

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 007**

51 Int. Cl.:

A61K 39/235 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2010 E 10817780 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2015 EP 2477652**

54 Título: **Estrategia de inmunización para prevenir una infección por H1N1**

30 Prioridad:

16.09.2009 US 243070 P

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

16.06.2015

73 Titular/es:

**VAXART, INC. (100.0%)
385 Oyster Point Boulevard, Suite 9A
South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**TUCKER, SEAN N. y
SCALLAN, CIARAN**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 538 007 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

Estrategia de inmunización para prevenir una infección por H1N1

Antecedentes de la invención

5 Diversos métodos diferentes han sido propuestos para prevenir una infección por el virus de la gripe, pero la mayoría de estos métodos utilizan tecnologías antiguas administradas mediante inyección. Este método puede ser difícil de realizar durante una pandemia en la que se ha interrumpido la atención sanitaria habitual. Una vacuna de administración oral que pueda ser distribuida sin personal médico cualificado supondría una ventaja significativa.

10 Los virus H1N1 pandémicos de 2009 fijan como diana poblaciones celulares diferentes a las de la gripe normal. Estos virus infectan las células epiteliales intestinales, además de las células epiteliales del pulmón. Los pacientes infectados con H1N1 presentaron diarrea y enfermedad estomacal junto con los síntomas usuales de la gripe.

La presente invención proporciona una inmunización oral con beneficios sustanciales en la protección contra la infección por H1N1. Se genera una fuerte respuesta inmune de la mucosa, incluyendo en el intestino, según se demuestra por las fuertes respuestas de anticuerpos IgA contra HA en pellets o gránulos fecales. También se muestra que la vacuna oral contra H1N1 protege contra el H1N1 en una prueba de provocación directa in vivo.

15 El arte previo incluye la patente WO2007100908. El Ejemplo 4 de la misma revela la administración de un vector adenoviral que codifica una proteína A/PR/8/34 HA de la gripe en combinación con un antagonista de poli(I:C) TLR-3. El Ejemplo 11 de la misma revela un vector adenoviral con un promotor que controla la expresión de HA de la cepa del virus de la gripe A/Indo/5/2005 con una secuencia aguas abajo ("downstream") que codifica un agonista del TLR-3 de ARN de doble cadena. Este ejemplo también recela un vector adenoviral con un primer promotor que controla la expresión de un agonista del TLR-3 de ARN de doble cadena, y un segundo promotor que controla la expresión de HA de la cepa A/Indo/5/2005 del virus de la gripe.

Breve resumen de la invención

25 La invención proporciona composiciones de respuesta rápida y fácilmente escalables para la vacuna contra cepas pandémicas de la gripe H1N1. Tras el aislamiento de la cepa, puede prepararse una vacuna viral basada en genes de acuerdo a la invención y someterla a ensayo por seguridad y eficacia en cuestión de semanas.

30 La invención proporciona vectores de expresión adenovirales quiméricos para la protección contra el virus H1N1 de la gripe, donde dicho vector comprende un casete de expresión que comprende (a) un primer promotor enlazado de forma funcional a un ácido nucleico que codifica un agonista del receptor de tipo toll 3 (TLR-3, por sus siglas en inglés), en donde el agonista de TLR-3 es un ARN de doble cadena (dsRNA); y (b) un segundo promotor enlazado de forma funcional a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de hemaglutinina a partir del virus de la gripe A/CA/04/2009 H1N1. En algunos modos de realización, el dsRNA se selecciona de ARN de horquilla corto (ARNhc), dsRNA viral, y ARNip. En algunos modos de realización, la secuencia que codifica el dsRNA comprende una secuencia que tiene una identidad sustancial con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, y SEQ ID NO:6 (SEQ ID NOs:1-6). En algunas realizaciones, la secuencia que codifica el dsRNA comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs:1-6.

40 En algunos aspectos de la revelación descrita en la presente patente, el polipéptido de H1N1 es un antígeno de superficie del H1N1 o un fragmento antigénico del mismo. En algunos aspectos de la revelación descritos en la presente patente, el polipéptido se selecciona del grupo que consiste en HA, NA, MP, y NP, y fragmentos antigénicos del mismo. El virus de la gripe H1N1 es de la cepa A/CA/04/2009.

En algunos modos de realización, el primer promotor y el segundo promotor es el mismo. En algunas realizaciones, el primer promotor y el segundo promotor son diferentes. El promotor puede ser constitutivo o inducible, y puede ser un promotor génico mamífero o viral, por ejemplo, CMV o SV40.

45 En algunos modos de realización descritos en la presente patente, el vector de expresión viral es sustancialmente idéntico a la SEQ ID NO:7, por ejemplo, con al menos un 90,92, 95, 96, 98, o 99% de identidad con la SEQ ID NO:7, o con el casete de expresión de la SEQ ID NO:7 (posiciones de nucleótidos 603 a 4194). En algunos modos de realización descritos en la presente patente, el vector de expresión viral comprende la SEQ ID NO:7 o el casete de expresión de la SEQ ID NO:7. En algunos aspectos de la revelación descrita en la presente patente, el vector de expresión viral es sustancialmente idéntico a la SEQ ID NO:7, pero codifica un polipéptido antigénico del H1N1 diferente.

50

En algunas realizaciones, la invención proporciona composiciones farmacéuticas para la protección contra el virus de la gripe H1N1, donde dichas composiciones comprenden el vector viral quimérico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para una entrega no parenteral (administración), por ejemplo, administración por vía oral, mucosa, o intranasal. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para la administración por vía oral.

En algunos modos de realización, la invención proporciona una composición farmacéutica para su administración por vía oral que comprende el vector viral quimérico de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención además proporciona una cantidad inmunológicamente efectiva de un vector de expresión adenoviral de la invención, o una composición de la invención, para su uso en un método para provocar una respuesta inmune ante el virus pandémico de la gripe H1N1 en un mamífero, en donde la respuesta inmune se dirige contra el polipéptido de hemaglutinina, y en donde la vía de administración se selecciona del grupo que consiste en: oral, intranasal y mucosa. En algunas realizaciones, la administración es oral. En algunas realizaciones, el mamífero es un humano. En algunas realizaciones, la respuesta inmune se selecciona del grupo que consiste en una respuesta inmune de la mucosa, una respuesta inmune sistémica, una respuesta inmune humoral, y una respuesta inmune celular. En algunas realizaciones la respuesta inmune es una respuesta inmune de la mucosa. En algunas realizaciones, la respuesta inmune puede detectarse en la mucosa intestinal.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A. Los títulos de anticuerpos sistémicos para anticuerpos HA anti-gripe se pueden comparar a las 8 semanas para vacunación oral (p.o.) y vacunación intramuscular (i.m.) de DX1. Se administró Ad-CA/04/09-Adj por vía oral en dos dosis diferentes (10^7 IU o 10^8 IU) o i.m. en 10^8 IU. Se muestran también los resultados de un vector de expresión adenoviral similar que codifica HA a partir de un H1N1 no similar (Ad-PR8-Adj).

Figura 1B. Los resultados de la inhibición de la Hemaglutinación (HAI) a las 3, 5 y 8 semanas después de la vacunación confirman una respuesta sistémica similar del anticuerpo a A/CA/04/2009 de la administración por vía oral e i.m.

Figura 1C, 1D, y 1F. La administración oral de la vacuna vectorial DX1 proporciona una respuesta del anticuerpo superior de las mucosas en comparación con la inyección i.m. Se midieron títulos de anticuerpos específicos a HA en tejidos de la mucosa intestinal (fecal), vaginal, y del pulmón, a las 8, 10, y 12 semanas después de la administración, respectivamente. Los resultados se muestran en los paneles C, D, y E de la Figura 1. Hay que señalar que la administración oral del vector DX1 proporciona títulos de IgA específicos más elevados que una dosis alta de una inyección i.m. La dosis oral 10 veces más baja también induce una respuesta igual o mayor. Un * indica $P < 0,05$ calculado utilizando una prueba T de Student basada en lecturas OD450.

Figura 2A y 2B. La administración oral en dosis bajas del vector DX1 proporciona datos de mantenimiento de peso y de supervivencia comparables con las dosis altas con administración oral e i.m. La Figura 2A muestra que el 100% de los ratones vacunados con DX1 que reciben una prueba de provocación de H1N1 letal sobrevivieron. De forma similar, la Figura 2B muestra una pérdida de peso mínima en todos los tres grupos. Los ratones no tratados, o los vacunados sólo con adyuvante sucumbieron al virus poco después de la prueba de provocación. "Oral" indica 10^8 IU DX1, "IM" indica 10^8 IU DX1, dosis oral lo indica 10^7 IU DX1, control Ady indica un vector que expresa únicamente dsRNA.

Figura 3. La expresión del adyuvante con dsRNA mejora la respuesta del anticuerpo al antígeno de H1N1 HA. Los títulos de plasma de los anticuerpos específicos para HA se midieron a continuación de la administración oral de DX1 y DX2 (vector que carece de la secuencia de codificación del dsRNA).

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención proporciona vacunas con vectores adenovirales quiméricos efectivos y novedosos que pueden desarrollarse rápidamente en respuesta a una pandemia viral de H1N1. Una vez aislada la cepa pandémica, puede aislarse un antígeno y utilizarse para diseñar una vacuna de acuerdo con la presente invención. Pueden realizarse ensayos con animales, para determinar la seguridad y los rangos de dosis tolerables, además de la eficacia de la vacuna contra la cepa pandémica en particular, en cuestión de semanas. Las vacunas con vectores adenovirales quiméricos de la invención comprenden un antígeno de codificación de secuencia (hemaglutinina), además de una secuencia que codifica un adyuvante con dsRNA. La vacuna puede ser administrada por vía no parenteral y en una dosis baja para provocar una respuesta inmune contra el antígeno de H1N1. Los vectores virales quiméricos provocan respuestas inmunes fuertes y efectivas específicas para el antígeno polipeptídico de H1N1, en particular cuando se administra a través de una vía no parenteral (por ejemplo, por vía oral, intranasal o mucosa).

La eficacia del agonista de TLR-3 con dsRNA codificado por el vector como adyuvante es también sorprendente. El uso del dsRNA como adyuvante para vectores virales es contrario a la intuición considerando que la utilidad propuesta fundamental del poli I:C mimético de dsRNA es como un agente antiviral [Nemes, et al., Proc Soc Exp Biol Med. (1969) 132:776; Schafer, et al, Nature. (1970) 226:449; Fenje, et al, Nature (1970) 226:171.].

5 II. Definiciones

El término “quimérico” o “recombinante” tal como se utiliza en la presente patente en referencia, por ejemplo, a un ácido nucleico, proteína, o vector, indica que el ácido nucleico, proteína o vector, ha sido modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos, o por la alteración de un ácido nucleico o proteína nativos. Por tanto, por ejemplo, los vectores quiméricos y recombinantes incluyen secuencias de ácido nucleico que no se encuentran dentro de la forma nativa (no quimérica o no recombinante) del vector. Un vector viral quimérico (o vector de expresión viral quimérico), hace referencia a un vector viral que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido heterólogo.

Un “vector de expresión” o “casete de expresión” es un constructo de ácido nucleico, generado por recombinación o síntesis, con una serie de elementos del ácido nucleico específicos que permiten la transcripción de un ácido nucleico en particular en una célula hospedadora. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, un virus, o un fragmento de ácido nucleico. Habitualmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a ser transcrito ligado funcionalmente a un promotor. Un vector de expresión puede incluir más de una unidad de expresión o secuencia de codificación, que puede ser contigua (por ejemplo, bajo el control del mismo promotor) o no contigua (bajo el control de un promotor diferente).

Los términos “promotor” y “secuencia de control de la expresión” hacen referencia a secuencias de control de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se utiliza en la presente patente, un promotor incluye secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de polimerasa de tipo II, un elemento TATA. Un promotor además incluye de manera opcional elementos represores o potenciadores distales, que pueden situarse, tanto como, a varios miles de pares de base del sitio de inicio de la transcripción. Los promotores incluyen promotores constitutivos e inducibles. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo bajo la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. El término “ligado funcionalmente” hace referencia a un ligamiento funcional entre una secuencia de control de ácido nucleico (tal como un promotor, o una matriz de sitios de unión al factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Los términos “agonista del TLR-3” o “agonista del receptor de tipo Toll 3” tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a un compuesto que se une y estimula el TLR-3. Se han identificado los agonistas del TLR-3, incluyendo ARN de doble cadena, dsRNA obtenido viralmente, diversos análogos al ARN de doble cadena sintetizados químicamente incluyendo ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C) – ácido poliadenílico-poliuridílico (poli A:U) y poli I:poli C, y anticuerpos (o entrecruzamiento de anticuerpos) para el TLR-3 que conducen a la prosucción de IFN-beta [Matsumoto, M, et al, Biochem Biophys Res Commun 24:1364 (2002), de Bouteiller, et al, J Biol Chem 18:38133-45 (2005)]. Los agonistas del TLR-3 incluyen además dsRNA codificado por y expresado a partir de un vector, por ejemplo, según se describe en la presente patente.

