar un fragmento de inserto que contenía el extremo 3' del gen gD de VHS2. pJV7284 se cortó con *Bgl2* y *EcoR1* para aislar la señal de RBGpA. Estos fragmentos de inserto se ligaron en pJV7400 del que se retiró el fragmento *Bsp120I- EcoR1*, dando como resultado pJV7402.

Ejemplo 3. Construcción de paneles de vectores del antígeno M2 de la gripe

(a) pJV7450 (CMV/sin intrón), 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Una región codificante de M2 de la gripe se sometió a PCR a partir del plásmido pFL-M2 (Joel Haynes, PJV) usando los cebadores JF301 (SEC ID N° 23) y JF302 (SEC ID N° 24) y se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para generar un fragmento de inserto. pJV7401 se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7450.

(b) pJV7452 (CMV (sin intrón), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Un fragmento 3'UTR se sometió a PCR a partir de pJV7389 con los cebadores JF84 (SEC ID N° 25) y JF225 (SEC ID N° 26), se cortó con *Bsp120I*, se cargó con ADN polimerasa T4, y se unió con engarces *Bgl2* (cat N° 1036, New England Biolabs). El fragmento se cortó después con *Bgl2* y *EcoR1* para aislar un fragmento de inserto que contenía la 3'UTR de HBsAg y la región BGpA. pJV7450 se cortó con *Bgl2* y *EcoR1* para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7452.

(c) pJV7458 (CMV (RIA) 5 'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se construyó una versión de pJV7450 que contenía el RIA de la siguiente manera: pJV7389 se cortó con *BamH1* para aislar un fragmento de inserto que contenía RIA. pJV7450 se cortó con *BamH1* para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7458.

(d) PJV7468 (CMV (RIA), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se construyó una versión de pJV7458 que contenía la 3' UTR de HBsAg de la siguiente manera: pJV7452 se cortó con *Bgl2* y *EcoR1* para producir un fragmento de inserto que contenía la 3'UTR de HBsAg y RBGpA. pJV7458 se cortó con *Bgl2* y *EcoR1* para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7468.

Ejemplo 4. Construcción de paneles vectores de beta-gal(a) pJV7488 (CMV (sin intrón), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

Se sometieron a PCR CMV beta (Clontech) con los cebadores JF335 (SEC ID N° 27) y JF336 (SEC ID N°: 28) y se cortaron con *Nhe*1 y *Bgl*2 para aislar un fragmento de inserto que codificaba beta-galactosidasa. pJV7452 se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7488.

(b) pJV7533 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

pJV7450 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento de inserto que contenía el RBGpA. pJV7488 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7533.

(c) pJV7551 (CMV (RIA/*Nhe*1), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

pJV7530 (véase el Ejemplo 5) se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto que contenía el promotor de CMV hasta RIA. pJV7488 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7551.

(d) pJV7552 (CMV (RIA/*Nhe*1), 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

pJV7530 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto que contenía el promotor de CMV hasta RIA. pJV7533 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7552.

Ejemplo 5. Construcción de pJV de expresión (pJV7563)(a) pJV7496

pJV7389 se sometió a PCR con los cebadores JF357 (SEC ID N° 29) y JF365 (SEC ID N° 30), se trató con ADN polimerasa T4 para hacer los extremos romos, y se cortó con *Sal*1 para aislar un fragmento de inserto que codificaba resistencia a kanamicina. pJV7389 se cortó con *Ava*1, se trató con ADN polimerasa T4 para hacer los extremos romos y se cortó con *Sal*1 para aislar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7496.

(b) pJV7530

pJV7389 se sometió a PCR con los cebadores JF393 (SEC ID N° 31) y JF406 (SEC ID N° 32) y se cortó con *Bgl*2 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto que contenía el RIA desprovisto de un sitio de *Nhe*1 interno. pJV7496 se cortó con *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7530.

(c) pJV7549

pJV7468 se cortó con *Bam*H1 y *Eco*R5 para aislar un fragmento de inserto que contenía M2 y parte del 3'ENH de VHB. pJV7530 se cortó con *Bam*H1 y *Eco*R5 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7549.

(d) pJV7563

Los cebadores JF256 (SEC ID N° 33) y JF257 (SEC ID N° 34) se hibridaron para preparar un fragmento de inserto consistente en un sitio de clonación múltiple. pJV7549 se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7563. Se proporcionó un mapa plasmídico de pJV7563 en la Figura 12. La composición base para el plásmido pJV7563 se proporciona en la Figura 13. Los componentes y su posición en el plásmido pJV7563 son los siguientes:

1-44 Secuencias del transposón 903

45-860 Secuencia codificante de resistencia a kanamicina del transposón 903

861-896 Secuencias del transposón 903

897-902 Sitio *Sal*1

903-1587 Promotor de CMV

1588-1718 Secuencia líder no traducida del gen temprano inmediato de CMV

1719-1724 Fusión de las enzimas de restricción *Bam*H1 y *Bgl*II

1725-1857 Intrón A de insulina de rata

1858-1863 Sitio *Bam*H1

1864-1984 Líder no traducida 5' del antígeno de superficie de VHB

1985-1993 Sitio de clonación de *Nhe1*/codón de partida sintético

1994-2011 Sitios de clonación sintéticos

2012-2544 Potenciador de VHB

2545-2555 Antigua secuencia del vector. Sin aciertos frente a bases de datos de NCBI

5 2556-2686 Región de poliadenilación de beta-globina de conejo

2687-3759 Secuencia del vector pUC19

Ejemplo 6. Construcción de paneles de expresión de péptido señal usando fosfatasa alcalina secretada humana (SEAP) y fragmento Fc de IgG humano (hFc) como antígenos modelo

(i) pJV7507 (hTPA_{sp} y SEAP)

10 pSEAP-Basic (Clontech) se sometió a PCR con los cebadores JF320 (SEC ID N° 35) y JF321 (SEC ID N° 36) después se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para aislar un fragmento de inserto que consistía en el fragmento de SEAP humano. pJV7079 (Macklin, y col) se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7507.

(ii) pJV7508 (hTPA_{sp} y hFc)

15 Se sometió a PCR ADN humano con los cebadores JF386 (SEC ID N° 37) y FCAS (SEC ID N° 38), después se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para aislar un fragmento de inserto consistente en el fragmento Fc de IgG humano. pJV7079 se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7508.

(iii) Preparación de la secuencia codificante del péptido señal de aprotinina

20 Se sometió a PCR el oligo sintético JF354 (SEC ID N° 39) con los cebadores JF355 (SEC ID N° 40) y JF356 (SEC ID N° 41) para generar la secuencia codificante del péptido señal de aprotinina.

(iv) Preparación de la secuencia codificante del péptido señal de extensina de tabaco

Se sometió a PCR el oligo sintético JF348 (SEC ID N° 42) con los cebadores JF349 (SEC ID N° 43) y JF350 (SEC ID N° 44) para generar la secuencia codificante del péptido señal de extensina de tabaco.

25 (v) Preparación de la secuencia codificante del péptido señal de lisozima de pollo.

Se sometió a PCR el oligo sintético JF351 (SEC ID N° 45) con los cebadores JF352 (SEC ID N° 46) y JF353 (SEC ID N° 47) para generar la secuencia codificante del péptido señal de lisozima de pollo.

(a) Paneles de péptido señal de antígeno M2 de la gripe

pJV7499 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de aprotinina)

30 pJV7497 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HbsAg, RBGpA, p.s. de extensina de tabaco)

PJV7500 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HbsAg, RBGpA, p.s. de lisozima de pollo)

Las secuencias codificantes de los péptidos señal se cortaron con *Spe1* y *Nhe1* para aislar fragmentos de inserto. pJV7450 se cortó con *Nhe1* para preparar un fragmento del vector en el que se ligaron los fragmentos de inserto, dando como resultado pJV7499 (aprotinina), pJV7497 (extensina de tabaco) y pJV7500 (lisozima de pollo).

35 (b) Paneles de péptido señal de SEAP

pJV7513 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de aprotinina)

pJV7512 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HbsAg, RBGpA, p.s. de extensina de tabaco)

pJV7510 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HbsAg, RBGpA, p.s. de lisozima de pollo)

40 pJV7499; 7497 y 7500 se cortaron con *Xho1* y *Nhe1* para aislar un fragmento de inserto consistente en el promotor de CMV hasta la secuencia codificante del péptido señal de los plásmidos. pJV7507 se cortó con *Xho1* y *Nhe1* para preparar un fragmento de vector en el que se ligaron los fragmentos de inserto, dando como resultado pJV7513 (aprotinina), pJV7512 (extensina de tabaco) y pJV7510 (lisozima de pollo).

(c) Paneles de péptido señal de hFc

pJV7524 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de aprotinina)

pJV7525 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de extensina de tabaco)

pJV7526 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HbsAg, RBGpA, péptido señal de lisozima de pollo)

- 5 pJV7499, 7497 y 7500 se cortaron con *Xho*1 y *Nhe*1 para aislar un fragmento de inserto consistente en el promotor de CMV hasta la secuencia codificante del péptido señal de los plásmidos. pJV7508 se cortó con *Xho*1 y *Nhe*1 para preparar un fragmento de vector en el que se ligaron los fragmentos de inserto, dando como resultado pJV7524 (aprotinina), pJV7525 (extensina de tabaco) y pJV7526 (lisozima de pollo).

Ejemplo 7. Construcción de paneles de fosfatasa alcalina secretada humana (SEAP)

- 10 (a) pJV7531 (CMV (sin intrón), 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de lisozima de pollo)

pJV7510 se cortó con *Sal*1 y *Bgl*2 para aislar un fragmento de inserto que contenía el promotor de CMV hasta el péptido señal de lisozima. pJV7450 se cortó con *Sal*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7531.

(b) pJV7554 (CMV (RIA/*Nhe*1), 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de lisozima de pollo)

- 15 pJV7530 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto que contenía el promotor de CMV hasta RIA. pJV7531 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7554.

(c) pJV7568 (CMV (sin intrón), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de lisozima de pollo)

- 20 pJV7563 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento de inserto que contenía la 3'UTR de VHB y RBGpA. pJV7531 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7568.

(d) pJV7572 (CMV (RIA/*Nhe*1), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg, RBGpA, p.s. de lisozima de pollo)

- 25 pJV7563 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento de inserto que contenía la 3'UTR de VHB y RBGpA. pJV7554 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7572.

Ejemplo 8. Construcción de vectores de beta-gal y HBsAg usando los intrones de queratina de pollo y actina cardiaca de pollo

(a) pJV7557 (beta-gal, CMV (intrón cA), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

- 30 Se sometió a PCR ADN de pollo con los cebadores JF430 (SEC ID N° 48) y JF442 (SEC ID N° 49) y se cortó con *Bgl*2 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto consistente en las secuencias de intrón y exón flanqueante de actina cardiaca de pollo. pJV7488 se cortó con *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7557.