El ARN de doble cadena (dsRNA) que incluye dos cadenas complementarias, habitualmente con una extensión de al menos 4, 5, 10, 12, 15, 20 o más ribonucleótidos. La extensión complementaria de un dsRNA puede ser entre 5-10, 5-20, 5-30, 10-20, 10-100, 20-100, y mayor. Un experto en el arte apreciará que la extensión complementaria no necesita ser un 100% complementaria para que el dsRNA actúe como un agonista o adyuvante efectivo del TLR-3. Una molécula de dsRNA puede comprender una especie intramolecular de ARN de doble cadena (por ejemplo, ARN de horquilla corto o ARNhc) y una especie de dsRNA que comprenda al menos dos moléculas separadas de ARN de cadena única.

Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia designada (por ejemplo, una secuencia viral del H1N1 que codifica un polipéptido o dsRNA en particular o una parte del mismo) o una variante de una secuencia de ese tipo que da como resultado una respuesta inmune al virus H1N1 deseado o al agonista del TLR-3, respectivamente. Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, de tal manera que la actividad biológica del polipéptido codificado no se vea reducida, en relación a un polipéptido que comprenda la secuencia original. Las variantes de polinucleótidos de un dsRNA determinado pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones de tal manera que la actividad del agonista del TLR-3 del dsRNA codificado no se vea reducida, en relación a un dsRNA que no contenga las sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones. Las variantes muestran, preferiblemente, al menos aproximadamente un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, con respecto a una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido nativo o una parte del mismo o con respecto a una secuencia de polinucleótidos que codifica un dsRNA con actividad agonista de TLR-3.

El término "sujeto" o "paciente", para los propósitos de la presente invención, hace referencia a un mamífero que puede ser infectado con el virus H1N1. Entre los mamíferos se incluyen los humanos, además de mamíferos no humanos tales como roedores (por ejemplo, ratones y ratas), conejos, animales de ganado (por ejemplo, animales bovinos, porcinos, y ovinos) y animales domésticos (por ejemplo, perros y gatos), y primates no humanos.

5 El término "heterólogo" cuando se utiliza en referencia a parte de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más sub-secuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce habitualmente por recombinación, con dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para generar un nuevo ácido nucleico funcional, *por ejemplo* un promotor a partir de una fuente y una región de codificación a partir de otra fuente. De forma similar, una proteína heteróloga indica que la
10 proteína comprende dos o más sub-secuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (*por ejemplo*, una proteína de fusión).

Los términos "ácido nucleico", "oligonucleótido", "polinucleótido" y términos similares se utilizan de forma intercambiable en la presente patente para hacer referencia a polímeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos ya sea en su forma de cadena única como de cadena doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen
15 análogos de nucleótidos conocidos o residuos o ligamientos de cadena principal modificados, que son sintéticos, naturales, y no naturales, que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil-ribonucleótidos, ácidos peptido-nucleico (PNA).

20 A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico en particular abarca también variantes modificadas de forma conservadora de la misma (*por ejemplo*, sustituciones de codones redundantes), y secuencias complementarias, además de la secuencia explícitamente indicada. De forma específica, las sustituciones de codones redundantes pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados se sustituye con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res.
25 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

El término antígeno hace referencia a una proteína o parte de una cadena polipeptídica que puede ser reconocida por los receptores y/o anticuerpos de los linfocitos T. Habitualmente, los antígenos provienen de proteínas de bacterias, víricas, o fúngicas, o de proteínas anómalas expresadas por células cancerígenas.

30 Una "dosis o cantidad inmunogénicamente efectiva" de una composición de la presente invención es una cantidad que provoca o modula una respuesta inmune específica para el polipéptido antigénico deseado. Entre las respuestas inmunes se incluyen respuestas inmunes humorales y respuestas inmune mediadas por la célula. Una composición inmunogénica puede ser utilizada terapéuticamente o profilácticamente para trata o prevenir una infección por H1N1.

Los términos "dosis" y dosificación" se utilizan de forma intercambiable en la presente patente. Una dosis hace referencia a la cantidad de ingrediente activo proporcionado a un individuo en cada administración. La dosis para los propósitos de la presente invención puede estar expresada en una cantidad de formas, *por ejemplo*, mg/mL o UI (unidades internacionales) del vector viral, mg o UI por kg o lb de peso corporal del sujeto, o en términos de la cantidad de polipéptido antigénico producido por el vector viral. La dosis variará dependiendo de una serie de factores, que incluyen la frecuencia de administración, tamaño y tolerancia del individuo, gravedad del brote de
40 H1N1, riesgo de infección y de la vía de administración. Un experto puede determinar cómo modificar una dosis mínima dependiendo de los factores anteriores. La dosis inicial puede ser utilizada como línea de referencia, y modificarse en base a la reacción del individuo.

Una "forma de dosificación" hace referencia al formato en particular del producto farmacéutico, y depende de la vía de administración. Por ejemplo, una forma de dosificación puede ser en forma de comprimido o líquido, por ejemplo, para su administración por vía oral, un supositorio, por ejemplo, para una administración por vía rectal o vaginal, o un líquido para inyección. Una "única forma de dosificación" hace referencia tanto al formato de la composición farmacéutica como a la cantidad de ingrediente activo según, se ha tratado anteriormente.

"Protección" o "prevención" de la infección hace referencia a reducir el potencial de que un individuo desarrolle una infección por H1N1, por ejemplo, detectado por la observación de síntomas, o mediante la detección de un título viral o de anticuerpos. El término incluye protección ante una infección adicional o empeoramiento de la infección, *por ejemplo*, en el caso de un individuo que ya sufre de una infección, *por ejemplo*, por una cepa diferente del H1N1 o por un virus diferente. El potencial para una infección puede ser reducido hasta tal punto que el individuo no muestre síntomas tras la exposición al agente infeccioso. Por ejemplo, proteger ante una infección en un individuo puede hacer referencia a la habilidad de un vector viral quimérico de la presente invención para prevenir o reducir la
55 aparición o repetición de una infección.

5 “Tratar” o “reducir” una infección por H1N1 hace referencia a reducir la cantidad de agente infeccioso (por ejemplo, cantidad de células o partículas virales) en el individuo, reducir la gravedad de los síntomas, y/o reducir la frecuencia de los síntomas. En algunos modos de realización, la cantidad de agentes infecciosos se reduce en al menos un 10%, en comparación, *por ejemplo*, con el individuo antes de la administración o con un individuo de control que no está sometido a tratamiento. En algunos modos de realización la cantidad de agentes infecciosos se reduce al menos en un 25%, 50%, 75%, 80%, o 90%. En algunas realizaciones, la infección ya no es detectable, *por ejemplo*, mediante los síntomas o técnicas de diagnóstico generales.

10 Un experto apreciará que los términos proteger, prevenir, y tratamiento no son términos absolutos, sino una mejora en general del pronóstico en comparación con controles sin tratamiento o tratados de forma diferente. Por ejemplo, las composiciones de la invención se consideran protectoras si un individuo o una población tratados es menos susceptible de desarrollar una infección por H1N1 que un individuo o población que no están tratados de acuerdo con la invención, pero expuestos a condiciones similares.

15 El término “infección” para los propósitos de la invención hace referencia a la presencia de una cepa del virus de la gripe H1N1 potencialmente patogénica en un individuo. La infección no implica necesariamente que un individuo infectado vaya a experimentar los síntomas del agente infeccioso. La infección por H1N1 tiene lugar habitualmente a través de los tejidos de la mucosa, *por ejemplo*, revestimientos epiteliales del tracto reproductivo, tracto gastrointestinal, superficies bucal y esofágica, cavidad nasal, y revestimiento bronquial.

20 Un agente “interfiere con” o “protege de” la infección cuando reduce la habilidad de una cepa del virus H1N1 fijada como diana de colonizar la superficie de la mucosa o atravesar la barrera de la mucosa, *por ejemplo*, para infectar células del individuo. Por ejemplo, un agente interfiere con la infección si menos células están expuestas o infectadas por el virus. La reducción puede ser determinada mediante comparación, *por ejemplo*, con el individuo antes del tratamiento o con un individuo de control expuesto a condiciones similares pero que no está sometido a tratamiento.

25 El término “aislado” no es un término absoluto, sino que hace referencia a un material que está sustancialmente libre de contaminantes o a componentes que acompañan al material en su estado nativo.

Las “respuestas inmunes humorales” están mediadas por componentes libres de células de la sangre, *es decir*, plasma o suero, *por ejemplo*, anticuerpos. La transferencia del suero o plasma de un individuo a otro transfiere la inmunidad humoral.

30 Las “respuestas inmunes mediadas por células” están mediadas por linfocitos específicos de antígenos, por ejemplo, linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés). La transferencia de los linfocitos específicos de antígenos de un individuo a otro transfiere inmunidad.

35 Una “dosis terapéutica” o “cantidad terapéuticamente efectiva” o “cantidad efectiva” de un vector viral quimérico o una composición que comprende un vector viral quimérico, es una cantidad del vector o composición que comprende el vector que previene, alivia, aplaca, o reduce la gravedad de los síntomas del virus H1N1 fijado como diana.

40 Anticuerpo hace referencia a un polipéptido codificado por un gen de inmunoglobulina o fragmentos del mismo que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, épsilon, y mu de la región constante, además de la miríada de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican bien como kappa o como lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta, o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente.

45 Linfocitos T hacen referencia a una clase en particular de linfocitos que expresa un receptor específico (receptor de linfocitos T) codificado por una familia de genes. Los genes del receptor de linfocitos T incluyen locus alfa, beta, delta, y gamma, y los receptores de linfocitos T habitualmente (pero no universalmente) reconocen una combinación de MHC más un péptido pequeño.

Una respuesta inmune adaptativa hace referencia a un reconocimiento específico de un antígeno por los linfocitos T (a través del receptor de linfocitos T (TCR)) o los linfocitos B (a través del BCR o anticuerpo/ inmunoglobulina).

50 Las células presentadoras de antígeno (APC, por sus siglas en inglés), presentan péptidos inmunogénicos o fragmentos del mismo a los linfocitos T para activar o incrementar una respuesta inmune. Las APC incluyen células dendríticas, macrófagos, linfocitos B, monocitos y otras células que pueden ser modificadas genéticamente para ser APC eficientes. Tales células pueden, pero no necesitan, ser genéticamente modificadas para aumentar la capacidad para presentar el antígeno, para mejorar la activación y/o mantenimiento de la respuesta del linfocito T, para tener efectos antitumorales per se y/o para ser inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, un

haplotipo HLA coincidente). Las APC pueden ser aisladas de una variedad de fluidos y órganos biológicos que incluyen médula ósea, sangre periférica, tejidos tumorales y peritumorales, y pueden ser células autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas. Las APC utilizan habitualmente un receptor del locus del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para presentar polipéptidos pequeños a linfocitos T.

5 Los adyuvantes son conocidos en el arte, y hacen referencia a potenciadores de respuesta inmune no específicos. Adyuvantes adecuados incluyen, *por ejemplo*, dsRNA y miméticos de dsRNA, toxina de la cólera, monofosforil lípido A (MPL), adyuvante completo de Freund, Adyuvante incompleto de Freund, Quil A, y Al(OH). Los adyuvantes pueden también ser aquellas sustancias que causan la activación de las APC y una mejora en la presentación de linfocitos T mediante moléculas de señalización secundarias, como los receptores de tipo Toll. Ejemplos de
10 receptores de tipo Toll incluyen receptores que reconocen el ARN de doble cadena, flagelos bacterianos, LPS, ADN de CpG, y lipopéptido bacteriano (examinado en Abreu et al., J Immunol, 174(8), 4453-4460 (2005)).

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína” hacen referencia a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido correspondiente natural, además de a polímeros de aminoácidos naturales y a un
15 polímero de aminoácidos no natural.

El término “aminoácido” hace referencia a aminoácidos naturales y sintéticos, además de a análogos y a miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos naturales. Aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, además de aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, *por ejemplo*, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos hacen referencia a compuestos que
20 tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, *es decir*, un carbono que está enlazado a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metilsulfonio de metionina. Tales análogos tienen grupos R modificados (*por ejemplo*, norleucina) o cadenas principales polipeptídicas modificadas, pero mantienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los miméticos de aminoácidos hacen referencia a compuestos químicos que tienen
25 una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funcionan de una forma similar a un aminoácido de origen natural.

Puede hacerse referencia a los aminoácidos en la presente patente ya sea por sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos, o bien por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB (CBN).

30 Asimismo, puede hacerse referencia a los nucleótidos por sus códigos de letra única comúnmente aceptados.

Las “variantes modificadas de manera conservadora” se aplican tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos en particular, las variantes modificadas de manera conservadora hacen referencia a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias
35 funcionalmente idénticas. Debido a que la redundancia del código genético, una gran cantidad de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, todos los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por tanto, en cada posición en la que una alanina se especifique por parte de un codón, dicho codón puede ser modificado a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son “variaciones silenciosas”, que son una especie de
40 variaciones modificadas de forma conservadora. En la presente patente, cada secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto en el arte reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para la metionina, y TGG, que es habitualmente el único codón para el triptófano), puede ser modificado para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un
45 polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En lo que se refiere a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, deleciones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que modifica, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una “variante modificada de manera conservadora” en la que la modificación da como resultado la sustitución de un aminoácido
50 con un aminoácido químicamente similar. Se conocen bien en el arte tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares. Tales variantes modificadas de manera conservadora son adicionales a y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos inter-especies, y alelos de la invención.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

1) Alanina (A), Glicina (G);

- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina I, Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M)

(*ver, por ejemplo*, Creighton, Proteins (1984)).

La frase “hibrida selectivamente (o específicamente) con” hace referencia a la unión, formación de dúplex, o hibridación de un polinucleótido únicamente a una secuencia de nucleótidos en particular, es decir, según la complementariedad de Watson-Crick.

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí bajo determinadas condiciones se siguen considerando sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la máxima redundancia de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos hibridan de manera habitual bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Ejemplos de “condiciones de hibridación moderadamente rigurosas” incluyen una hibridación en un tampón de 40% de formamida, 1 M de NaCl, SDS al 1% a 37° C, y un lavado en 1X SSC a 45° C. Una hibridación positiva es al menos dos veces la señal de fondo. Los expertos en el arte reconocerán que las condiciones de hibridación y lavado alternativas pueden ser utilizadas para proporcionar condiciones de rigurosidad similares.

La frase “se une específicamente (o de forma selectiva)” a un anticuerpo, o es “específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con” cuando hace referencia a una proteína o péptido, hace referencia a una reacción de unión que determina la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otras sustancias biológicas. Por tanto, bajo condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos específicos se unen a una proteína en particular al menos dos veces la señal de fondo, y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. La unión específica a un anticuerpo bajo tales condiciones puede requerir un anticuerpo que sea seleccionado por su especificidad para una proteína en particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales obtenidos para proteínas de fusión pueden seleccionarse para obtener únicamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con la proteína de fusión y no con componentes individuales de las proteínas de fusión. Esta selección puede lograrse sustrayendo los anticuerpos que presentan reactividad cruzada con los antígenos individuales.

Pueden utilizarse una variedad de formatos de inmunoensayos para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína en particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína (*ver, por ejemplo*, Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (1988), para una descripción de formatos y condiciones de inmunoensayos que pueden utilizarse para determinar inmunorreactividad específica). Habitualmente una reacción específica o selectiva será al menos de dos veces la señal o ruido de fondo, y más habitualmente más de 10 a 100 veces la señal de fondo.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos (por ejemplo, un dsRNA o secuencia de codificación de antígenos) o secuencias polipeptídicas, hacen referencia a dos o más secuencias o sub-secuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos (*es decir*, un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad sobre una región específica), cuando se compara y se alinea para una máxima correspondencia sobre una ventana de comparación, o región designada según se mide utilizando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Se dice entonces que tales secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también hace referencia a la dotación de una secuencia de ensayo. Opcionalmente, la identidad existe en una región que es al menos aproximadamente de 10 a 100, aproximadamente de 20 a aproximadamente 75, aproximadamente de 30 a aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para una comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las

secuencias de referencia y de ensayo se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de sub-secuencias, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Pueden utilizarse los parámetros del programa que vienen por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo en relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal como se utiliza en la presente patente, incluye la referencia a un segmento de cualquier número de las posiciones contiguas desde aproximadamente 10 a aproximadamente 500, aproximadamente 25 a aproximadamente 200, 50 a aproximadamente 150, en las que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia con el mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias sean alineadas de forma óptima. Se conocen bien en el arte los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación. El alineamiento óptimo de secuencias para su comparación puede ser dirigido, *por ejemplo*, por el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), por el método de la búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (*ver, por ejemplo*, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds. suplemento de 1995)).

Un ejemplo de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 (1977) y en Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990), respectivamente. El software para realizar los análisis con BLAST se encuentra públicamente disponible a través del "National Center for Biotechnology Information" (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (en la web del NCBI, ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencia de alta puntuación (HSPs, por sus siglas en inglés) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que o bien coincide o satisface una puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T hace referencia al umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul et al., *supra*). Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSPs de mayor longitud que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada cae a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (*ver* Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas.

III. Composiciones reveladas

La revelación proporciona composiciones que comprenden vectores virales quiméricos. En algunos aspectos de la revelación descrita en la presente patente, los vectores virales quiméricos comprenden un primer promotor enlazado funcionalmente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de H1N1 antigénico y un segundo promotor enlazado funcionalmente a un ácido nucleico que codifica un agonista del TLR3. El primer y segundo promotor pueden ser iguales o diferentes, inducibles, constitutivos, o específicos al tejido. En algunos aspectos de la revelación descrita en la presente patente, el primer y el segundo promotor se seleccionan independientemente de: el promotor de actina beta y el promotor de CMV.

En algunos aspectos de la revelación, el vector viral quimérico comprende un genoma adenoviral (menos los genes E1 y E3) y un ácido nucleico que codifica un dsRNA. El vector quimérico puede ser administrado a una célula que expresa el gen Ad E1, de tal manera que el adenovirus recombinante (rAd) es producido por la célula. Este rAd puede cosecharse y es capaz de una única ronda de infección que administrará la composición transgénica a otra célula en un mamífero para provocar respuestas inmunes al polipéptido antigénico.

A. Vectores virales adecuados

Cualquier vector de expresión viral puede utilizarse para la presente revelación. Las vacunas virales están habitualmente atenuadas (*por ejemplo*, replicación incompetente). Los vectores de expresión viral adecuados descritos en la presente patente pueden obtenerse a partir de adenovirus, virus Vaccinia modificado de Ankara

(MVA; *ver, por ejemplo*, Kumar y Seth (2004) Gene Ther. Mol. Biol. 8:193-200), virus Vaccinia, virus del herpes, baculovirus, virus adenoasociados (AAV), y virus de la rubeola (*por ejemplo*, según se describe en Pugachev et al. (2000) J. Virology 74:10811-15). En la invención, el vector es un vector adenoviral, *por ejemplo*, obtenido de adenovirus 5, por ejemplo, Ad5 con deleciones de las regiones E1/E3 y Ad5 con una delección de la región E4. Otros vectores adenovirales adecuados incluyen las cepas 2, las cepas sometidas a ensayo por vía oral 4 y 7, los adenovirus entéricos 40 y 41, y otras cepas (*por ejemplo* Ad34) que son suficiente para entregar un antígeno y provocar una respuesta inmune adaptada al antígeno transgénico [Lubeck et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 86(17), 6763-6767 (1989); Shen et al., J Virol, 75(9), 4297-4307 (2001); Bailey et al., Virology, 202(2), 695-706 (1994)]. En algunas realizaciones, el vector adenoviral es un vector adenoviral vivo y de replicación incompetente (tal como el rAd5 con E1 y E3 eliminados), un vector adenoviral vivo y atenuado (tal como los virus con delección de E1B55K), o un vector adenoviral vivo con replicación de tipo silvestre.

Las secuencias de control de transcripción y traducción en los vectores de expresión a ser utilizados en la transformación de células de vertebrados *in vivo* pueden proporcionarse mediante fuentes virales. Por ejemplo, los promotores y potenciadores se obtienen, *por ejemplo*, de actina beta, adenovirus, virus simio (SV40), y citomegalovirus humano (CMV). Por ejemplo, son adecuados vectores que permiten la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor del CMV, promotor temprano de SV40, promotor tardío de SV40, promotor de metalotioneína, promotor del virus de tumor mamario murino, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de transducción, u otros promotores que se han mostrado efectivos para la expresión en células de mamíferos. Pueden utilizarse secuencias de promotores genómicos virales, de control y/o de señalización, siempre que las secuencias de control sean compatibles con la célula hospedadora elegida.

B. Polipéptidos de H1N1

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos heterólogos adecuados descritos en la presente patente, pueden obtenerse de los antígenos del virus de la gripe H1N1. El H1N1 infecta los tejidos de la mucosa, tales como el intestino, por tanto los antígenos que dan lugar a una respuesta de la mucosa robusta son de particular interés. Los polipéptidos antigénicos descritos en la presente patente incluyen antígenos de la superficie viral del H1N1 y fragmentos de los mismos. Los polipéptidos antigénicos descritos en la presente patente incluyen, *por ejemplo*, HA, NA, MP, y NP del virus de la gripe H1N1.

Un experto en el arte entenderá cómo identificar y aislar polipéptidos antigénicos a partir de una cepa del H1N1 recién aislada o particularmente virulenta, *por ejemplo*, utilizando comparaciones con secuencias de la gripe conocidas.

Un vector de expresión recombinante descrito en la presente patente puede incluir secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido inmunogénico funcionalmente enlazado a elementos reguladores de la transcripción o la traducción obtenidos a partir de genes de mamíferos o virales. Tales elementos reguladores incluyen promotores, una secuencia que codifica sitios de unión ribosómica del ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Un origen de replicación, un marcador seleccionables para facilitar el reconocimiento de transformantes, y/o una secuencia operadora para controlar la transcripción, pueden incorporarse adicionalmente. En algunos aspectos de la revelación descrita en la presente patente, los componentes del vector de expresión recombinante pueden dividirse entre más de un virus de tal manera que los productos génicos están en dos vectores diferentes, y los vectores se utilizan para la co-transducción para proporcionar todos los productos génicos en transgénicos. Puede haber razones para dividir los productos génicos tales como limitaciones de tamaño para inserciones, o toxicidad de los productos génicos combinados con las líneas celulares producidas por el virus.

C. Agonistas de TLR-3

Los agonistas de TLR-3 se utilizan para incrementar la respuesta inmune ante el polipéptido de H1N1. El agonista de TLR-3 puede ser administrado de forma simultánea en el mismo vector de expresión que codifica un antígeno de interés. En algunos aspectos de la revelación descrita en la presente patente, el agonista de TLR-3 puede ser administrado por separado (*es decir*, en el tiempo o en el espacio) del vector de expresión que codifica un antígeno de interés. Por ejemplo, el vector de expresión puede ser administrado a través de una vía no parenteral (*por ejemplo*, por vía oral, intranasal, o vía mucosa), mientras que el agonista de TLR se administra por una vía parenteral (*por ejemplo*, por vía intramuscular, intraperitoneal, o subcutánea).

Entre los agonistas de TLR-3 se incluyen, por ejemplo, ARN de horquilla corto, ARN obtenido viralmente, segmentos cortos de ARN que pueden formar cadenas dobles, y ARN de interferencia pequeño (ARNip). En algunas realizaciones de la invención, el agonista de TLR-3 es un dsRNA obtenido de forma viral, tal como por ejemplo un dsRNA obtenido a partir de un virus Sindbis o intermedios virales de dsRNA [Alexopoulou et al, Nature 413:732-8 (2001)].

En un modo de realización preferido de la invención, el agonista de TLR-3 es un ARN de horquilla corto. Las secuencias del ARN de horquilla corto comprenden por lo general dos secuencias complementarias unidas por una secuencia conectora. La secuencia conectora en particular no es un aspecto fundamental de la invención. Cualquier secuencia conectora apropiada puede ser utilizada siempre que no interfiera con la hibridación de las dos secuencias complementarias para formar un dsRNA. De forma similar, la secuencia de las extensiones complementarias no es necesariamente fundamental, siempre que las cadenas formen una molécula de doble cadena. Las cadenas no necesitan ser 100% complementarias siempre que se mantenga la estructura de doble cadena. La extensión complementaria se encuentra habitualmente en el rango de 10-30 nucleótidos, *por ejemplo*, 4-10, 5-15, 5-20, 10-25, 20-30, o 10-30 nucleótidos, pero puede ser mayor, *por ejemplo*, 20-100 nucleótidos de longitud.

En algunos modos de realización, la secuencia que codifica el ARN de horquilla corto comprende una secuencia expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOs:1-6, una secuencia con identidad sustancial con una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs:1-6, o una variante de una secuencia expuesta en las SEQ ID NOs:1-6. El dsRNA que es un agonista de TLR-3 no codifica un polipéptido en particular, sino que da como resultado la producción de una citocina pro-inflamatoria (*por ejemplo*, IL-6, IL-8, TNF-alfa, IFN-alfa, IFN-beta) cuando se pone en contacto con una célula respondedora (*por ejemplo*, una célula dendrítica, una célula mononuclear de sangre periférica, o un macrófago) *in vitro* o *in-vivo*.