(b) pJV7558 (beta-gal, CMV (intrón cK), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

- 35 Se sometió a PCR ADN de pollo con los cebadores JF421 (SEC ID N° 50) y JF444 (SEC ID N° 51) y se cortó con *Bgl*2 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto consistente en las secuencias de intrón y exón flanqueante del gen de queratina de pollo. pJV7488 se cortó con *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7558.

(c) pJV7578 (HBsAg, CMV (intrón cA), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

- 40 pJV7557 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto consistente en el promotor de CMV hasta las regiones de intrón. pJV7496 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7558.

(d) pJV7579 (HBsAg, CMV (intrón cK), 3'UTR de HBsAg, 5'UTR de HBsAg y RBGpA)

- 45 pJV7558 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto consistente en el promotor de CMV hasta las regiones de intrón. pJV7496 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector en el que se ligó el fragmento de inserto, dando como resultado pJV7579.

Ejemplo 9. Análisis *in vitro* de la expresión de antígenos por paneles de vector de HBsAg

El día uno, se sembraron células SCC15 (ATCC) o B16 (origen desconocido, versiones disponibles en ATCC) en placas de cultivo tisular de 6 pocillos a confluencia del 20-40 %, y se permitió que crecieran durante una noche en un incubador. Las células huésped se propagaron en medio recomendado por ATCC.

- 5 El día dos, se realizó la reacción de transfección. Para cada vector para ensayar, se añadieron 20 µl de reactivo Lipofectin® (Life Technologies Inc, Grand Island, NY) a 180 µl de medio Optimem® (Life Technologies, Grand Island, NY), y se permitió que se incubaran a temperatura ambiente durante 45 minutos. Para cada vector para ensayar, se mezclaron 2 µg de vector en 200 µl de Optimem® a 40 minutos. A los 45 minutos, las soluciones de vector y Lipofectin® se mezclaron entre sí y se permitió que reposaran a temperatura ambiente durante 10 minutos adicionales. Durante esta incubación final, las células huésped sembradas se retiraron del incubador y se lavaron dos veces con medio Optimem®. A los 10 minutos, se añadieron 1,6 ml de Optimem® a la mezcla de Lipofectin®/vector, y se añadió 1 ml de la mezcla resultante a cada uno de los dos pocillos celulares. Las células hospedadoras se devolvieron al incubador y se permitió que reposaran sin perturbaciones durante 5 horas, momento en el cual se retiró la mezcla de Lipofectin®/vector y se reemplazó por medio de mantenimiento celular convencional.
- 10 A las 18 a 24 horas después del cambio de medio, se retiraron de 50 a 100 µl de medio de mantenimiento celular de las placas de cultivo tisular y se analizaron con respecto a expresión de antígenos colocando las muestras en recipientes de reacción proporcionados en el kit de diagnóstico monoclonal AUSZYME® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El volumen de las muestras de ensayo se llevó hasta un volumen de 200 µl con PBS, después se añadieron 50 µl de conjugado y una perla de reacción a cada muestra. El recipiente se incubó durante 80 minutos a 40 °C, después de lo cual los pocillos se lavaron de todos los componentes de reacción líquidos. Las perlas se transfirieron a nuevos tubos después de lo cual se añadieron 300 µl de tampón de desarrollo del color. A los 30 minutos, la reacción del desarrollo del color se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1 M, y se midió la absorbancia de la reacción a 490 nm. Los datos mostrados en la Figura 1 son las lecturas de absorbancia medias de los pocillos por duplicado de dos experimentos.
- 20 Como se muestra en la Figura 1, la adición de RIA, la 3'UTR de VHB o ambos elementos a un vector base (promotor de CMV, exón y región de poliadenilación) aumentó la expresión de HBsAg en células SCC15. Como se muestra en la Figura 2, la adición de la queratina de pollo o el intrón de actina cardiaca de pollo a un vector base (promotor de CMV, exón, 3'UTR de HBV y región de poliadenilación) aumentó la expresión de HBsAg en células SCC15.

Ejemplo 10. Análisis *in vitro* de la expresión de antígenos por paneles de vectores de beta-gal

- 30 Se transfectaron células huésped SSC-1 5 o B16 como se ha descrito en el Ejemplo 9.
- A las dieciocho a cuarenta horas después del cambio de medio, se retiraron los sobrenadantes del medio y las células se lavaron con PBS. Después de la retirada del lavado, las células se lisaron incubando las células en 500 µl de tampón de lisis (NaPO₄ 50 mM, Triton X-100 0,1 %, pH 7) durante 5 minutos, seguido de raspado físico de las células de la placa de plástico. Los lisados se microcentrifugaron durante dos minutos para retirar los residuos celulares, y se añadieron de 10 a 25 µl del lisado clarificado a 500 µl del tampón de reacción (o-nitrofenil galactopiranosido 80 µg/ml, NaPO₄ 50 mM, pH 7) y se incubaron a 37 °C durante 10 a 20 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 500 µl de Na₂CO₃ 1 M y se leyó a 405 nm. Los datos se presentan como la relación de la expresión de vector potenciado (que contiene un intrón, enh de VHB o ambos) y un vector de base.
- 35 La adición de RIA, la 3'UTR de VHB o ambos elementos a un vector base (promotor de CMV, exón y región de poliadenilación) aumentó la expresión de beta-gal en ambas líneas celulares. Los resultados para células SCC15 se muestran en la Figura 3. La adición de la queratina pollo o el intrón de actina cardiaca de pollo a un vector base (promotor de CMV, exón, la 3'UTR de VHB y región de poliadenilación) aumentó la expresión de beta-gal en ambas líneas celulares. Se muestran los resultados para células B16 en la Figura 2.
- 40

Ejemplo 11. Análisis *in vitro* de la expresión de antígenos por el panel de vectores de gD de VHS

- 45 Se transfectaron células huésped SCC15 o B16 como se ha descrito en el Ejemplo 9. Dieciocho horas después de la transfección, las placas se colocaron en hielo durante 15 minutos. Cada pocillo se lavó después con 2 ml de PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD). Las células se fijaron con glutaraldehído 0,05 % (Polysciences Inc, Warrington, PA) diluido en PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todas las incubaciones posteriores duraron 1 hora a temperatura ambiente y los lavados entre cada incubación fueron como se ha indicado anteriormente. Las placas se bloquearon con 2 ml de leche en polvo al 5 % (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) en PBS. Continuaron incubaciones con 1 ml de una dilución 1:1000 de anti-gD monoclonal (ABI, Columbia, MD) en leche en polvo 2 %/ PBS/ Tween-20 0,05 % (Sigma, St. Louis, MO) y 1 ml de una dilución 1:2500 de HRP anti-ratón de cabra (KPL, Gaithersburg, MD) en PBS/Tween-20 0,1 %. El color se desarrolló usando 1 ml del sustrato de microwell TMB (BioFX, Owings Mills, MD). Las reacciones se detuvieron con H₂SO₄ 1 M, el líquido se transfirió a cubetas de plástico y se leyó la densidad óptica a 450 nm. Los datos se presentan como la relación de la expresión de vector potenciado (que contiene un intrón, enh de VHB, o ambos) y un vector base.
- 50
- 55

La adición de RIA con o sin la 3'UTR de VHB a un vector base (promotor de CMV, exón y región de poliadenilación) aumentó la expresión de gD de VHS en ambas líneas celulares. Se muestran los resultados para células SCC15 en la Figura 4.

Ejemplo 12. Análisis *in vitro* de la expresión de antígenos por paneles de vectores de SEAP

5 Se transfectaron células huésped SCC15 o B16 como se ha descrito en el Ejemplo 9. A las dieciocho a cuarenta horas después del cambio de medio, se retiraron los sobrenadantes del medio y se calentaron a 70 °C durante 30 minutos. Se incubaron de 10 a 25 µl de los sobrenadantes activados por calor durante 5 minutos con 1/10 del volumen de 1-homoarginina 100 mM. Se añadieron 500 µl de tampón de reacción de fosfatasa alcalina (Cat N° 172-1063, Bio-Rad, preparado de acuerdo con las instrucciones) a los lisados y se incubaron a 37 °C durante 10 a 20 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 500 µl de NaOH 1 M y se leyó a 405 nm. Los datos se presentan como la relación de la expresión de vector potenciado (que contiene un intrón, enh de VHB, o ambos) y un vector base, o la relación de la expresión de los péptidos señal experimentales y el vector del péptido señal de TPA humano.

15 Como se muestra en la Figura 5, la adición de RIA, la 3'UTR de VHB o ambos elementos a un vector base (promotor de hCMV, exón y región de poliadenilación) aumentó la expresión de SEAP en células B16. Inesperadamente, solamente la adición de la 3'UTR de VHB a un vector base (promotor de CMV, exón y región de poliadenilación) aumentó la expresión de SEAP en células SCC15.

20 La adición de péptidos señal de aprotinina bovina, lisozima de pollo o extensina de tabaco al extremo N-terminal de SEAP madura permitió la secreción eficaz de SEAP en sobrenadantes del medio celular de ambas líneas celulares. Se muestran los resultados para las células B16 en la Figura 6.

Ejemplo 13. Análisis *in vitro* de la expresión de antígeno por el panel de péptido señal del fragmento Fc de IgG humano

Se transfectaron células huésped SCC15 o B16 como se ha descrito en el Ejemplo 9. Los sobrenadantes del medio se retiraron de dieciocho a cuarenta horas después del cambio de medio.

25 Se incubaron placas de ELISA (Costar) a 4 °C con 100 µl de IgG de cabra anti-humano (Sigma N° 13382, dilución 1/1000 en tampón de revestimiento de carbonato) por pocillo. Todas las incubaciones posteriores duraron 1 hora a temperatura ambiente con lavados (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Brij-35 0,1%, pH 8,0) entre cada incubación. Los pocillos se bloquearon después con 100 µl de PBS seco al 5 %, seguido de incubación con sobrenadantes de medios diluidos en serie en tampón de dilución (leche en polvo 2 %, PBS, Tween-20 0,05 %). Esto se siguió de incubación con 100 µl de IgG anti-humano de cabra/HRP (Sigma N° A6029, dilución 1/5000 en tampón de dilución) por pocillo, seguido de desarrollo del color usando 100 µl de sustrato de microwell TMB. Las reacciones se detuvieron con 100 µl de H₂SO₄ 1 M, y se leyeron a 450 nm. Los datos se presentan como la relación de la expresión de los péptidos señal experimentales y el vector de péptido señal de TPA humano.

35 La adición de péptido señal de aprotinina bovina, lisozima de pollo o extensina de tabaco al extremo N-terminal del fragmento Fc humano permitió una secreción eficaz de hFc a sobrenadantes del medio celular de ambas líneas celulares. Se muestran los resultados para células B16 en la Figura 6.