El ácido nucleico que codifica el agonista de TLR-3 (*por ejemplo*, un dsRNA expresado) y el vector viral quimérico que comprende el ácido nucleico que codifica un antígeno de H1N1 se administran en la misma formulación. En otros casos descritos en la presente patente, el ácido nucleico que codifica el agonista del TLR-3 y el vector viral quimérico que comprende el ácido nucleico que codifica el antígeno de H1N1 se administran en diferentes formulaciones, ya sea simultáneamente o secuencialmente.

En algunos modos de realización, el ácido nucleico que codifica el agonista de TLR-3 y el ácido nucleico que codifica el antígeno de H1N1 están bajo el control del mismo promotor. En otros modos de realización, el ácido nucleico que codifica el agonista de TLR-3 y el ácido nucleico que codifica el antígeno de H1N1 están bajo el control de diferentes promotores.

Diversos análogos de ARN de doble cadena sintetizados químicamente se encuentran comercialmente disponibles. Entre éstos se incluyen ácido poliinosínico-policitidílico (poli I:C), ácido poliadenílico-poliuridílico (poli A:U), y poli I:poli C. Los anticuerpos (o el entrecruzamiento de anticuerpos) para el TLR-3 puede además conducir a la producción de IFN- beta o citocina pro-inflamatoria [Matsumoto et al, Biochem. Biophys. Res. Commun. 24:1364 (2002), de Bouteiller et al, J Biol. Chem. 18:38133-45 (2005)]. Los segmentos de ARNip de cualquier secuencia disponibles comercialmente pueden también obtenerse mediante fuentes tales como Invitrogen.

IV. Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas que comprenden los vectores descritos en la presente patente pueden incluir vehículos farmacéuticamente aceptables, que pueden ser biológicamente activos o inactivos. Las composiciones farmacéuticas pueden en general ser utilizadas para propósitos profilácticos y terapéuticos. En algunos modos de realización, la composición farmacéutica puede estar designada para proteger contra la degradación del estómago. Para el entorno oral, diversas composiciones de ese tipo están disponibles, incluyendo los sistemas de liberación Eudragit y TimeClock, además de otros métodos específicamente diseñados para adenovirus [Lubeck et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86(17), 6763-6767 (1989); Chourasia y Jain, J Pharm Pharm Sci, 6(1), 33-66 (2003)]. Existen además diversos métodos ya descritos para la microencapsulación de ADN y fármacos para su administración por vía oral (*ver, por ejemplo*, la publicación de patente de Estados Unidos N° 2004043952). En algunos modos de realización, el sistema Eudragit puede ser utilizado para administrar el vector viral quimérico al intestino delgado. Sin embargo, la administración a otras localizaciones del intestino delgado es también ventajosa para la protección contra el virus H1N1.

Los vectores virales quiméricos de la invención pueden ser administrados utilizando cualquier sistema de administración conocido en el arte. Numerosas técnicas de administración son bien conocidas, tales como las descritas por Rolland (1998) Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems 15:143-198, y las referencias citadas en la presente patente.

Resultará evidente que una composición inmunogénica puede contener sales farmacéuticamente aceptables de los polinucleótidos que codifican los polipéptidos inmunogénicos de H1N1. Tales sales pueden ser preparadas a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables, incluyendo bases orgánicas (*por ejemplo*, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias y aminoácidos básicos), y bases inorgánicas (*por ejemplo*, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio). Algunos ejemplos en particular de sales incluyen solución tampón de fosfatos y suero salino para inyección.

Puede emplearse cualquier vehículo adecuado conocido para los expertos habituales en el arte en las composiciones farmacéuticas de esta invención. Entre los vehículos adecuados se incluyen, por ejemplo, agua, suero salino, alcohol, una grasa, una cera, un tampón, un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, y carbonato de magnesio, o microesferas biodegradables (*por ejemplo*, polilactato-poliglicolato). Microesferas biodegradables adecuadas se revelan, por ejemplo, en las patentes estadounidenses Nos. 4.897.268; 5.075.109; 5.928.647; 5.811.128; 5.820.883. El vector viral quimérico puede ser encapsulado dentro de la microesfera o asociarse a la superficie de la microesfera.

Las composiciones de ese tipo pueden comprender tampones (*por ejemplo*, tampón de solución salina neutra o tampón de solución salina de fosfatos), carbohidratos (*por ejemplo*, glucosa, manosea, sacarosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostatos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (*por ejemplo*, hidróxido de aluminio), solutos que vuelven la formulación isotónica, hipotónica o ligeramente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. De forma alternativa, las composiciones de la presente invención pueden ser formuladas como un liofilizado. Los compuestos pueden también ser encapsulados dentro de liposomas utilizando una tecnología bien conocida.

En algunos modos de realización, las composiciones pueden comprender un adyuvante adicional. Adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, los compuestos lipídicos y no lipídicos, toxina del cólera (CT), subunidad B de la CT, derivado CTK63 de la CT, enterotoxina lábil al calor de E. coli (LT), derivado LTK63 de la LT, Al(OH)₃, y ácidos poliiónicos según se describe en *por ejemplo*, WO 04/020592, Anderson y Crowle, Infect. Immun. 31(1):413-418 (1981), Roterman et al., J. Physiol. Pharmacol., 44(3):213-32 (1993), Arora y Crowle, J. Reticuloendothel. 24(3):271-86 (1978), y Crowle y May, Infect. Immun. 38(3):932-7 (1982). Ácidos poliiónicos orgánicos adecuados incluyen, por ejemplo, ácido 6,6'-[3,3'-dimitil[1,1'-bifenil]-4,4'-diil]bis(azo)bis[4-amino-5-hidroxi-1,3-naftalen-disulfónico] (Azul Evans) y ácido 3,3'-[1,1'-bifenil]-4,4'-diilbis(azo)bis[4-amino-1-naftalenosulfónico] (Rojo Congo). Se podrá apreciar por los expertos en el arte que los ácidos orgánicos poliiónicos pueden ser utilizados para métodos de vacunación basados en genes, en conjunto con cualquier otra vía de administración.

Otros adyuvantes adecuados incluyen inmunomoduladores tales como los miembros de la familia imidazoquinolina, *por ejemplo*, imiquimod y resiquimod (*ver, por ejemplo*, Hengge et al., Lancet Infect. Dis. 1(3):189-98 (2001)).

Adyuvantes adicionales adecuados se encuentran comercialmente disponibles como, por ejemplo, adyuvantes adicionales basados en aluminio (*por ejemplo*, Alhydrogel, Rehydrigel, fosfato de aluminio, Algammulin); adyuvantes a base de aceite (adyuvante de Freund incompleto y Adyuvante completo (Difco Laboratories, Detroit, Mich.), Specol, RIBI, TiterMax, Montanide ISA50 o Seppic MONTANIDE ISA 720); adyuvantes basados en copolímeros en bloque no iónicos, citocinas (*por ejemplo*, GM-CSF o ligando Flat3); adyuvante 65 de Merck (Merck y Compañía, Inc., Rahway, N.J.); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, Pa.); sales de calcio, hierro o zinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos derivados catiónicamente o iónicamente; polifosfocenos; microesferas biodegradables; monofosforil lípido A and Quil A. Citocinas, tales como GM-CSF o interleucina-2, -7, o -12, son también adyuvantes adecuados. Hemocianinas (e.g., hemocianina extraída de lapa californiana) y hemeritinas también pueden utilizarse. Adyuvantes polisacáridos tales como, por ejemplo, quitina, chitosán, y quitina desacetilada son también adyuvantes. Otros adyuvantes adecuados incluyen dipéptido de muramilo (MDP, N acetilmuramilo L alanilo D isoglutamina) péptidoglicanos y sus derivados (*por ejemplo*, treonil-MDP, y MTPPE). El esqueleto de la pared celular (CWS) BCG y BCG pueden también utilizarse como adyuvantes, con o sin trehalosa dimicolato. La trehalosa dimicolato puede ser utilizada también (*ver, por ejemplo*, la patente estadounidense N° 4.579.945). También son útiles como adyuvantes las endotoxinas destoxificadas solas o en combinación con otros adyuvantes (*ver, por ejemplo*, las patentes estadounidenses Nos. 4.866.034; 4.435.386; 4.505.899; 4.436.727; 4.436.728; 4.505.900; y 4.520.019. Las saponinas QS21, QS17, QS7 también son útiles como adyuvantes (*ver, por ejemplo*, la patente estadounidense N° 5.057.540; la EP 0362 279; WO 96/33739; y WO 96/11711). Otros adyuvantes adecuados incluyen Montanide ISA-720 (Seppic, France), SAF (Chiron, Calif., Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie SBAS de adyuvantes (*por ejemplo*, SBAS-2, SBAS-4 o SBAS-6 o variantes de los mismos, disponibles de SmithKline Beecham, Rixensart, Belgium), Detox (Corixa, Hamilton, Mont.), y RC-529 (Corixa, Hamilton, Mont.).

Los superantígenos también se contemplan para su uso como adyuvantes. Los superantígenos incluyen exoproteínas de estafilococo, tales como las enterotoxinas α , β , γ y Δ de S. aureus y S. epidermidis, y las exotoxinas α , β , γ y Δ de E. coli. Las enterotoxinas de estafilococo comunes son conocidas como enterotoxina estafilocócica A (SEA) y enterotoxina estafilocócica B (SEB), estando las enterotoxinas descritas hasta la E (SEE) (Rott et al., 1992). Estreptococo pyogenes B (SEB), enterotoxina del Clostridium perfringens (Bowness et al., 1992), proteína citoplasmática asociada a la membrana (CAP) de S. pyogenes (Sato et al., 1994) y toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST 1) de S. aureus (Schwab et al., 1993) son también superantígenos de utilidad.

Dentro de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente patente, la composición adyuvante puede estar diseñada para inducir, *por ejemplo*, una respuesta inmune predominantemente de tipo Th1 o Th2. Los niveles

altos de las citocinas de tipo Th1- (*por ejemplo*, IFN-gamma, TNF-alfa, IL-2 y IL-12) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes mediadas por la célula a un antígeno administrado. En contraste, elevados niveles de citocinas del tipo Th2 (*por ejemplo*, IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10) tienden a favorecer la inducción de las respuestas inmunes humorales. La administración por vía oral de una composición que comprende un polipéptido de H1N1 inmunogénico puede inducir a una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1- y Th2.

Las composiciones descritas en la presente patente pueden ser administradas como parte de una formulación de liberación controlada (*es decir*, una formulación tal como una cápsula o esponja que efectúa una liberación lenta del compuesto a continuación de su administración). Las formulaciones de ese tipo pueden ser preparadas, generalmente, utilizando tecnología bien conocida (*ver, por ejemplo*, Coombes et al. (1996) Vaccine 14:1429-1438). Las formulaciones de liberación controlada pueden contener un polipéptido, polinucleótido o un anticuerpo dispersado en una matriz de vehículo y/o estar incluidas en un depósito rodeado por una membrana para el control de la tasa de liberación.

Los vehículos para su uso con dichas formulaciones son biocompatibles, y pueden también ser biodegradables; preferiblemente, la formulación proporciona un nivel relativamente constante de liberación de componente activo. Dichos vehículos incluyen microparticulas de poly(láctido-co-glicólido), además de poliacrilato, látex, almidón, celulosa y dextrano. Otros vehículos de liberación retardada incluyen biovectores supramoleculares, que comprenden un núcleo hidrofílico no líquido (*por ejemplo*, un polisacárido u oligosacárido entrecruzado) y, opcionalmente una capa externa que comprende un compuesto anfifílico (*ver, por ejemplo*, WO 94/20078; WO 94/23701; y WO 96/06638). La cantidad de compuesto activo contenido en una formulación de liberación controlada depende del sitio de implantación, la tasa y duración esperada y la naturaleza de la condición a ser tratada o prevenida.

La composición farmacéutica puede ser presentada en envases de dosis unitaria o multi-dosis, tales como ampollas o viales sellados. Tales envases se encuentran preferiblemente herméticamente sellados para conservar la esterilidad de la formulación hasta que se encuentre en uso. En general, las formulaciones pueden ser almacenadas como suspensiones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos. De manera alternativa, una composición farmacéutica puede ser almacenada en una condición de liofilizado que requiera únicamente de la adición de un vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su uso.

V. Usos terapéuticos de la invención

La invención proporciona vacunas para reducir la probabilidad de o la gravedad de una infección por H1N1. Tal como se utiliza en la presente patente un "sujeto" o "paciente" hace referencia a un animal de sangre caliente, tal como, por ejemplo un roedor, un felino, canino, o un primate, *por ejemplo*, un humano.

Las composiciones inmunogénicas pueden ser utilizadas para tratar cualquier etapa, *por ejemplo*, para prevenir la infección con una cepa diferente de H1N1 en un individuo que ya ha experimentado una infección con una cepa de H1N1. Dentro de dichos métodos, las composiciones farmacéuticas se administran de manera habitual a un paciente. El paciente puede o no estar infectado o expuesto aún. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas pueden ser utilizadas para prevenir el desarrollo de una infección o de los síntomas. La infección o exposición puede ser diagnosticada de acuerdo con métodos conocidos en el arte, *por ejemplo*, midiendo el título viral o el anticuerpo viral específico en una muestra del paciente.

La inmunoterapia es habitualmente inmunoterapia activa, en la que el tratamiento se sostiene en la estimulación *in vivo* del sistema inmunológico huésped endógeno para reaccionar contra el virus o las células infectadas viralmente.

La frecuencia de administración de las composiciones profilácticas o terapéuticas descritas en la presente patente, además de la dosificación, variará de un individuo a otro, y puede ser establecida fácilmente utilizando técnicas estándar. Por ejemplo, entre 1 y 10 dosis puede administrarse durante un periodo de tiempo establecido (*por ejemplo*, 1 o 2 semanas, o 1, 2, o 3 meses) o durante el transcurso de un brote pandémico. En algunos modos de realización, se administran 3 dosis en intervalos de 1 mes. En algunos modos de realización, se administran 2-3 dosis cada 2-3 meses. Pueden suministrarse vacunaciones de refuerzo periódicamente, después de las mismas, *por ejemplo*, para la duración de la pandemia o si existe riesgo de resurgimiento de la cepa diana o de una cepa similar.

Un experto en el arte de la medicina apreciará que la dosificación y la frecuencia de administración variará para cada paciente individualmente. Una dosis adecuada es una cantidad de la composición que, cuando se administra tal como se ha descrito anteriormente, es capaz de promover una respuesta inmune anti-viral que está al menos un 10-50% por encima del nivel de referencia (*es decir*, sin tratar). Una respuesta de ese tipo puede ser monitorizada midiendo los anticuerpos específicos en un paciente o mediante la generación dependiente de vacunas de linfocitos T citolíticos capaces de matar las células infectadas viralmente *in vitro*. Tales vacunas deberían ser capaces de generar una respuesta inmune que conduce a un resultado clínico mejorado en pacientes vacunados en comparación con pacientes no vacunados.

En general, una dosificación y régimen de tratamiento apropiados proporciona el o los compuestos activos en una cantidad suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico y/o profiláctico. Una respuesta de este tipo puede ser monitorizada mediante establecimiento de un resultado clínico mejorado (*por ejemplo*, una reducción en la gravedad de los síntomas, tales como la pérdida de peso, una baja cantidad o ningún título viral detectable, una mayor oportunidad de supervivencia), en pacientes tratados en comparación con pacientes no tratados. Dichas respuestas inmunes pueden ser evaluadas generalmente utilizando ensayos de proliferación, citotoxicidad o citocinas descritos anteriormente. Las respuestas inmunes pueden determinarse utilizando las muestras obtenidas a partir de un paciente antes y después del tratamiento, o en comparación con una respuesta media de una población, *por ejemplo*, de individuos similares.

La detección de inmunocomplejos formados entre polipéptidos inmunogénicos y anticuerpos en el fluido corporal puede utilizarse para monitorizar la efectividad de la terapia. Las muestras del fluido corporal tomadas de un individuo previamente a y posteriormente a la vacunación pueden ser analizadas para los inmunocomplejos mediante las metodologías descritas anteriormente. Un cambio sustancial en el número de inmunocomplejos en la segunda muestra (posterior a la vacunación) en relación a la primera muestra (previa a la vacunación) puede reflejar el éxito de la vacunación.

A. Administración de las composiciones de la invención

Una composición que comprende el vector viral quimérico descrito en la presente patente puede ser administrado mediante una vía no parenteral (*por ejemplo*, por vía oral, intranasal, o vía mucosa, *por ejemplo* la vagina, los pulmones, glándulas salivales, cavidades nasales, intestino delgado, colon, recto, amígdalas, o placas de Peyer). La composición puede ser administrada sola o con un adyuvante adicional según se describe anteriormente.

B. Detección de una respuesta inmune a los antígenos de interés

Una respuesta inmune al polipéptido antigénico de H1N1 puede ser detectada utilizando cualquier medio conocido en el arte, incluyendo *por ejemplo* detectar la activación específica de linfocitos T CD4+ o CD8+ o detectando la presencia de anticuerpos que se unen de forma específica al polipéptido.

La activación específica de los linfocitos T CD4+ o CD8+ T asociados a una respuesta inmune de la mucosa, humoral, o mediada por la célula puede ser detectada en una variedad de formas. Métodos para detectar la activación específica de linfocitos T incluye, pero no se limita a, detectar la proliferación de linfocitos T, la producción de citocinas (*por ejemplo*, linfoquinas) o la generación de actividad citolítica (*es decir*, la generación de linfocitos T citotóxicos específicos para el polipéptido inmunogénico). Para los linfocitos T CD4+, la activación puede ser determinada por la detección de proliferación. Para los linfocitos T CD8+ la activación puede ser detectada por la generación de actividad citolítica utilizando ensayos de liberación ⁵¹Cr (*ver, por ejemplo*, Brossart and Bevan, Blood 90(4): 1594-1599 (1997) y Lenz et al., J. Exp. Med. 192(8):1135-1142 (2000)).

La detección de la proliferación de los linfocitos T puede lograrse mediante una variedad de técnicas conocidas. *Por ejemplo*, la proliferación de linfocitos T puede ser detectada midiendo la tasa de síntesis del ADN. Los linfocitos T que han sido estimulados para proliferar muestran una tasa de síntesis del ADN elevada. Una forma típica para medir la tasa de síntesis del ADN es, *por ejemplo*, mediante cultivos de marcaje de pulso de los linfocitos T con timidina tritiada, un precursor de nucleósidos que se incorpora al ADN recién sintetizado. La cantidad de timidina tritiada incorporada puede determinarse utilizando un espectrómetro de centelleo líquido. Otras formas de detectar la proliferación de linfocitos T incluyen medir aumentos en la producción de interleucina 2 (IL-2), flujo de Ca²⁺, o captación del colorante, tal como 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio. De manera alternativa, puede medirse la síntesis de linfoquinas (*por ejemplo*, interferón-gamma), o la cantidad relativa de linfocitos T que pueden responder al polipéptido inmunogénico puede cuantificada.

Las respuestas inmune de los anticuerpos (respuestas inmunes humorales o respuestas de los linfocitos B), incluyendo las respuestas del anticuerpo de la mucosa pueden ser detectadas utilizando inmunoensayos conocidos en el arte [Tucker et al., Mol Therapy, 8, 392-399 (2003); Tucker et al., Vaccine, 22, 2500-2504 (2004)]. Inmunoensayos adecuados incluyen la técnica de inmunoensayo doble tipo sándwich de anticuerpos monoclonales de David et al. (U.S. Pat. No. 4.376.110); ensayos tipo sándwich de anticuerpos monoclonales-policlinales (Wide et al., en Kirkham y Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. y S. Livingstone, Edinburgh (1970)); el método "western blot" de Gordon et al. (Patente estadounidense N° 4.452.901); inmunoprecipitación del ligando marcado (Brown et al. (1980) J. Biol. Chem. 255:4980-4983); ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), según se describe, *por ejemplo*, por Raines et al. (1982) J. Biol. Chem. 257:5154-5160; técnicas inmunocitoquímicas, incluyendo el uso de fluorocromos (Brooks et al. (1980) Clin. Exp. Immunol. 39:477); y neutralización de la actividad (Bowen-Pope et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2396-2400). Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, una cantidad de otros inmunoensayos están disponibles, incluyendo los descritos en las patentes estadounidenses Nos. 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Los ejemplos se proporcionan para ilustrar la invención pero no para limitar su alcance. Otras variantes de la invención resultarán fácilmente obvias para una persona experta en el arte habitual y se abarcan en las reivindicaciones adjuntas.

VI. Ejemplos

5 Ejemplo 1: Construcción de un vector adenoviral quimérico (DX1) que codifica un adyuvante de dsRNA y un polipéptido HA de H1N1.

La secuencia de codificación para HA de la cepa A/CA/04/09 de la gripe (sintetizada por Blue Heron) fue clonada en un sitio de restricción KpnI de un vector versátil (pShuttleCMV, Qbiogene). El codón de iniciación para la secuencia de HA se encuentra inmediatamente aguas debajo del promotor de CMV con un pequeño intrón. Una secuencia bGH poli A inmediatamente sigue el gen HA. El vector pVersátil además incluye una secuencia que codifica un adyuvante de una horquilla de dsRNA (luc1, SEQ ID NO:1), de manera que tanto el antígeno como el adyuvante se codifican los dos en el mismo vector pero con promotores de CMV separados. Este vector versátil se denomina pCMVHA-CMV-1uc1.

15 La recombinación homóloga de pCMV-HA-CMV-1uc1 con la cadena principal adenoviral, pAd (Qbiogene), se realizó para generar un constructo del plásmido capaz de producir un vector adenoviral recombinante (con delección de E1/E3) que expresaba el transgén HA y la secuencia de codificación para la horquilla de dsRNA luc1. Este vector se denomina pAd-DX1, como se muestra en la SEQ ID NO:7. El Ad recombinante se generó mediante transfección de un constructo de expresión linealizado pAd-DX1 en células HEK293. Este vector viral se denomina DX1. Los títulos virales (unidades infecciosas (UI/ ml) se midieron por un ensayo de inmunotinción por hexón que es similar al inmunoensayo QuickTiter™ descrito por Cell Biolabs Inc. (San Diego, CA).

20 Ejemplo 2: DX1 oral es superior al rAd5 inyectado para inducir respuestas inmunes específicas a un antígeno en los tejidos de la mucosa

25 Generar un título de anticuerpos elevado para la administración de un antígeno basado en genes y administrado por vía oral supone un desafío. Buscábamos determinar si el vector DX1 podía inducir títulos sustanciales de anticuerpos de la mucosa y sistémicos. Según se ha explicado anteriormente, el DX1 expresa HA bajo control del promotor de CMV en un vector tipo 5 de adenovirus con delección de E1/E3. A los ratones hembra Balb/c se les administró el vector DX1 mediante alimentación forzada en las semanas 0 y 5 con $1,0 \times 10^7$ UI o $1,0 \times 10^8$ UI de DX1 (etiquetado Ad-CA04/09-Adj en la Figura 1) o mediante inmunización intramuscular (i.m.) de $1,0 \times 10^8$ UI de DX1 (N=6 para cada grupo). Se vacunaron los grupos de control con un vector Ad similar que expresa un antígeno de H1N1 HA de la cepa de la gripe de laboratorio A/PR/8/34 (marcada como Ad-PR8/34-Adj en la Figura 1). A/PR/8/34 no se considera sumamente similar a la cepa A/CA/04/09 de H1N1. El porcentaje de identidad de aminoácidos de la proteína HA se encuentra en el orden del 75-85%. El vector de control Ad vector también se administró o bien por vía oral (marcado p.o.) o por inyección i.m.. Los ratones no tratados proporcionaron un control adicional.

35 Para determinar la respuesta sistémica de anticuerpos, medimos los títulos de anticuerpos en plasma posteriormente a la vacunación. Los títulos de anticuerpos para A/CA/4/09 HA se midieron en el plasma 2, 3, 5 y 8 semanas después de la administración inicial del virus mediante ELISA anti-HA IgG (Figura 1A). Las inmunizaciones con oral e i.m. con DX1 produjeron inmunidad anti-HA IgG sistémica comparable en 8 semanas posteriormente a la vacunación.

40 Se midieron también los títulos de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (HAI) en plasma a las 3, 5, y 8 semanas posteriormente a la vacunación (Figura 1B). Se generaron títulos de HAI significativos en ambos grupos orales (p.o.). En 8 semanas, la elevada dosis oral mostró títulos de HAI esencialmente equivalentes a los generados mediante inyección muscular. El vector PR/8/34 HA no indujo los títulos de HAI por encima de la señal de fondo del ensayo, ya que ELISA se basó en la unión de anticuerpos al antígeno de HA de A/CA/4/09.

45 Los títulos de anticuerpos IgA para HA se midieron en muestras fecales a las 8 semanas posteriores a la administración (Figura 1C), lavados vaginales en la semana 10 posterior a la administración (Figura 1D), y lavados pulmonares en la semana 12 posterior a la administración (Figura 1E). Estos resultados demuestran que la administración por vía oral del vector DX1 funcionó de una forma significativamente mejor que la administración i.m. a la hora de provocar respuestas de anticuerpos para la proteína HA tanto en tejidos de la mucosa locales (intestino) como distales (vagina & pulmones). En particular, el título medio de anticuerpos para HA fue 17-veces mejor en los tejidos intestinales (IgA fecal) después de las inmunizaciones orales que después de la vacunación i.m. (Figura 1C).