Ejemplo 14. Uso de los vectores de expresión plasmídicos HBsAg, gD de VHS y M2 de la gripe para inmunización de ratones

a. Preparación de cartuchos de inmunización

40 Para cada plásmido para ensayar, se pesaron 25 mg de polvo de oro de 2 µm en un tubo de microcentrifuga. Después de la adición de una alícuota de 250 µl de espermidina 50 mM (Aldrich Chemical, Inc., Milwaukee, WI), el tubo se agitó vorticialmente y se sonicó brevemente. El oro se sedimentó por microcentrifugación, y la espermidina se reemplazó por una nueva alícuota de 100 µl. El oro se resuspendió agitando vorticialmente, después de lo cual se añadieron 25 µg de ADN al tubo y se mezclaron. Mientras el tubo se agitaba vorticialmente suavemente, se añadieron 100 µl de CaCl 10 % (Fujisawa USA, Inc, Deerfield, IL) para precipitar el ADN en las perlas de oro. Se permitió que la reacción de precipitación continuara durante 10 minutos sobre la mesa, después de lo cual el oro se recogió por una breve microcentrifugación y se lavó tres veces con etanol absoluto (Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) para retirar el exceso de reactivos de precipitación. El complejo de oro/ADN lavado se resuspendió después en 3,6 ml de polivinilpirrolidona 0,05 mg/ml (360KD, Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) en etanol absoluto. Esta suspensión se inyectó después en un tubo Tefzel® (McMaster-Carr, Chicago, IL) localizado en un torno de tubos (PowderJect Vaccines) que reviste el interior del tubo Tefzel® con el complejo de oro/ADN. Después de completarse el procedimiento de giro del tubo, el tubo se cortó en "dosis" de 1,27 cm de vacuna que se cargaron en el dispositivo XR1 (PowderJect Vaccines) para suministro a los ratones.

b. Procedimiento de vacunación

Se anestesiaron ratones de cuatro a seis semanas de edad con una mezcla de Ketaset® (Fort Dodge) y Rompun® (Bayer). Se afeitaron los vientres con un par de cortadores eléctricos para retirar el pelo, y se suministraron dos “dosis” no solapantes de vacuna mediante el dispositivo XR1 (3,1 MPa) al área afeitada. Los animales se devolvieron a sus jaulas y se tomaron muestras sanguíneas a las seis semanas después de la vacunación. Se usaron ratones Balb/c para evaluar los vectores de expresión de HBsAg, y se usaron ratones Swiss Webster para evaluar los vectores de expresión de gD de VHS y M2 de la gripe.

Análisis de sueros con respecto a anticuerpos anti-HBsAg

A las seis semanas, se recogieron muestras de sangre de animales vacunados. Se colocó un volumen de suero aislado de estas muestras en pocillos de un recipiente de reacción proporcionado con el kit de diagnóstico EIA AUSAB® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El volumen de suero añadido dependía del título de anticuerpo de la muestra, y la muestra se diluyó con tampón de dilución de muestras para que quedara dentro de valores que podían obtenerse con un panel de cuantificación. Se añadieron 200 µl de cada frasco del panel de cuantificación AUSAB® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) a pocillos del recipiente de reacción. A cada pocillo se añadió una perla, después de lo cual el recipiente se selló y se incubó durante dos horas a 40 °C. Los pocillos se lavaron después de todos los componentes de reacción líquidos. A cada pocillo lavado se añadieron 200 µl de mezcla de conjugados, después de lo cual el recipiente se selló y se incubó durante dos horas a 40 °C. Los pocillos se lavaron después de todos los componentes de reacción líquidos. Las perlas se transfirieron a tubos nuevos después de lo cual se añadieron 300 µl de tampón de desarrollo del color. A los 30 minutos, la reacción de desarrollo del color se detuvo mediante la adición de ácido sulfúrico 1 M, y la absorbancia de las reacciones se midió a 490 nm en un espectrofotómetro Quantum II® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Este espectrofotómetro calcula los niveles de anticuerpo de una muestra comparando la absorbancia de la muestra con una curva patrón generada con el panel de cuantificación. Estos niveles de anticuerpo se corrigieron después con respecto a factores de dilución. Los datos mostrados en la Figura 7 son los títulos de media geométrica de todos los animales vacunados con un vector particular.

Análisis de sueros para anticuerpos anti-antígeno M2 de la gripe

Se revistieron placas de ELISA de unión al medio Costar de 96 pocillos (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) con un péptido M2 de la gripe sintético (Biowhittaker, Walkerville, MD) a una concentración de 1 µg/ml en PBS (QCB/ Biosource, Hopkinton, MA) y se incubó durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con Tris 10 mM (Sigma, St. Louis, MO)/NaCl 150 mM (Fisher Scientific)/Brij-35 0,1 % (Sigma), después se bloquearon con leche en polvo al 5 % (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las incubaciones posteriores fueron a temperatura ambiente durante una hora y los lavados entre cada incubación fueron como se ha indicado anteriormente. Se diluyeron sueros de ratón de muestra, un patrón (alto título, sueros de ratón anti-M2) y un control negativo (sueros de ratón anti-HBsAg) en leche en polvo al 2 %/PBS Tween-20 0,05 % (Sigma) y se incubaron en las placas de ELISA. Se continuó con anticuerpo conjugado con biotina de cabra anti-IgG (H + L) de ratón (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL) diluido 1:8000 en leche en polvo 2 %/PBS/ Tween-20 0,05 % y conjugado de peroxidasa de rábano rusticano-estreptavidina (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en PBS/Tween-20 0,1 %. Se desarrolló el color usando sustrato de TMB (BioFX, Owings Mills, MD). Las reacciones se detuvieron con H₂SO₄ 1 M y las placas se leyeron a 450 nm con un lector de microplacas de precisión Emax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se usó software SoftMax Pro 4.1 (Molecular Devices) para calcular los títulos de puntos finales usando un análisis de cuatro parámetros. Los títulos se normalizaron al suero convencional, que tenía un título predeterminado, para minimizar la variación entre ensayos y entre placas. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Análisis de sueros para anticuerpos anti-antígeno gD de VHS

Se revistieron placas de ELISA de unión a medio Costar de 96 pocillos (Fisher Scientific Pittsburgh, PA) con proteína gD de VHS (Viral Therapeutics, Ithaca, NY) a una concentración de 1 µg/ml en PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con Tris 10 mM (Sigma, St. Louis, MO)/NaCl 150 mM (Fisher Scientific)/Brij-35 0,1 % (Sigma), después se bloquearon con leche en polvo al 5 % (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas las incubaciones posteriores fueron a temperatura ambiente durante una hora y los lavados entre cada incubación fueron como se ha indicado anteriormente. Se diluyeron sueros de ratón de muestra, un patrón (alto título, suero de ratón anti-gD) y un control negativo (suero de ratón anti-HBsAg) en leche en polvo 2 %/PBS/Tween-20 0,05 % (Sigma) y se incubaron en las placas de ELISA. Se siguió con anticuerpo conjugado con biotina anti-IgG (H + L) de ratón de cabra (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL) diluido 1:8000 en leche en polvo 2 %/PBS/Tween-20 0,05% y conjugado de peroxidasa de rábano rusticano-estreptavidina (Southern Biotechnology) diluido 1:8000 en PBS/Tween-20 0,1 %. El color se desarrolló usando sustrato de TMB (BioFX, Owings Mills, MD). Las reacciones se detuvieron con H₂SO₄ 1 M y las placas se leyeron a 450 nm con un lector de microplacas de precisión Emax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se usó software SoftMax Pro 4.1 (Molecular Devices) para calcular los títulos de puntos finales usando un análisis de cuatro parámetros. Los títulos se normalizaron al suero convencional, que tenía un título predeterminado, para minimizar la variación entre ensayos y entre placas. Los resultados se muestran en la Figura 7.

En consecuencia, se han descrito nuevas construcciones de ácido nucleico, composiciones que comprenden estas construcciones y técnicas de inmunización de ácido nucleico usando estas construcciones. Aunque se han descrito con cierto detalle realizaciones preferidas de la invención objeto, se entiende que pueden realizarse variaciones evidentes sin alejarse del espíritu y el alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JAMES FULLER
 <120> CONSTRUCCIONES DE ÁCIDOS NUCLEICOS
 <130> APF 33 (X.13149 GCW)

10 <160> 53

<170> PatentIn versión 3.1

15 <210> 1
 <211> 685
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

20 <400> 1

```

aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatata ataatatgta catttatatt      60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa      120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tcgcggttac ataacttacg      180
gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg      240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta      300
cggtaaaactg ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gcccctatt      360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcttg cattatgcc agtacatgac ctaacgggac      420
tttccactatt ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgoggttt      480
tggcagtaca ocaatggcg tggatagcgg ttgactcac ggggatttcc aagtctccac      540
ccattgaag tcaatgggag ttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt      600
cgttaataacc cgcgccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat      660
ataagcagag ctggtttagt gaacc                                     685

```

25 <210> 2
 <211> 131
 <212> ADN
 <213> Citomegalovirus humano

<400> 2

```

gtcagatgcg ctggagacgc catcacgct gttttgacct ccatagaaga cacogggacc      60
gatccagcct ccgcggcgg gaacgggtgca ttggaacgcg gattccccgt gccagagtg      120
actcaccgtc c                                     131

```

35 <210> 3
 <211> 135
 <212> ADN
 <213> *Rattus rattus*

<400> 3

```

atcagcaagc aggtatgtac tctccaggtt gggcctggct tccccagtca agactccagg      60
gatttgaggg acgtgtgtgg ctcttctctt acatgtacct ttgctagcc tcaaccctga      120
ctatcttcca ggta                                     135

```

40 <210> 4

<211> 955
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia promotora química

<400> 4

```
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatato ataatatgta ctttatatt 60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 120
tcaattacgg ggtoattagt tcatagccca tataatggagt tcogcggtac ataacttacg 180
gtaaatggcc cgcttggtg acogcccaac gaccccgcc cattgaogtc aataatgacg 240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 300
cggtaaacgt ccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gcccctatt 360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgccctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac 420
tttctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatogcta ttaccatggg gatgcggttt 480
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg ttgtactcac ggggatttcc aagtctccac 540
ccattgacg tcaatgggag ttgttttgg caocaaaatc aacgggaact tccaaaatgt 600
cgtaataacc cggcccggtt gacgcaaag ggcggtaggc gtgtacgggt ggaggtctat 660
ataagcagag ctogtttagt gaaccgtcag atcgccctga gaogccatcc acgctgtttt 720
gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgag gocgggaacg gtgcattgga 780
acgcggattc ccogtgccaa gactgactca cogtcoggat ctacagcaagc aggtatgtac 840
tctccaggtt gggcctggct tccccagtc agactccagg gatttgaggg acgctgtggg 900
cttttctctt acatgtacct ttgtcttgc tcaacctga ctatcttcca ggtca 955
```

10

<210> 5
<211> 121
<212> ADN
15 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 5

```
cagagtcagg ggtctgtatt ttctgtctgg tggctccagt tcaggaacag taaacctgc 60
tccgaatatt gcctctcaca tctgtcaat ctccgcgagg actggggacc ctgtgacgaa 120
```

```
c 121
```