50 Sorprendentemente, una dosis 10 veces más baja de DX1 administrado por vía oral indujo una respuesta de IgA específica equivalente o mejor que la administración por vía i.m. de DX1 en lavados pulmonares, lavados vaginales, y pellets fecales (Figuras 1C, 1D, 1E). Además, la administración oral del vector PR/8/34 con una muy pobre reacción cruzada dio como resultado una respuesta de IgA específica similar a la de DX1 administrado por vía i.m.

Los resultados de IgA específicos indican que el uso oral de DX1 proporciona una protección superior contra el virus de la gripe H1N1, un patógeno que invade a través de la mucosa. Por tanto, el uso de la aproximación de la presente vacuna adenoviral puede permitir dosis efectivas inferiores de vacuna. Además, la vacunación con un antígeno no coincidente puede aún conferir un poco de protección inmune específica. Éstas son consideraciones importantes durante una pandemia, cuando el suministro de vacunas es fundamental y la disponibilidad de una cepa de vacuna completamente coincidente puede no ser posible.

Ejemplo 3: Demostración de que la administración oral de DX1 puede proteger a animales contra la prueba de provocación de la gripe

Se inmunizaron ratones con los grupos detallados en la Tabla 1 en las semanas 0 y 4. Se realizó inmunización mediante alimentación forzada con 1×10^8 o 1×10^7 UI de DX1 (Grupos A y C). A modo de control de la administración, se realizó también una inmunización i.m. con Dx1 (Grupo B). Para controlar posibles efectos del adyuvante aguas abajo (downstream), utilizamos un vector de control de adyuvante que expresa el adyuvante de dsRNA, pero no el antígeno. Los ratones no tratados se utilizaron como control negativo. La cantidad de animales en cada grupo de prueba de provocación fueron 6.

Los animales fueron sometidos a prueba de provocación con un virus H1N1 pandémico (A/CA/07/2009) en la semana 9 (día 64), utilizando una dosis de $8,6 \times 10^5$ TCID₅₀. El A/CA/07/2009 se considera muy similar al A/CA/04/09, y las proteínas HA comparten más del 95% de identidad de aminoácidos. Se midió en los animales la pérdida de peso durante 14 días después de la prueba de provocación, ya que la pérdida de peso es un indicador de la salud de los animales.

Los resultados muestran que los animales inmunizados con DX1 estaban completamente protegidos contra la muerte y la pérdida sustancial de peso (Figuras 2A y 2B). $P < 0,03$ mediante test exacto de Fisher cuando se compara con los grupos con DX1 con grupos no tratados o con grupos de control de adyuvante para la supervivencia. El control de adyuvante y los ratones no tratados todos perdieron cantidades significativas de peso y la mayoría murió como resultado de la prueba de provocación. Particularmente significativos son los datos que muestran que una dosis oral de DX1 puede todavía proteger el 100% de los animales, con una protección del peso equivalente a los animales inmunizados por vía i.m.

Tabla 1

Grupo	Etiqueta Figura 2	Descripción	N
A	Oral	2X Inmunización oral con $1e8$ UI de DX1	6
B	IM	2X Inmunización IM con $1e8$ UI de DX1	6
C	dosis oral lo	2X Inmunización oral con $1e7$ UI de DX1	6
D	control Ady	2X Inmunización oral $1e8$ UI con un vector de control adyuvante	6
E	No tratados	No tratados	6

Ejemplo 4: Demostración de que la administración oral de DX1 es superior a rAd5 para provocar respuestas de anticuerpos para el virus de la gripe H1N1

Se construyó un segundo vector rAd que expresa la HA a partir de A/CA/04/09, esta vez sin el adyuvante de dsRNA expresado. Este vector se denominó DX2. Se dosificó a ratones Balb/c mediante alimentación forzada por vía oral en las semanas 0 y 4 con $1,0 \times 10^7$ UI de DX1 o DX2 (denominado rAd5 (no adyuvante) en la Figura 3). N=6 para este experimento. Los títulos de anticuerpos para A/CA/4/09 HA se midieron en el plasma 3 y 7 semanas después de la administración mediante ELISA anti-HA IgG (Figura 3). Los resultados muestran que el DX1 indujo un título superior de anticuerpos que DX2, lo que demuestra que el adyuvante mejora las respuestas inmunes para HA a continuación de la administración oral.

Listado de secuencias

<110> Tucker, Sean N. Scallan, Ciaran Vaxart, Inc.

<120> Estrategia de inmunización para prevenir infección por H1N1

<130> 026163-001310PC

- <140> WO No asignada aún
- <141> No asignada aún
- <150> US 61/243.070
- <151> 2009-09-16
- 5 <160> 7
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- <211> 46
- <212> ADN
- 10 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia de codificación de dsRNA sintético
- <400> 1
- gaaacgatat gggctgaata ctaagtatt cagcccatat cgttcc 46
- 15 <210> 2
- <211> 46
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 20 <223> secuencia de codificación de dsRNA sintético
- <400> 2
- gatggtgctt caagctagta ctaagtact agcttgaagc accatc 46
- <210> 3
- <211> 48
- 25 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> secuencia de codificación de dsRNA sintético
- <400> 3
- 30 gatggtgctt caagctagta cggatccgta ctagcttgaa gcaccatc 48
- <210> 4

- <211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
- 5 <223> secuencia de codificación de dsRNA sintético
<400> 4
gaaacgatat gggctgaata cggatccgta ttcagcccat atcgttc 48
<210> 5
<211> 46
- 10 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> secuencia de codificación de dsRNA sintético
<400> 5
- 15 cctaataatt atcaaatgt ggatccacat tttgataatt attagg 46
<210> 6
<211> 44
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> secuencia de codificación de dsRNA sintético
<400> 6
cctaataatt atcaaatgt aattacatt tgataattat tagg 44
<210> 7
- 25 <211> 34383
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> vector pAd-DX1 sintético de tipo 5 de adenovirus recombinante quimérico con delección de E1/E3
- 30 <221> base_modificada
<222> (34373)...(34377)

<223> n = g, a, c ó t

<400> 7

```

taaggatccc atcatcaata atatacctta ttttggattg aagccaatat gataatgagg 60
gggtggagtt tgtgacgtgg cgcggggcgt gggaacgggg cgggtgacgt agtagtgtgg 120
cggaagtgtg atgttgcaag tgtggcggaa cacatgtaag cgacggatgt ggcaaaagtg 180
acgtttttgg tgtgcccggg tgtacacagg aagtgacaat tttcgcgcgg ttttaggcgg 240
atgttgtagt aaatttgggc gtaaccgagt aagatttggc cattttcgcg ggaaaactga 300
ataagaggaa gtgaaatctg aataattttg tgttactcat agcgcgtaat actgctagag 360
atctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc 420
agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg aattgtaata cgactcacta tagggcgaaat 480
tgggtactgg ccacagagct tggcccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac 540
atztatattg gctcatgtcc aacattaccg ccatgttgac attgattatt gactagttat 600
taatagtaat caattacggg gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca 660
taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca 720
aagtacgct atgttcccat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg 780
gagtatttac ggtaaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtacg 840
ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc 900
ttatgggact ttccacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg 960
atgcggtttt ggcagtacat caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca 1020
agtctccacc ccattgacgt caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt 1080
ccaaaatgtc gtaacaactc cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacgggtg 1140
gaggtctata taagcagagc tcgttttagtg aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca 1200
cgctgttttg acctccatag aagacaccgg gaccgatcca gcctgactct agcctagctc 1260
tgaagttggt ggtgaggccc tgggcagggt ggtatcaagg ttacaagaca ggtttaagga 1320
gaccaataga aactgggcat gtggagacag agaagactct tgggtttctg ataggcactg 1380
actctctctg cctattggtc tattttcca cccttaggct gctggtctga gcctaggaga 1440
tctctcgagg tcgacgggat cgatgggtac cgccaccatg aaggctatac ttgtcgtact 1500
gctctacacg ttcgctactg ctaacgccga caccctctgc attggatacc atgccataa 1560
ctctaccgat actgtggaca cggtgctgga aaaaaacgtg acagtaacac actcagtgaa 1620
ccttctcgaa gacaagcaca atggcaaact gtgcaagctg cggggcgttg ctctctcgca 1680
cctgggcaaa tgtaacatag ccggctggat tcttggcaat ccagagtgcg aatctttgag 1740

```

caccgcaagc agctggagtt acattgtgga aaccccgtcc tccgataacg gaacttgcta 1800
 cccaggagac tttatcgact acgaggaact gagagagcag ctcagctccg tgtcttcctt 1860
 cgaacgcttt gagatcttcc caaaaacatc ctctggcca aaccacgata gtaacaaggg 1920
 ggtaacagcc gcgtgccac atgcaggggc taaatcattt tataagaacc tcactctggct 1980
 cgtgaagaag ggtaacagct acccaaaact ttctaagtct tatataaacg ataagggcaa 2040
 ggaggttctg gtctctgtgg gtatacacca tccctctacc agtgacagacc agcaatcatt 2100
 gtatcagaac gctgacacat acgttttctg aggctctagc agatattcca agaaattcaa 2160
 gccagagatc gccatcagc ctaaggtccg cgaccaggag ggccgaatga actattactg 2220
 gacactcgtc gaacctgggg ataagattac ctttgaggcc actggtaatc tggttgttcc 2280
 tagatacgc ttcgctatgg agcgcaatgc cggtagtggc atcataatct ctgacacccc 2340
 cgttcacgac tgtaatacca cttgccagac ccctaaagga gcaatcaata cctcattgcc 2400
 cttccagaat atccatccca tcacaatagg aaagtgccct aaatacgtga aaagcaccaa 2460
 gctgcggttg gccactggtc tgcggaatat accgagcacc cagtctcgag gactcttcgg 2520
 ggcaatcget ggggtttatcg agggcggtg gaccgggatg gtcgacggtt ggtacggata 2580
 ccaccatcag aacagcaag ggtccggcta tggcgagac ctcaagtcta cccagaacgc 2640
 catcgatgag attacgaata aagtaaatc cgtgatcgag aagatgaata cacagttac 2700
 agccgtgggg aaggagttca accatctgga aaagcggatt gaaaacctga ataaaaaagt 2760
 ggatgatgga tttttggata tttggactta caacgccgag ctgctcgttc tgctggagaa 2820
 tgaagaacc ctggattacc acgatagtaa cgtgaagaac ctttacgaga aagtaggag 2880
 ccaactgaag aataacgeta aagaaatcgg caacggttgc tttgaattct accacaagtg 2940
 cgataacaca tgcattggag ctgttaaaaa tgggacttac gactatccta aatactccga 3000
 ggaagacaag ttgaatagag aggagatcga tggagtcaag ctcgagagca cgcgattta 3060
 ccagatactg gccatttatt ccacagttgc gtcacccctg gtgctcgttg tgagcttggg 3120
 ggccatatcc ttctggatgt gctctaaccg gagcctccag tgtcgaatct gcacggtac 3180
 cggcggccgc cctattctat agtgtcacct aaatgctaga gctcgtgat cagcctcgac 3240
 tgtgccttct agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgacct 3300
 ggaaggtgcc actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct 3360
 gagtaggtgt cattedattc tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gacaggttg 3420
 ggaagacaat agcaggcatg ctggggatgc ggtgggctct atggctctg agggcgaag 3480
 aaccaagct tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat agcccatata tggagttccg 3540
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggctgaccg cccaacgacc cccgccatt 3600
 gacgtcaata atgacgatg ttcccatagt aacgccataa gggacttcc attgacgtca 3660
 atgggtggag tatttacggt aaactgccc cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 3720
 aagtacgcc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gectggcatt atgcccagta 3780
 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 3840
 catgggtgat cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 3900
 atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagtttg ttttggcacc aaaatcaacg 3960
 ggactttcca aaatgtcgt acaactccgc cccattgacg caaatggcg gtaggcgtgt 4020
 acgggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagagatc 4080
 tgggaaacga tatgggctga atacggatcc gtattcagcc catatcgttt ctctagaaat 4140
 aaaatctct tatttctatt acatctgtgt cttgggtttt tgtgtggcgg ccgctcagac 4200
 ctaagcttct agataagata tccgatccac gttgatctaga taactgatca taatcagcca 4260
 taccacattt gtagaggttt tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct 4320
 gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgttgt taacttgttt attgcagctt ataatggtta 4380
 caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca ttttttcac tgcattctag 4440
 ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc ttaacgcgga tctgggctg gtaaggggtg 4500
 ggaagaata tataaggtgg ggtcttatg tagttttgta tetgttttg agcagccgc 4560
 gccgccatga gaccaactc gtttgatgga agcattgtga gcttctgac tccaagaatc 4620
 tgggcgtggt taagggtggg aaagaatata taagggtggg gtcttatgta gttttgtatc 4680
 tgttttgag cagccgccgc cgccatgagc accaactcgt ttgatggaag cattgtgagc 4740
 tcataattga caacgcgcat gcccccattg gccggggtgc gtcagaatgt gatgggctcc 4800
 agcattgatg gtcgccccgt cctgcccgca aactctacta ccttgacctc cgagaccgtg 4860
 tctggaacgc cgttgagac tgcagcctcc gcccgctt cagccgctgc agccaccgc 4920
 cgcggcttg tgactgact tgccttctg agcccgtt caagcagtgc agctcccgt 4980
 tcacccgcc cegatgacaa gttgacggt cttttggcac aattggattc tttgaccgg 5040
 gaacttaatg tcgtttctca gcagctgttg gatctgcgcc agcaggttc tgccctgaag 5100
 gcttctccc ctcccaatgc ggtttaaacc ataaataaaa aaccagactc tgtttggatt 5160
 tggatcaagc aagtgtcttg ctgtctttat ttaggggttt tgcgcgcg gtagggccgg 5220
 gaccagcgtt ctcggtcgtt gagggtcctg tgtattttt ccaggacgtg gtaaaaggtga 5280
 ctctggatgt tcagatacat gggcataagc ccgtctctg ggtggaggta gccaccatgc 5340
 agagcttcat gctcgggggt ggtgtgtag atgatccagt cgtagcagga gcctggcg 5400
 tgggtgcctaa aaatgtctt cagtagcaag ctgattgcca ggggcaggcc cttggtgtaa 5460
 gtgtttacaa agcggttaag ctgggatggg tgcatacgtg gggatagag atgcatctt 5520
 gactgtattt ttaggttggc tatgttccca gccatatccc tccggggatt catgttgtgc 5580
 agaaccacca gcacagtgta tccggtgcac ttgggaaatt tgcctatgtag cttagaagga 5640

aatgctgga agaacttga gacgccctg tgacctcaa gattttccat gcattcgtcc 5700
ataatgatgg caatgggccc acgggcgggc gcctgggoga agatatttct gggatcacta 5760
acgtcatagt tgtgttccag gatgagatcg tcataggcca tttttacaaa gcgcggggcg 5820
agggtgccag actgcggtat aatggttcca tccggcccag gggcgtagtt accctcacag 5880
atgtgcattt cccacgcttt gagttcagat ggggggatca tgtctacctg cggggcgatg 5940
aagaaaacgg tttccggggg aggggggatc agctgggaag aaagcaggtt cctgagcagc 6000
tgcgacttac cgcacgcggt gggcccgtaa atcacaccta ttaccgggtg caactggtag 6060
ttaagagagc tgcagctgcc gtcatccctg agcagggggg ccacttcggt aagcatgtcc 6120
ctgactcgca tgttttccct gaccaaatec gccagaaggc gctcgcgcgc cagcgatagc 6180
agtctctgca aggaagcaaa gtttttcaac ggtttgagac cgtccgccgt aggcattgctt 6240
ttgagcggtt gaccaagcag ttccaggcgg tcccacagct cggtcacctg ctctacggca 6300
tctcgatcca gcataatctcc tegtctcgcg ggttggggcg gctttcgctg tacggcagta 6360
gtcgggtgctc gtccagacgg gccagggtca tgtctttcca cggggcgagg gtcctcgtca 6420
cgttagtctg cgcacgcggt aaggggtgcg tccgggctg cgcgctggcc aggggtcgtc 6480
tgaggctggt cctgctgggt ctgaagcgtg gccggtctc gccctgctcg tggccagggt 6540
agcatttgac catggtgtca tagtccagcc cctccgcgcc gtggcccttg gcgcgcagct 6600
tgcccttga ggaggcgccg cacgaggggc agtgcagact tttgagggcg tagagcttgg 6660
gcgcgagaaa taccgattcc ggggagtagg catccgcgcc gcaggccccg cagacggtct 6720
cgcatccac gagccagggt agctctggcc gttcggggtc aaaaaccagg tttccccat 6780
gctttttgat gcgtttctta cctctggttt ccagagccg gtgtccacgc tcggtgacga 6840
aaaaggctgc cgtgtccccg tatacagact tgagaggcct gtcctcgagc ggtgttccgc 6900
ggtcctctc gtatagaaac tccgaccact ctgagacaaa ggctcgcgtc caggccagca 6960
cgaaggaggc taagtgggag gggtagcggg cgttgtccac taggggggtc actcgtcca 7020
gggtgtgaag acacatgtcg ccctcttcgg catcaaggaa ggtgatgggt ttgtaggtgt 7080
aggccacgtg accgggtgtt cctgaagggg ggctataaaa ggggggtggg gcgcgttctg 7140
cctcactctc ttccgcatcg ctgbctgcga gggccagctg ttgggggtgag tactccctct 7200
gaaaagcggg ccatgactct cgcctaagat tgtaggttc caaaaacgag gaggatttga 7260
tattcacctg gcccgcggtg atgccttga ggggtggcgc atccatctgg tcagaaaaga 7320
caatctttt gttgtcaagc ttggtggcaa acgaccctga gaggggcgtg gacagcaact 7380
tggcgatgga gcgcagggtt tggttttgt cgcgatcggc gcgctcctt gcccgatgt 7440
ttagctgcac gtattcgcgc gcaacgcacc gccattcggg aaagacgggt gtgcgctcgt 7500
cgggcaccag gtgcacgcgc caaccgcggt tgtcagggg gacaaggtca acgctggtgg 7560
ctacctctc gcgtaggcgc tcgttggtc agcagagggc gcccccctt gcgcgagca 7620
atggcggtag ggggtctagc tgcgtctcgt cccgggggtc tgctccacg gtaaaagacc 7680
cgggcagcag gcgcgcgtcg aagtgtcta tcttgcattc ttgcaagtct agcgcctgct 7740
gccatgcgcg ggcggcaagc ggcgctcgt atgggtgag tgggggaccc catggcatgg 7800
ggtgggtgag cgcggaggcg tacatgccgc aaatgtcgt aacgtagagg ggtctctga 7860
gtattccaag atatgtaggg tagcatctc caccgcggat gctggcgcgc acgtaatcgt 7920
atagttcgtg cgagggagcg agaggtcgg gaccgaggtt gctacgggcg ggtgctctg 7980
ctcgggaagc tatctgcctg aagatggcat tgatatggt tgatatggtt ggcgctgga 8040
agacgttga gctggcgtct gtgagacct cccgctcacg cacgaaggag gcgtaggagt 8100
cgcgcagctt gttgaccagc tcggcgggta cctgcacgtc tagggcgag tagtccaggg 8160
ttccttgat gatgtcatac ttatcctgtc ccttttttt ccacagctcg cggttgagga 8220
caaactctc gcggtcttc cagtactctt ggtcggaaa cccgtcggcc tccgaacggt 8280
aagagcctag catgtagaac tggttgacgg cctgtaggc gcagcatecc ttttctacgg 8340
tagcgcgta tgcctgcgca gcctccgga aggtgagcga ggtgagcga cctgctccc 8400
tgaccatgac tttgaggtac tggatttga agtcaggtc gtcgcatccg cctgctccc 8460
agagcaaaaa gtccgtgcgc tttttggaac gcggtttgg cagggcgag gtgacatcgt 8520
tgaagagtat ctttccgcg cgaggcataa agttgcgtgt gatgcggaag ggtcccggca 8580
cctcggaaac gttgttaatt acctgggagg tccaagaagc cttgatggaa ggcaatttt 8700
tgtggcccac aatgtaaagt tcttcagggg agctgagccc gtgctctgaa agggcccagt 8760
taagtctctc aggtgtgagc tcttcagggg gcgacgaatg gctcaccag gtcacgggcc attagcatt 8820
ctgcaagatg agggttggaa gcaaaaggtc ctaaaactggc cttttttct ggggtgatgc 8880
gcaggtggtc aagcgggtct tgtcccagc ggtcccacc aaggttcgc gctaggctc 8940
agtagaaggt aagcgggtct cactagaggc tcatctccgc cgaacttcat gaccagcatg aagggcacga 9000
gcgaggcagt aaaggcccc atccaagtat aggtctctac atcgtagggt acaaagagac 9060
gctcgggtgc aggtagcgag ccgatcggga agaactggat ctcccgccac caattggag 9120
agtggctatt aagtgaagt cactgcgacg ccctgcgacg ggccgaacac tctgtctggc 9180
ttttgtaaaa acgtgcgcag tactggcagc ggtgcaagg gctgacatcc tgcacgaggt 9240
tgacctgacg accgcgcaca aggaagcaga gtgggaattt gagcccctcg cctggcgggt 9300
ttggctggtg gtcttctact tcggctgctt gtccttgacc gtctggctgc tcgaggggag 9360
ttacggtgga tcggaccacc acgcccgcgc agcccaaagt ccagatgtcc gcgcgcggcg 9420
gtcggagctt gatgacaaca tcgcgcagat gggagctgtc catggtctgg agctcccgcg 9480
gcgtcaggtc aggcgggagc tcctgcaggt ttacctcgca tagacgggtc agggcgcggg 9540

ctagatccag gtgataccta atttccaggg gctggttggt ggcggcgtcg atggccttga 9600
 agaggcgcga tccccgcggc gcgactacgg taccgcgcgg cgggcgggtg gccgcggggg 9660
 tgtccttggg tgatgcatct aaaagcggtg acgcgggcga gccccgggag gtaggggggg 9720
 ctccggaccc gccgggagag ggggcagggg cacgtcggcg ccgcgcgcgg gcaggagctg 9780
 gtgctgcgcg cgtaggttgc tggcgaacgc gacgacgcgg cggttgatct cctgaatctg 9840
 gcgcctctgc gtgaagacga cgggcccggt gagcttgagc ctgaaagaga gttcgacaga 9900
 atcaatttgc gtgtcgttga cggcggcctg gcgcaaaatc tcctgcacgt ctctgagtt 9960
 gtcttgatag gcgatctcgg ccatgaactg ctcgatctct tectctgga gatctcgcg 10020
 tccggctcgc tccacggtggt cggcggagtc gttggaaatg cgggccatga gctgcgagaa 10080
 ggcgttgagg cctccctcgt tccagacgcg gctgtagacc acgccccctt cggcatcgcg 10140
 ggcggcgcag accacctgcg cgagattgag ctccacgtgc cgggcgaaga cggcgtagtt 10200
 tcgcaggcgc tgaagaggt agtgagggt ggtggcggtg tgttctgcca cgaagaagta 10260
 cataaccag cgtcgcaacg tggattcgtt gatatcccc aaggcctcaa ggcgtccat 10320
 ggctcgtag aagtccacgg cgaagttaa aaactgggag ttgcgcgcgg acacggttaa 10380
 ctctctctcc agaagacgga tgagctcggc gacagtgctg cgcacctcgc gctcaaaggc 10440
 tacaggggcc tcttcttctt cttcaatctc ctcttccata agggcttccc cttcttcttc 10500
 ttctggcggc ggtgggggag gggggacacg gcggcgcaga cggcgcaccg ggaggcggtc 10560
 gacaaagcgc tcgatcatct ccccgcggcg acggcgcag gtctcgggtg cggcgcggcc 10620
 gttctcgcgg gggcgcagtt ggaagacgcc gcccgcatg tcccggttat gggttggcgg 10680
 ggggctgcca tgcggcaggg atacggcgct aacgatgcat ctcaacaatt gttgtgtagg 10740
 tactccgcgc ccgagggacc tgagcagatc cgcacgcacc ggatcggaaa acctctcgag 10800
 aaaggcgtct aaccagtcac agtcgcaagg taggtgagc accgtggcgg gcggcagcgg 10860
 gcggcggtcg gggttgttcc tggcggaggt gctcgtgat atgtaattaa agtagcggg 10920
 cttgagacgg cggatggtcg acagaagcac catgtccttg ggtccggcct gctgaatcgc 10980
 caggcggtcg gccatgcccc aggttcggt ttgacatcgg cgcaggtctt tgtagtagtc 11040
 ttgcatgagc ctttctaccg gcacttcttc ttctcttccc tcttgtctg catctcttgc 11100
 atctategct gcggcggcgg cggagtttgg ccgtaggtgg ccgctcttc ctcccatgcg 11160
 tgtgaccccc aagccccca tcggctgaag cagggctagg tggcgacaa cgcgctcggc 11220
 taatatggcc tgcgtcacct gcgtgaggg agactggaag tcatccatgt ccacaaagcg 11280
 gtggtatgca cccgttgtga tgggtgtaagt gcaagtggcc ataacggacc agtagcggg 11340
 ctggtgaccc ggctgcgaga gctcgggtga cctgagacgc gagtaagccc tcgagcaaaa 11400
 tacgtagtgc ttgcaagtcc gcaccaggta ctggtatccc accaaaaagt gcggcggcgg 11460
 ctggcggtag aggggccagc gtagggtggc cggggtccc ggggcgagat cttccaacat 11520
 aaggcagatg tatccgtaga tgtacctgga catccagggt atgcggcgg cgggtggtgga 11580
 ggcgcgcgga aagtgcgga cgcggtcca gatgttgcgc agcggcaaaa agtgctccat 11640
 ggtcgggacg atctggcgg ctaggcgcgc gcaatcgttg acgctctacc gtgcaaaagg 11700
 agaggatgca cgcggcact cttccgtggt ctggtggata aattcgcgaag ggtatctagg 11760
 cggacgaccc gggttcgagc cccgtatccc gccgtcccgc gtgatccatg cggttaccgc 11820
 ccgcgtgtcg aaccaggtg tgcgacgtca gacaacgggg gagtgtcctc tttggcttcc 11880
 ttccaggcgc ggcggtgct gcgctagctt ttttggccac tggccgcgcg cagcgtaaagc 11940
 ggttaggctg gaaagcgaaa gcattaaagt gctcgtccc gctcgtccc cggcgggac tggggcgaa 12000
 ccaagggttg agtcgcgga cccccggtt gagtctcggg cggctgcaaa ttctccgga aacaggagc 12120
 gggggtttgc ctccccgtca cagatgcac cgggtgcgc gcagatgcgc ccccctctc 12180
 agcagcggca agagcaagag cagcggcaga catgcagggc accctcccct cctcctaccg 12240
 cgtcaggagg ggcgacatcc gcggttgacg cggcagcaga tgggtgattac gaacccccgc 12300
 ggcgcggggc ccggcactac ctggacttgg aggagggcga gggcctggcg cggctaggag 12360
 cgccctctcc tgagcggtac ccaaggggtg agctgaagcg tgatacgcgt gaggcgtacg 12420
 tgccgcggca gaacctggt cgcgaccgcg agggagagga gcccgaggag atgcgggatc 12480
 gaaagttcca cgcagggcgc gagctgcggc atggcctgaa tcgcgagcgg ttgctgcgcg 12540
 aggaggactt tgagcccgc tacgagcaga ggttagtcc cgcgcgcgca cacgtggcgg 12600
 ccgccacct ggtaacccca cgggtaacca ggagattaac tttcaaaaaa 12660
 gctttaacaa ccacgtgct acgcttgtgg cgcgcgagga ggtggctata ggactgatgc 12720
 atctgtggga ctttgaagc gcgctggagc aaaacccaaa tagcaagccg ctcatggcg 12780
 agctgttctc tatagtgcag cacagcaggg acacagaggc attcagggat gcgctgctaa 12840
 acatagtaga gcccgagggc cgctggctgc tcgatttgat aaacatcctg cagagcatag 12900
 ttggtcagga gcgcagctg agcctggctg acaaggtggc cgcctcaac tattccatgc 12960
 ttgacctggg caagttttac gcccgaaga tataccatc cccttacgtt cccatagaca 13020
 aggaggtaaa gatcgagggg ttctacatgc gcatggcgtc gaaggtgctt acctgagcg 13080
 acgacctggg cgtttatcgc aacgagcgc ctccacaaggc cgtgagcgtg agccggcggc 13140
 gcgagctcag cgaccgcgag ctgatgcaca gcctgcaaaag ggcctggtt ggcaacgggca 13200
 gcggcagatg agaggccgag tcctactttg acgcgggcgc tgacctgcgc tgggccccaa 13260
 gccgacgcgc cctggaggca gctggggccg gacctgggct ggcgggtggc cccgcgcgcg 13320
 ctggcaacgt cggcggcgtg gaggaatatg acgaggacga tgagtacgag ccagaggacg 13380
 gcgagtacta agcggtagtg tttctgatca gatgatgcaa gacgcaacgg acccggcggg 13440