20

<210> 6
<211> 57
<212> ADN
25 <213> Virus del Herpes simple

<400> 6
ataagctgca ttgcgaacca ctatgcgcg ttttctgtgt gcatgcgta tcacggc 57

30

<210> 7
<211> 48
<212> ADN
35 <213> Virus de la hepatitis B

<400> 7
ctttgtacta ggaggctgta ggcataaatt ggtctgttca ccagcacc 48

35

<210> 8

<211> 533
<212> ADN
<213> Virus de la hepatitis B

5 <400> 8

```

taacaaaaca aaaagatggg gttattccct aaacttcatg ggttacgtaa ttggaagttg      60
ggggacattg ccacaagatc atattgtaca aaagatcaaa cactgtttta gaaaacttcc      120
tgtaaacagg cctattgatt ggaaagtatg tcaaaggatt gtgggtcttt tgggctttgc      180
tgctocattt acacaatgtg gatatcctgc cttaatgcct ttgtatgcat gtatacaagc      240
taaacaggct ttcactttct cgcacaacta caaggccttt ctaagtaaac agtacatgaa      300
cctttacccc gttgctoggc aacggcctgg tctgtgccaa gtgtttgtgt acgcaacccc      360
cactgggtgg ggcttggcca taggcatcca gcgcattggt ggaacctttg tggctcctct      420
gcgatccat actgcggaac tcctagcgcg ttgttttgot cgcagccggt ctggagcaaa      480
gctcatagga actgacaatt ctgtogtctc ctgcgggaaa tatacatogt ttc          533

```

<210> 9
<211> 158
<212> ADN
<213> Citomegalovirus de simio

10

<400> 9

15

```

gtcagacaga cagacagtta tatgggctgg tcctataaac tctgocattg taaccccata      60

tagccagaca gttagcattg catctattga tgatgtacta atgtattgta accccccta      120
tgccattgtc taactgtact aatgtatgat attatacc          158

```

<210> 10
<211> 131
<212> ADN
<213> *Oryctolagus cuniculus*

20

<400> 10

```

gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccocctga gcatctgact      60
tctggctaataaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc      120
tcaactcggaag          131

```

25

<210> 11
<211> 204
<212> ADN
<213> Citomegalovirus de simio

30

<400> 11

```

atatatactc tatgttatac totatgatat acaatatata ctcatgaaca ctatgtactt      60
ggtgtatgac tcattattgt ctgggacttg gttgggactt ggttggttgg gaagaatgtt      120
gtgcctgtac ttgtgctgtg ctgtggatct caataaatgt gactatgttc aaaacactaa      180
gtgcccccggt gtcttcttta acta          204

```

35

<210> 12
<211> 163
<212> ADN
<213> Virus del herpes simple 2

	<400> 12	
	gaagacgagc tctaagggag gggaggggag ctgggcttgt gtataaataa aaagacaccg	60
	atgttcaaaa atacacatga cttctggtat tgttttgcoo ttggttttat ttgggggggg	120
	gggggctgt gactagaaaa acaaatgcag acatgtgcta acg	163
5	<210> 13 <211> 191 <212> ADN <213> Papilomavirus humano de tipo 16	
10	<400> 13	
	aattgttaca tataattgtt gtataccata acttactatt ttttcttttt tattttcata	60
	tataatttttt ttttttgttt gtttgtttgt tttttaataa actgttatta cttacaatg	12
	cgacacaaac gttctgcaaa acgcacaaaa cgtgcacgg ctaccact ttataaaca	180
	tgcaaacagg c	191
15	<210> 14 <211> 3759 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Vector de expresión pJV	
25	<220> <221> Intrón <222> (1725)..(1857) <223> IntA de Ins de rata	
30	<220> <221> misc_feature <222> (1) .. (44) <223> Tn903, restos de pUC4K	
35	<220> <221> misc_feature <222> (861) .. (896) <223> Tn903, restos de pUC4K	
40	<220> <221> misc_feature <222> (897) .. (902) <223> pUC19 MCS	
45	<220> <221> señal de poliA <222> (2556) .. (2686) <223> rGLOB pA	
50	<220> <221> sitio de poliA <222> (2647)..(2647) <223> Sitio de poliA 1	
55	<220> <221> promotor <222> (903)..(1587) <223> Pro de CMV	

	<220>
	<221> 3'UTR
	<222> (2012)..(2544)
5	<223> enh de VHB
	<220>
	<221> 5'UTR
	<222> (1864)..(1984)
10	<223> 5'-UTR de pre-S2 de VHB
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1719)..(1724)
15	<223> fusión de Bam/Bgl
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1985)..(1987)
20	<223> ATG-Nhe
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (1988)..(2011)
25	<223> Sitio de inserción de CDS
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2545)..(2555)
30	<223> desconocido
	<220>
	<221> exón
	<222> (1588) .. (1718)
35	<223> Exón 1/2 de CMV
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (2693)..(3759)
40	<223> pUC19
	<220>
	<221> misc_feature
	<222> (45)..(860)
45	<223> complemento de KanR (Tn903)
	<400> 14

ggogtaatgc tctgocagtg ttacaacca ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
 agcatdaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120
 agocgtttct gtaatgaagg agaaaactca cagaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
 tgggtatcggc ctgogattcc gactogtcca acatcaatac aacctattaa tttccctctg 240
 tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgaactgaatc cggtagaat 300
 ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 360
 tcaaatcac tcgcatcaac caaacogtta ttcattogtg attgogcctg agcagacga 420
 aatacgogat cgtgtttaa aggacaatta caaacaggaa tgaatgcaa cggcgccagg 480
 aacactgcca gcgcataca aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 540
 aatgctgttt tcccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600
 aatgcttga tggctggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 660
 tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaccaactc tggcgcatcg 720
 ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 780
 ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaato gcggcctcga gcaagacggt 840
 tccggttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggctg 900
 acaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata 960
 ttggctcatg tccaatatga ccgccatggt gacattgatt attgactagt tattaatagt 1020
 aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 1080
 cggtaaatgg ccgcctgga tgacgcacca acgacccccc cccattgaag tcaataatga 1140
 ogtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1200
 tacggtaaac tgccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta 1260
 ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccgcctt ggcattatgc ccagtacatg accttacggg 1320
 aotttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaocatg gtgatcggt 1380
 tttggcagta caocaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc 1440
 accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa tcaacgggac tttccaaaat 1500
 gtcgtaataa cccgcctccg ttgacgcaa tggcggttag gcgtgtaagg tgggaggtct 1560
 atataagcag agctcgttta gtgaacc gtc aga tgc cct gga gac gcc atc cac 1614

Val Arg Ser Pro Gly Asp Ala Ile His

1

5

gct gtt ttg acc tcc ata gaa gac acc ggg acc gat cca gcc tcc ggc 1662
 Ala Val Leu Thr Ser Ile Glu Asp Thr Gly Thr Asp Pro Ala Ser Ala
 10 15 20 25
 gcc ggg aac ggt gca ttg gaa cgc gga ttc ccc gtg cca aga gtg act 1710
 Ala Gly Asn Gly Ala Leu Glu Arg Gly Phe Pro Val Pro Arg Val Thr

30	35	40	
cac cgt cc ggatctcagc aagcaggtat gtactctcca	gggtgggcct ggcttcccca	1768	
His Arg			
gtcaagactc cagggatttg agggacgctg tgggctctto	tcttacatgt accttttgc	1828	
tgctcaacc ctgactatct tccaggtcag gatccagag	tcaggggtct gtattttcct	1888	
gctggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgctccga	atattgcctc tcacatctcg	1948	
tcaatctccg cgaggactgg ggaccctgtg acgaacatgg	ctagcgggccc cagatctggg	2008	
ccctaacaaa acaaaaagat ggggttatto cctaaacttc	atgggttacg taattggaag	2068	
ttgggggaca ttgccacaag atcatattgt acaaaagato	aaacactgtt ttagaaaact	2128	
tctgttaaac aggcctattg attggaagt atgtcaaagg	attgtgggtc ttttgggott	2188	
tgctgctcca ttacacaat gtggatatcc tgcttaatg	cctttgtatg catgtataca	2248	
agctaaacag gctttcactt tctcgccaac ttacaaggcc	tttotaagta aacagtacat	2308	
gaacctttac ccggttgctc ggcaacggcc tggctctgtc	caagtgtttg ctgacgcaac	2368	
ccccactggc tggggcttgg ccataggcca tcagcgcctg	cgtggaacct ttgtggctcc	2428	
tctgcgata catactggg aactoctagc cgcttgttt	gctcgcagcc ggtotggagc	2488	
aaagctcata ggaactgaca attctgtcgt cctctcgcg	aaatatacat cgtttcgatc	2548	
tacgtatgat ctttttccct ctgccaaaaa ttatggggac	atcatgaagc cccttgagca	2608	
tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat ttctattgca	atagtgtgtt ggaattttt	2668	
gtgtctctca ctcggaagga attctgcatt aatgaatcgg	ccaacgcgcg gggagaggcg	2728	
gtttgogtat tgggcgctct tccgcttcc cgtcactga	ctcgcgcgc tcggtcgttc	2788	
ggctgoggcg agcggatatc gctcactcaa agcgggtaat	acgggttatcc acagaatcag	2848	
gggataaogc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca	aaaggccagg aacogtaaaa	2908	
aggcgcggtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc	tgacgagcat cacaaaaatc	2968	
gacgctcaag tcagaggtgg cgaaccocga caggactata	aagataccag gcgtttcccc	3028	
ctggaagcto cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc	gcttaccgga tacctgtccg	3088	
cotttctccc ttcggaagc gtggcgcttt ctcatagctc	acgctgtagg tatctcagtt	3148	
cgggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga	acccccggt cagcccagcc	3208	
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaocc	ggtaagacac gacttatcgc	3268	
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag	gtatgtaggc ggtgctacag	3328	
agttcttgaa gtggtggoot aactacggct aactagaag	aacagtattt ggtatctcgc	3388	
ctctgtgaa gccagttacc ttcgaaaaaa gagttggtag	ctcttgatcc ggcaaaaaa	3448	
ccacogctgg tagcgggtgt ttttttgtt gcaagcagca	gattacgcgc agaaaaaaag	3508	
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga	cgtcagtggt aacgaaaact	3568	
cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat	cttcacotag atccttttaa	3628	
attaaaaatg aagtttttaa tcaatctaaa gtatatatga	gtaaaacttg tctgacagtt	3688	
accaatgott aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg	tctatttcgt tcatccatag	3748	
ttgootgact c		3759	

<210> 15
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 15
 ggaggatccg gacggtgagt cactcttggc acggggaatc cg 42

10 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 16
 ggtgaatatg gctcataaca c 21

 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

30 <400> 17
 ccgccgaaca tggagaacat cgc 23

 <210> 18
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 18
 cacagatctt ttgttaggt ttaaattgat acc 33

 <210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <400> 19
 ggaggatcct gacctggaag atagtcacc 29

 <210> 20
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Cebador

60 <400> 20
 ggaggatcca tcagcaagca ggtatg 26

 <210> 21
 <211> 33
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 21
 ggagctagcg ggcgtttgac ctccggcgtc ggg 33

10 <210> 22
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 22
 ggagaattca gatctcctct agtaaaacaa tggctgg 37

 <210> 23
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 23
 ggagctagcc ttctaaccga ggtcg 25

30 <210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 24
 ggaagatctc ctactccag ctctatgctg 30

40 <210> 25
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <400> 25
 ggcgaattcc ttccgagtga gagacac 27

55 <210> 26
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

60 <400> 26
 ggagtataca tttaaagggc cctaacaaaa caaaaagatg ggg 43

65 <210> 27
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

5 <400> 27
 ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g 31

10 <210> 28
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 28
 ggaagatctc cttatttttg acaccagacc aactgg 36

 <210> 29
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador

30 <400> 29
 ggagtcgacc tgtctgctta cataaacag 29

 <210> 30
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Cebador

40 <400> 30
 cgtaatgctc tgccagtgtt acaacc 26

 <210> 31
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Cebador

50 <400> 31
 gaaagatctc agcaagcagg 20

55 <210> 32
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

60 <400> 32
 ggaggatcct gacctggaag atagtcaggg ttgaggcaag caaaagg 47

65 <210> 33
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador

 5 <400> 33
 ctagcgggcc ca 12

 10 <210> 34
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 34
 gatctgggcc cg 12

 20 <210> 35
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Cebador

 <400> 35
 ggagctagca tcatcccagt tgaggagg 28

 30 <210> 36
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Cebador

 <400> 36
 ggtagatctc ctcatgtctg ctcgaagc 28

 40 <210> 37
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Cebador

 50 <400> 37
 ccaagctagc gacaaaactc acacatgcc 29

 55 <210> 38
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 60 <220>
 <223> Cebador

 <400> 38
 ggaagatctc gtttacc6ct gtcatttacc cggagacagg gagag 45

 65 <210> 39
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido

5 <400> 39
 aagatgtcca gactctgtct ctccgtggcc ctectcgtgc tctcggggac actcgcc 57

10 <210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 40
 ggaactagta agatgtccag actc 24

25 <210> 41
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador

35 <400> 41
 ggaagctagc ggcgagtgct ccgag 25

40 <210> 42
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Oligonucleótido

50 <400> 42
 . ggaagatgg ccagcctctt tgccacattt ctctgtggtgc tcgtgagcct cagcctcgcc 60
 agcgaaagca gcgcc 75

55 <210> 43
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador

65 <400> 43
 ggaactagt gaaagatggc cagc 24

70 <210> 44
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

75 <220>
 <223> Cebador

80 <400> 44
 ggaagctagc ggcgctgctt tcgctg 26

85 <210> 45
 <211> 51

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido

 <400> 45
 aggtcttgc taatcttgg gctttgcttc ctgcccctgg ctgctctggg g 51

 10 <210> 46
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Cebador

 <400> 46
 20 ggaactagta ggtcttgct aatc 24

 <210> 47
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Cebador

 <400> 47
 30 ggaagctagc cccagagca gccag 25

 <210> 48
 <211> 31
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

 <400> 48
 40 ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g 31

 <210> 49
 <211> 25
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador
 50
 <400> 49
 ggaagatctc cggtagtggtg tgctg 25

 <210> 50
 55 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Cebador

 <400> 50
 gcaggatcca gtagacctgg agagaggaca ag 32

 65 <210> 51
 <211> 29

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 51
ggaagatcta caaggtgagc tgctgtggc 29

<210> 52
<211> 490
<212> ADN
<213> Virus de la pseudo rabia

<400> 1

```
tggccgcaga gcgggccggg catgcaaato agaggcgccg gggagacgcc tccgcgcgcc 60
cattggcccg ggcgagccga gatggccgcc gcgggggccg gacatgcaaa gtagacgcga 120
gaggaagtag ggagagaaat cccattggcc gtccgagggg caagatggcg ccccgggggc 180
cggacatgca aagtagacgc gagaggaagt ggcgagagga aatccattg gccgtcgatg 240
gggcaagatg gccgcgcggg gggccgggca tgcaaatggt cctcgcgagg aagttcctcg 300
cgaaatccca ttggccggcg gccgccatct tgggcggggc atgcaaagca gacggcagag 360
gaagoggggc agaaaaatcc cattggcccg ccgtcgggga agtccggggc gaaaatcggc 420
cattggtcgg cttacctggg ggcggggtct cctcgggggc cttataagcg cggctctccat 480
cgtagcactt 490
```

<210> 53
<211> 495
<212> ADN
<213> Virus de sarcoma de Rous

<400> 2

```
ctgtccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagotaca 60
acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc ttagggttag gogttttgcg 120
ctgtctcgcg atgtacgggc cagatatacg cgtatctgag gggactaggg tgtgttttagg 180
cgaaaagcgg gcttcgggtt gtaacgggtt aggagttccc tcaggatata gtagtttcgc 240
ttttgcatag ggagggggaa atgtagtctt atgcaataca cttgtagtct tgcaacatgg 300
taacgatgag ttagcaacat gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tgcgattgg 360
tggaagtaag gtgttacgat cgtgccttat taggaaggca acagacaggt ctgacatgga 420
ttggacgaac cactgaatto cgcattgcag agataattgt atttaagtgc ctagctcgat 480
acaataaaog ccatt 495
```

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico que comprende:
 - (i) una secuencia promotora quimérica que comprende:
 - (a) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV;
 - (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV, siendo dicho exón 1 y al menos una parte del exón 2 contiguos; y
 - (c) un intrón heterólogo que reemplaza completa o parcialmente el intrón A nativo del gen temprano inmediato principal de hCMV;
 - (ii) una secuencia codificante unida operativamente con la secuencia promotora (i) y;
 - (iii) una secuencia potenciadora 3' de, y unida operativamente con, la secuencia codificante (ii); en la que la secuencia potenciadora deriva de una 3'UTR de una secuencia de HBsAg, y la secuencia codificante (ii) es heteróloga de la secuencia potenciadora.
2. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende además una secuencia líder no traducida derivada de la secuencia del antígeno preS2 de VHB, secuencia del antígeno e de VHB y secuencia del antígeno de VHS de tipo 2gD, en la que la secuencia líder está unida operativamente con el promotor y la secuencia codificante y la secuencia codificante es heteróloga de la secuencia líder no traducida.
3. Una construcción de ácido nucleico que comprende:
 - (i) una secuencia promotora quimérica que comprende:
 - (a) una secuencia promotora temprana inmediata de hCMV;
 - (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal de hCMV, siendo dicho exón 1 y al menos una parte del exón 2 contiguos; y
 - (c) un intrón heterólogo que reemplaza completa o parcialmente el intrón A nativo del gen temprano inmediato principal de hCMV,
 - (ii) una secuencia codificante en unión operativa con el promotor quimérico;
 - (iii) una secuencia líder no traducida que se selecciona de la secuencia del antígeno preS2 de VHB, secuencia del antígeno e de VHB y secuencia del antígeno de VHS de tipo 2gD y que está en unión operativa con el promotor quimérico; y
 - (iv) una secuencia potenciadora que deriva de una región no traducida 3' (UTR) de una secuencia de HBsAg, que está en unión operativa con el promotor quimérico y que está cadena abajo de la secuencia codificante.
4. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que:
 - (i) la secuencia promotora temprana inmediata de hCMV (a) comprende SEC ID N° 1, una variante funcional de la misma con al menos 80 % de identidad o un fragmento funcional de una de ellas; y/o
 - (ii) la secuencia de exón (b) comprende SEC ID N° 2, una variante funcional de la misma con al menos 80 % de identidad o un fragmento funcional de una de ellas.
5. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que el intrón heterólogo (c) comprende una secuencia seleccionada de la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata, secuencia del intrón A del gen de queratina de pollo, secuencia del intrón A del gen de actina cardiaca de pollo, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una secuencia de dicho intrón A y un fragmento funcional de una secuencia de dicho intrón A o de dicha variante funcional de las mismas.
6. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 en la que la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata comprende SEC ID N° 3, una variante funcional de la misma con al menos 80 % de identidad, o un fragmento funcional de una de ellas.
7. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que:
 - (i) la secuencia líder no traducida se selecciona de SEC ID N° 5, SEC ID N° 6, SEC ID N° 7, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de SEC ID N° 5 a 7 o un fragmento funcional de una cualquiera de SEC ID N° 5 a 7 o de dicha variante de las mismas; y/o
 - (ii) la secuencia potenciadora se selecciona de SEC ID N° 8, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con SEC ID N° 8 o un fragmento funcional de SEC ID N° 8 o de dicha variante de las mismas.
8. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende:
 - (i) una secuencia de poliadenilación, y/o
 - (ii) una secuencia que codifica un péptido señal.

9. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, en la que:

(i) la secuencia de poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de un gen seleccionado del gen de β -globina de conejo, gen temprano o tardío del virus del papiloma humano (VPH), el gen VSH-2gB, un gen temprano inmediato de CMV de simio y gen tardío de VHSgD, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de dichas secuencias o un fragmento funcional de una cualquiera de dichas secuencias de poliadenilación o dichas variantes funcionales de las mismas; y/o

(ii) el péptido señal se selecciona del péptido señal activador del plasminógeno tisular humano (hTPAsp), péptido señal de aprotinina, péptido señal de extensina del tabaco, péptido señal de lisozima de pollo, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de dichas secuencias o un fragmento funcional de cualquiera de dichas secuencias que codifica el péptido señal o dicha variante funcional de las mismas.

10. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 en la que la secuencia de poliadenilación se selecciona de SEC ID N° 10, SEC ID N° 11, SEC ID N° 12, SEC ID N° 13, una variante funcional con al menos 80 % de identidad con una cualquiera de SEC ID N° 10 a 13 o un fragmento funcional de una cualquiera de SEC ID N° 10 a 13 o de dicha variante de las mismas.

11. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la que la secuencia codificante codifica un antígeno.

12. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 en la que el antígeno es un antígeno de un patógeno viral, bacteriano, parasitario o fúngico, un antígeno de alergia o un antígeno de cáncer.

13. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 12 en la que el antígeno viral es un antígeno de VPH, VIH, VHS1, VHS2, virus de la gripe, virus de hepatitis A o virus de hepatitis B.

14. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13 en la que el antígeno es HBsAg.

15. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la secuencia codificante codifica una subunidad A y/o subunidad B bacteriana que ribosila ADP, un homólogo activo de una o ambos de dichas subunidades en el que cada homólogo tiene al menos 80 % de identidad con dicha subunidad respectiva o un fragmento activo de dicha subunidad o de dicho homólogo activo de los mismos.

16. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la subunidad bacteriana se selecciona de la subunidad A de la toxina del cólera, subunidad B de la toxina del cólera, subunidad A de la toxina lábil por calor de *E. coli*, subunidad B de la toxina lábil por calor de *E. coli*, un homólogo activo que tiene al menos 80 % de homología con una cualquiera de dichas subunidades o un fragmento activo de una cualquiera de dichas subunidades o dichos homólogos activos.

17. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que es un plásmido de ADN.

18. Partículas revestidas, adecuadas para suministro desde un dispositivo de suministro mediado por partículas, comprendiendo dichas partículas, partículas vehículo revestidas con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

19. Partículas revestidas de acuerdo con la reivindicación 18 en las que las partículas vehículo son oro o wolframio.

20. Un receptáculo de dosificación para un dispositivo de administración mediado por partículas que comprende partículas revestidas de acuerdo con la reivindicación 18 o 19.

21. Un dispositivo de administración mediado por partículas cargado con partículas revestidas de acuerdo con la reivindicación 18 o 19.

22. Un dispositivo de administración mediado por partículas de acuerdo con la reivindicación 21 que es una jeringa sin aguja.

23. Una preparación farmacéutica que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

24. Una vacuna que comprende una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.

25. Una vacuna de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende además una construcción de adyuvante de acuerdo con la reivindicación 15 o 16.

26. Un procedimiento *in vitro* para obtener expresión en células de mamífero de un polipéptido de interés, comprendiendo dicho procedimiento transferir a dichas células una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 o partículas revestidas de acuerdo con la reivindicación 18 o 19.

27. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 para su uso en inmunización.

28. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27, en el que la inmunización es contra infección por un patógeno, alergia o cáncer.

- 5 29. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 27 o 28 en la que el administración es para ser por inyección, administración de partículas transdérmicas, inhalación, por vía tópica, por vía oral, por vía intranasal o por vía transmucosa.

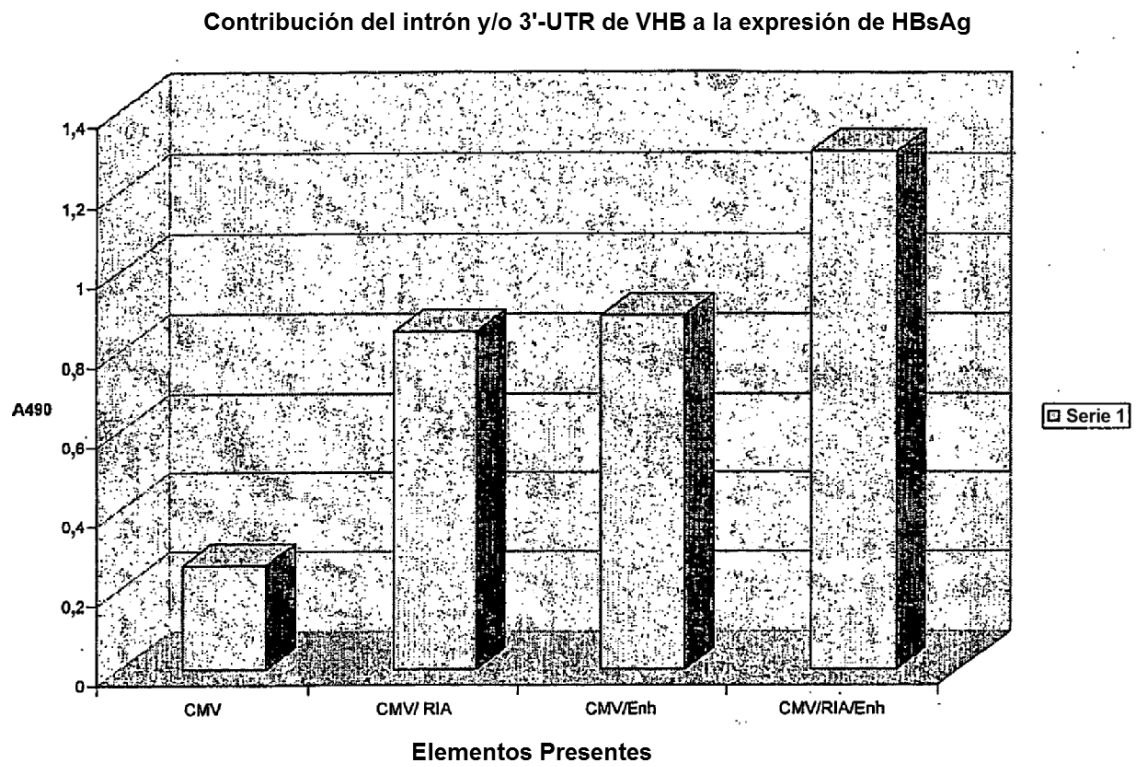


Figura 1

Efecto de la inclusión de intrón en la expresión de antígenos (media de 3 experimentos)

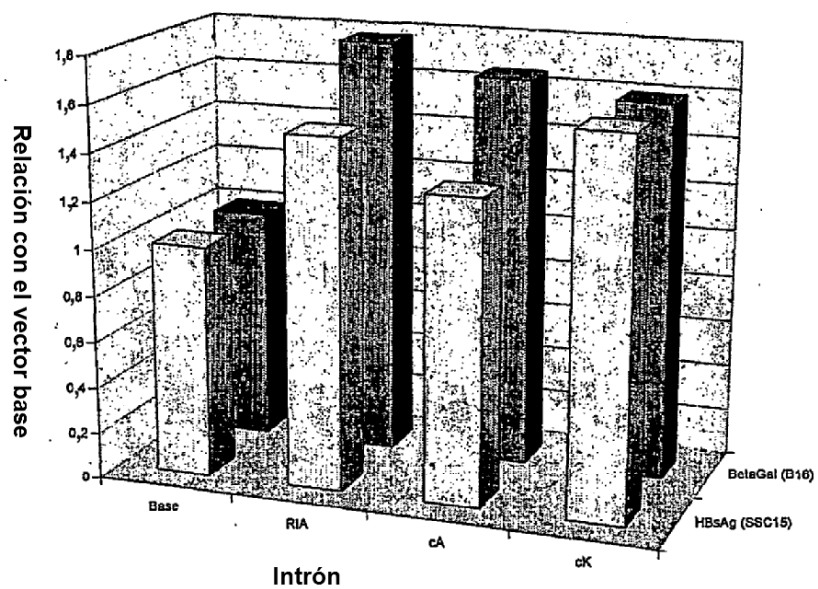


Figura 2

Efecto de RIA, ENH en la expresión de beta-gal (media de 3 experimentos)

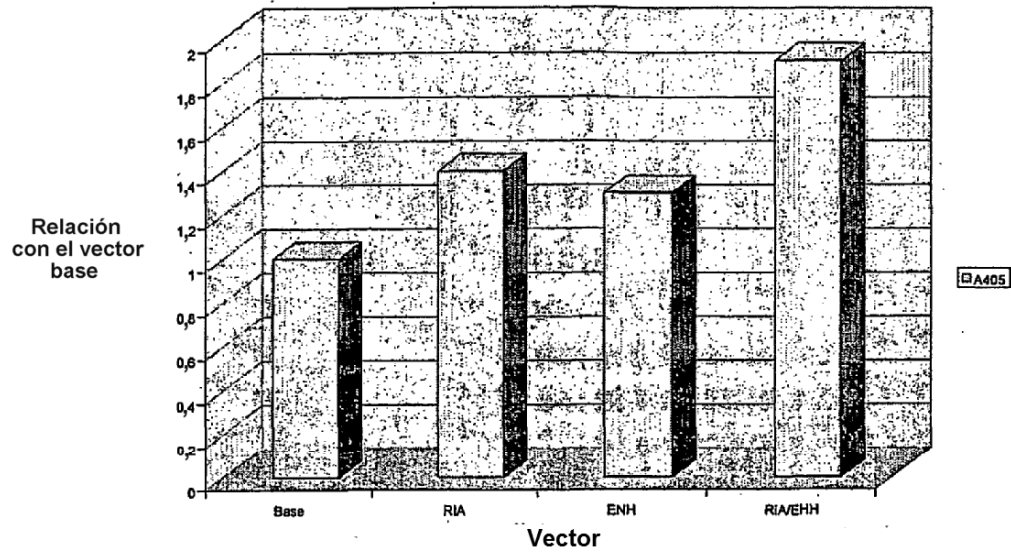


Figura 3

Efecto de la inclusión del intrón de RIA y Enh de VHB en la expresión de gD de VHS (media de 3 experimentos)

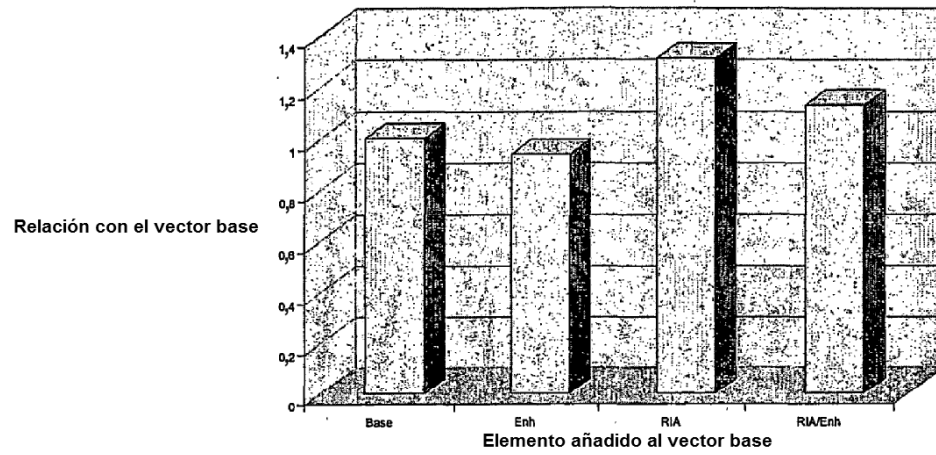


Figura 4

Efecto de RIA, ENH en la expresión de SEAP (dos líneas, tres repeticiones por línea)

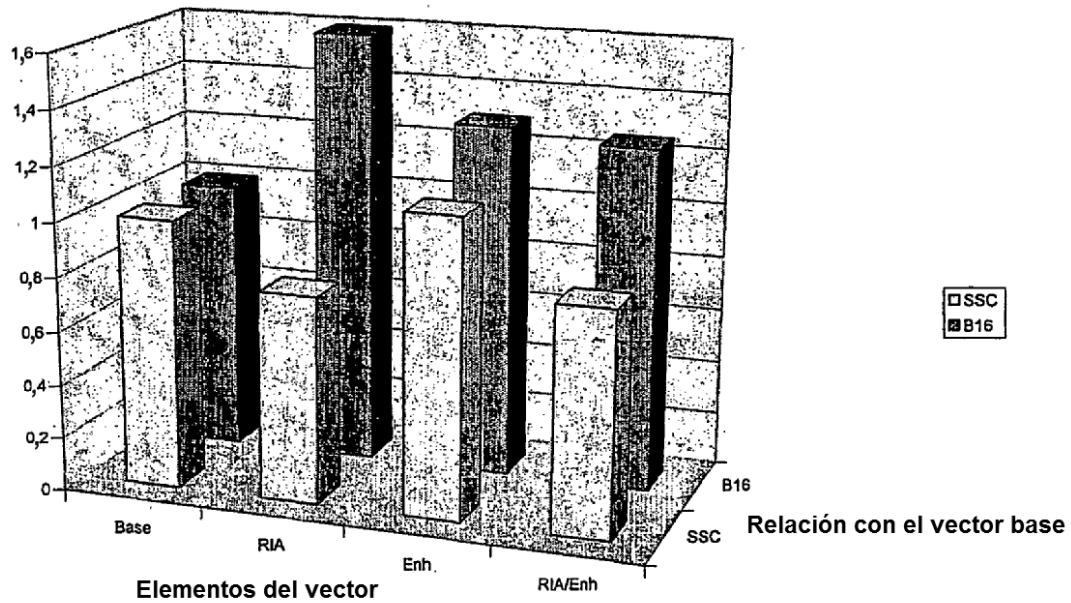


Figura 5

Capacidades de los péptidos señal heterólogos para secretar SEAP o fragmento hFc

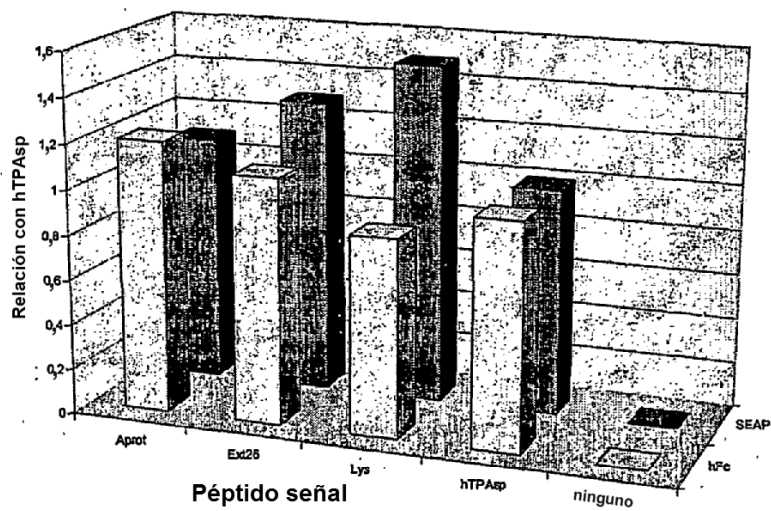


Figura 6

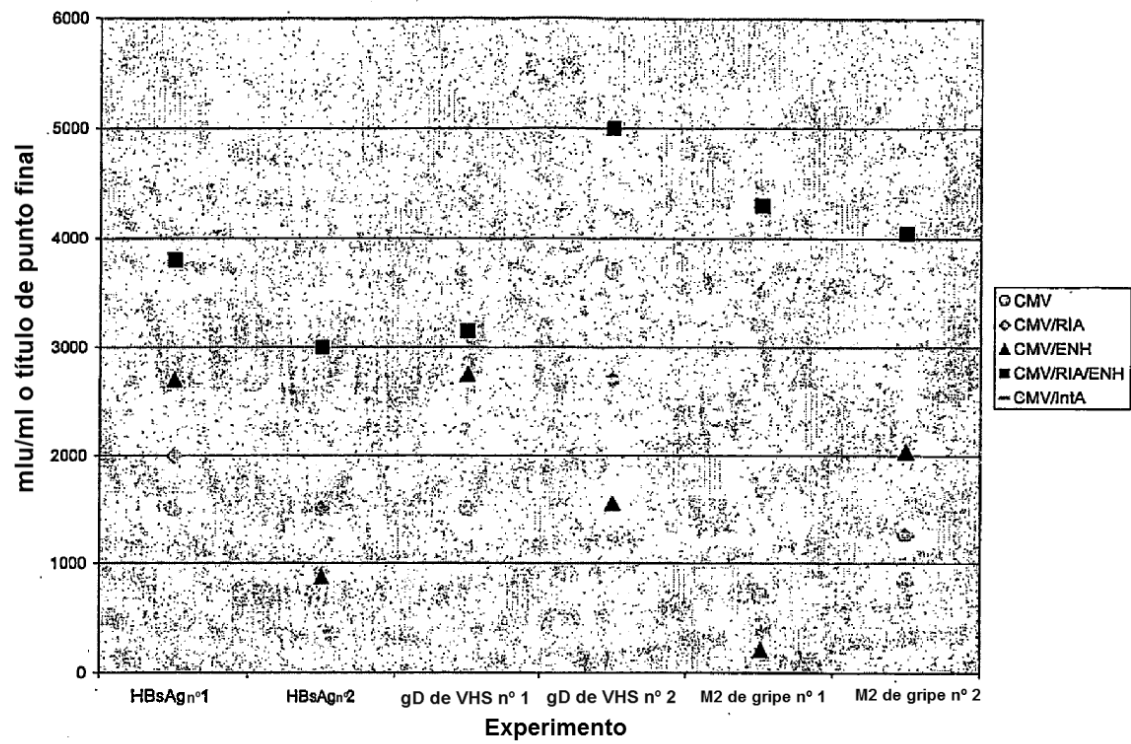


Figura 7

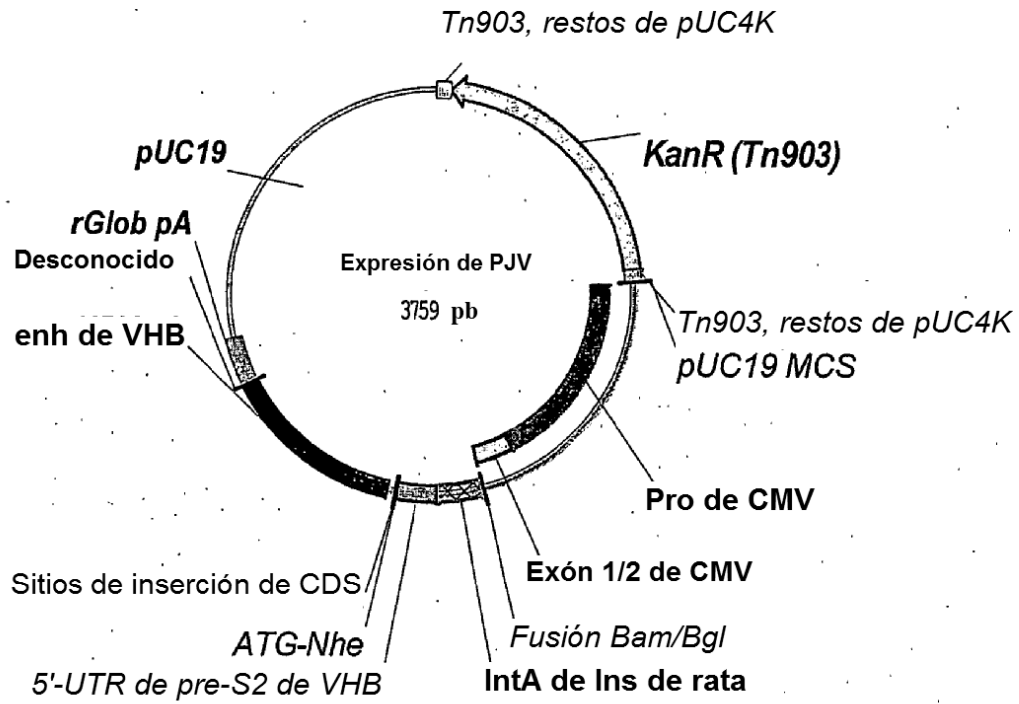


Figura 8

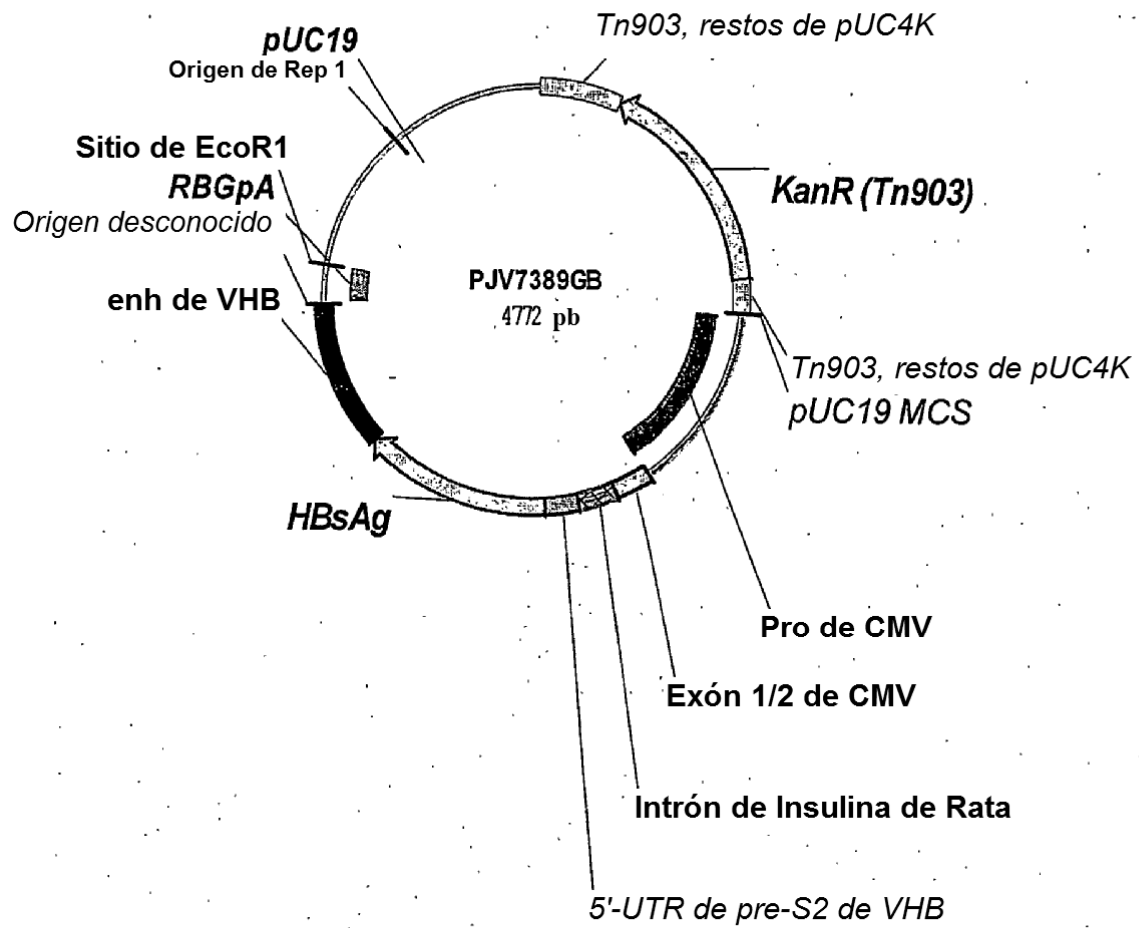


Figura 9

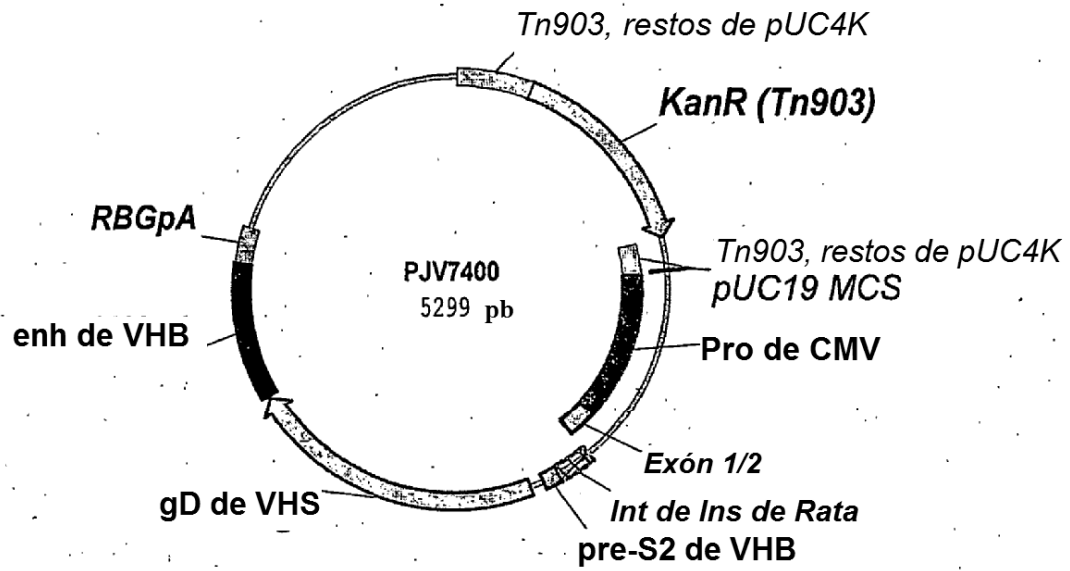


Figura 10

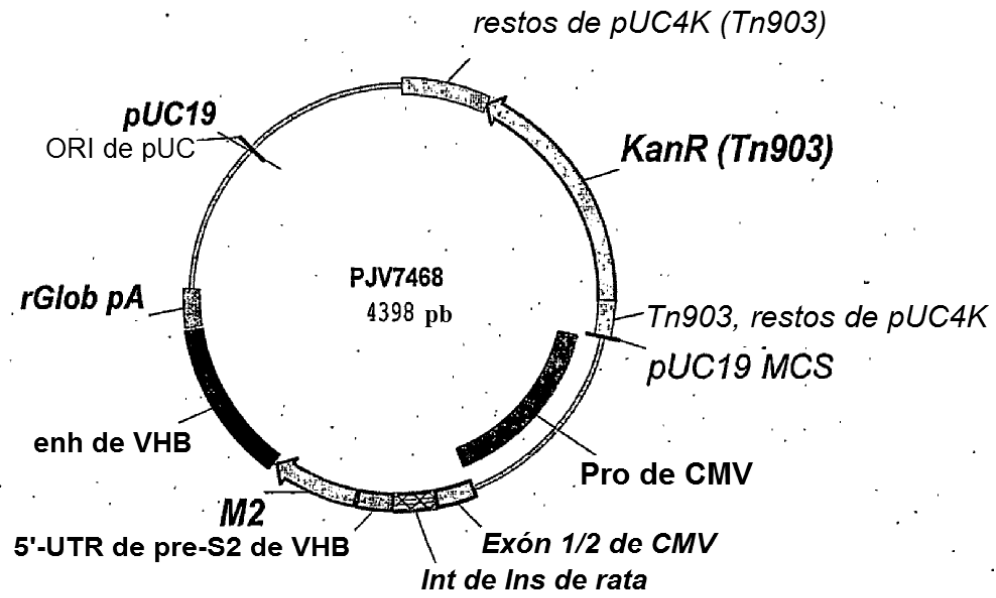


Figura 11

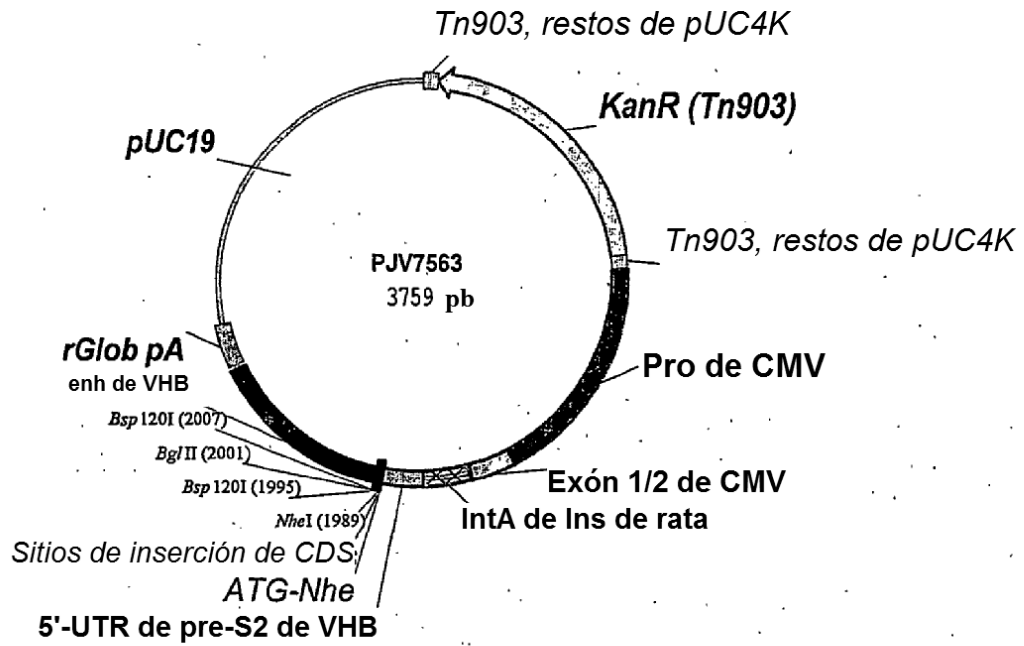


Figura 12

Figura 13

ggcgtaatgctctgccagtgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat
 caggattatcaataccataatTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCATAGGATGGCAAGATCC
 TGGTATCGGTCTGCgattccgactcgtccaacatcaatacaaaacttataatttccccctcgtcaaaaataagggtatcaagtgagaaatca
 ccatgagtgacgactgaatccgggtgagaatggcaaaagcttatgcatttcttccagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtc
 atcaaaatcactcgcatacaaaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatagcgatcgtgttaaaaggacaa
 ttacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgaggaacactgccagcgcatcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaata
 cctggaatgctgttttccggggatcgagtggtgagtaacctgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagag
 gcataaattccgctcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctaccttggcatgtttcagaaacaactctgg
 cgcacgggcttccatacaatcgatagattgtcgacactgattggcgacattatcgcgagccatttatacccatataaatcagcat
 ccatgttggaatttaacgcggcctcgagcaagacgtttccgttgatgtgctcataacacccctgtattactgtttatgtaagcaga
 caggtcgacaatattggctattggccattgcatacgttgcataatataatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgcca
 tgttgacattgattattgactagtattataatagtaataaattacggggctcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataactta
 cggtaaatggcccgctggctgaccgccaacgaccccgccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaaata
 gggactttccattgacgtcaatgggtggagatttacggtaaacgtccacttggcagttacatcaagtgtatcatatgccaaagtcggcc
 ccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgctggcattatgccagttacatgaccttacgggactttccacttggcagttacatct
 acgtattagtcacgctattaccatgggtgatcggttttggcagttacaccaatggggctggatagcgggttgactcacggggatttcca
 agtctccacccattgacgtcaatgggagtttgggttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtataaaccggcccggtt
 gacgcaaatggggggtgagcgtgtacgggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgctggagacgc
 catccacgctgttttaccctcatagaagacaccgggaccgatccagcctccggcgccgggaacgggtgattggaacgcggattc
 cccgtgccaaagagtactcaccgtccggatctcagcaagcaggtatgtactctcagggtggcgcttcccagtcgaagactc
 cagggatttgaggagcgtgtgggctctctcttaccatgtaccttttgcctcaaccctgactatctccagggtcaggatcccagag
 tcaggggtctgtatttctgctggtgggtccagttcaggaacagtaaacctgctccgaatattgcctctcacatctcgtcaatctccg
 cgaggactggggaccctgtgacgaacatggctagcgggcccagatctgggcccatacaaaaacaaaagatgggggttattccctaa
 acttcatgggttacgttaattggaagtgggggacattgccacaagatcatattgtacaaaagatcaaacactgttttagaaaacttctg
 taaacaggcctattgattgaaagtgtgcaaggattgtgggtcttttggcgcttgcctccatttacacaatgtggatatacctgcctta
 atgcctttgtatgatgtatacaagctaaacaggcctttcacttctcgccaacttacaaggcctttctaagtaaacagtacatgaaccttta
 ccccggttgcctggcaacggcctgtgtgtgccaagtgttgcgtgacgcaaccccgactgggtggggcttggccataggccatcagc
 gcatgcgtggaaccttgggtcctctgccgatccatactgcggaactcctagccgctgttttgcctgcagccggtctggagcaaa
 gctcataggaaactgacaattctgtcgtcctctcgcggaaatatacatcgtttcgtatctacgtatgatcttttccctctgcaaaaattatg
 gggacatcatgaagcccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaattattttcattgcaatagtgtgttgaatttttgtgtctct
 cactcgggaaggaaattctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcgggttgcgtattgggcgtcttccgcttctcgtc
 actgactcgtcgcgtcggctgtcggctgcggcgagcgggtatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacagaatcagg
 ggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcttgcgtggcgttttcca
 taggctccgccccctgacgagcatcacaaaaatcagcgtcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagatacca
 ggcgttccccctggaagctccctcgtgcgtctctctgttccgacctgccgcttaccggatacctgtccgcttctccctcgggaa
 gcgtggcgcttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggttaggtcgttcgctcaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
 cgttcagcccagccgtgcgccttatccggtaactatcgtttagtccaacccggtaagacacgacttatcggcactggcagcagc
 cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtagcgggtgctacagagttcttgaaagtgtggcctaactacggctacactagaa
 gaacagtatttggatctgcgtctgctgaagccagttaccttgcgaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaaacaaaccaccgc
 tggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatccttgcatttctacggggtct
 gacgtcagtggaacgaaaactcaggttaagggttttggctatgattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaattaaaaa
 tgaagttttaaatcaatcaagtatatatgagtaaacctgggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaaggcacctatctcagcgtct
 gtciatttgcgtcatccatagttgcctgactc