gcgggcgcg ctgcagagcc agccgtccgg ccttaactcc acggacgact ggccgaggt 13500
 catggaccgc atcatgtcgc tgactgcgcg caatcctgac gcgttccggc agcagccgca 13560
 ggccaaccgg ctctccgcaa ttctggaagc ggtggtcccg gcgcgcgcaa accccacgca 13620
 cgagaaggtg ctggcgatcg taaacgcgct ggccgaaaac agggccatcc ggcccagcga 13680
 ggccggcctg gtctacgacg cgtgcttca gcgctggct cgttacaaca gcggcaactg 13740
 gcagaccaac ctggaccggc tgggtgggga tgtgcgcgag gccgtggcgc agcgtgagcg 13800
 cgcgagcag cagggcaacc tgggtccat ggttgacta aacgccttcc tgagtacaca 13860
 gcccgcaac gtgcccggg gacaggagga ctacaccaac tttgtgagcg cactgccgt 13920
 aatggtgact gagacaccgc aaagtgaggt gtaccagtct gggccagact atttttcca 13980
 gaccagtaga caaggcctgc agaccgtaa cctgagccag gctttcaaaa acttgcaggg 14040
 gctgtggggg gtgcccggctc ccacaggcga ccgcgcgacc gtgtctagct tgctgacgcc 14100
 caactcgcgc ctggtgctgc tgctaatagc gcccttcacg gacagtggca gcgtgtcccg 14160
 ggacacatac ctaggctcact tgctgacact gtaccgagag gccataggtc aggcgatgt 14220
 ggacgagcat actttccagg agattacaag tgtcagccgc gcgtggggc aggaggaca 14280
 gggcagcccg gagcaacc taaactacct cgtaccaaac cggcgcgaga agatccctc 14340
 gttgcacagt ttaacacgcg aggaggagcg cattttgcg ctacgtgagc agagcgtgag 14400
 ccttaacctg atgcccagc gggtaaccgc cagcgtggcg ctggacatga ccgcgcgcaa 14460
 catggaaccg ggcattgatg cctcaaaccg gccgtttatc aaccgcctaa tggactactt 14520
 gcatcgcgcg gccgcccgtg accccagatg tttaccaaat gccatcttga acccgactg 14580
 gctaccgccc cctggtttct acaccggggg attcgaggtg cccgagggta acgatggatt 14640
 cctctgggag gacatagac agcgcgtgtt tccccgcaa ccgcagacc tgctagagt 14700
 gcaacagcgc gagcagcag cggcgcgct gcgaaaggaa agcttccgca ggccaagcag 14760
 cttgtccgat ctaggcgcct cggccccgcg gtcagatgct agtagccat ttccaagctt 14820
 gatagggtct cttaccagca ctgcaccac ccgcccgcg ctgctgggcg aggaggagta 14880
 cctaacaac tcgctgctgc agccgcagcg cgaaaaaac ctgcctccgg catttcccaa 14940
 caacgggata gagagcctag tggacaagat gactagatgg aagacgtacg cgcaggagca 15000
 cagggacgtg ccaggcccgc gccgcccac ccgtcgtcaa aggcacgacc gtcagcgggg 15060
 tctggtgtgg gagcagatg actcggcag cgacagcagc gtcctggatt tgggagggag 15120
 tggcaaccgg tttgcgcacc ttcgccccag gctggggaga atgttttaa aaaaaaaag 15180
 catgatgcaa aataaaaaac tcaccaaggc catggcaccg agcgttgggt ttcttgtatt 15240
 ccccttagta tggggcgcg ggcgatgat gaggaaggtc ctctccctc ctacgagagt 15300
 gtggtgagcg cggcgccagt ggcggcggcg ctgggtctc ccttcgatgc tcccctggac 15360
 ccgcccgttg tgccctccggt tacctgccc cctaccgggg ggagaaacag catccgttac 15420
 tctgagttgg cccccatt cgacaccacc cgtgtgtacc tgggtggaaa caagtcaac 15480
 gatgtggcat cccctgaact ccagaacgac cacagcaact tctgaccac ggtcattca 15540
 aacaatgact acagcccgg ggaggcaagc acacagacca tcaatcttga cgaccggtcg 15600
 cactggggcg gcgacctgaa aaccatcctg cataccaaca tgccaaatgt gaacgagttc 15660
 atgtttacca ataagtttaa ggcgcgggtg atggtgtcgc gcttgccctac taaggacaat 15720
 caggtggagc tgaaatacga gtgggtggag ttcacgctgc ccgagggcaa ctactccgag 15780
 accatgacca tagacctat gaacaacgcg atcgtggagc actacttgaa agtgggcaga 15840
 cagaacgggg ttctggaaag cgacatcggg gtaaaagttg acaccgcaa cttcagactg 15900
 gggtttgacc ccgtcactgg tcttgtcat cctggggtat atacaaacga agccttcaa 15960
 ccagacatca ttttgcgccc aggatgcggg gtggacttca ccacagccg cctgagcaac 16020
 ttgttgggca tccgcaagcg gcaaccctc caggagggct ttaggatcac ctacgatgat 16080
 ctggagggtg gtaacattcc cgcactgtg gatgtggagc cctaccaggc gagcttгаа 16140
 gatgacaccg aacagggcgg ggggtggcga ggcggcagca acagcagtg cagcggcgcg 16200
 gaagagaact ccaacgcggc agccgcggca atgcagccgg tggaggacat gaacgatcat 16260
 gccattcgcg gcgacacctt tgccacaggg gctgaggaga agcgcgctga ggccgaagca 16320
 gcggccgaag ctgcgcctcc cgtgcgcgaa cccgaggtcg agaagcctca gaagaaaccg 16380
 gtgatcaaac ccctgacaga ggacagcaag aaacgcagtt acaacctaat aagcaatgac 16440
 agcaccttca ccagtagccg cagctggtac cttgcataca actacggcga ccctcagacc 16500
 ggaatccgct catggacctt gctttgcaact cctgacgtaa cctgcggctc ggagcaggtc 16560
 tactggtcgt tgccagacat gatgcaagac cccgtgacct tccgctccac gcgccagatc 16620
 agcaactttc cgggtggtggg cgcgcgagct ttgcccgtgc actccaagag cttctacaac 16680
 gaccaaggcg gttactccca actcatccgc cagttaacct ctctgacca cgtgttcaa 16740
 cgctttcccg agaaccagat tttggcgcgc ccgctagccc ccaccatcac caccgtcagt 16800
 gaaaacgttc ctgctctcac agatcacggg acgctaccgc tgcgcaacag catcggagga 16860
 gtccagcgag tgaccattac tgacgccaga cgccgcaact gccctacgt ttacaaggcc 16920
 ctgggcatag tctcgccgcg cgtcctatcg agccgcactt tttgagcaag catgtccatc 16980
 ctatatcgc ccagcaataa cacaggctgg ggctgcgct tcccaagcaa gatgtttggc 17040
 ggggcaaga agcgtccga ccaacacca gtgcgcgctg gcgggcaacta ccgcccgcce 17100
 tggggcgcg acaaacgcgg ccagcactgg gcgaccacgc tcgatgacgc cctcagcgcg 17160
 gtggtggagg aggcgcgcaa ctacagccc acgcccacc cagtgtccac agtggacgcg 17220
 gccattcaga ccgtggtgcg cggagcccgg cgctatgcta aaatgaagag acggcgagg 17280
 cgctagcac gtgcaccgg ccgcccagcc ggcactgccc cccaacgcgc ggccggcgcc 17340

ctgcttaacc	gcgcacgtcg	caccggccga	cgggcgccca	tgcgggcccg	tcgaaggctg	17400
gcccgggta	ttgtcaactg	gccccccagg	tccaggcgac	gagcggcccg	cgcagcagcc	17460
gcccgcatta	gtgctatgac	tcaagggtcgc	aggggcaacg	tgtattgggt	gcgcgactcg	17520
gtagcggcc	tgcgcgtgcc	cgtgcgccacc	cgccccccgc	gcaactagat	tgcaagaaaa	17580
aactacttag	actcgtactg	ttgtatgtat	ccagcggcgg	cggcgcgcaa	cgaagctatg	17640
tccaagcgca	aaatcaaaga	agagatgctc	caggtcatcg	cgccggagat	ctatggcccc	17700
ccgaagaagg	aagagcagga	ttacaagccc	cgaagctaa	agcgggtcaa	aaagaaaaag	17760
aaagatgatg	atgatgaact	tgacgacgag	gtggaactgc	tgacgctac	cgcgccaggg	17820
cgacgggtac	agtggaaagg	tcgacgcgta	aaacgtgttt	tgcgaccggg	caccaccgta	17880
gtctttacgc	ccggtgagcg	ctccaccgcg	acctacaagc	gcgtgtatga	tgaggtgtac	17940
ggcgacgagg	acctgcttga	gcaggccaac	gagcgcctcg	gggagtttgc	ctacggaaaag	18000
cggcataaagg	acatgctggc	ggtgccgctg	gacgagggca	acccaacacc	tagcctaaag	18060
cccgtaacac	tgcagcaggt	gctgcccgcg	cttgaccctg	ccgaagaaaa	gcgcgcccta	18120
aagcgcgagt	ctggtgactt	ggcaccacc	gtgcagctga	tggtacccaa	gcccagcga	18180
ctggaagatg	tcttgaaaa	aatgaccctg	gaacctgggc	tgagcccga	ggtccgctg	18240
cgccaatca	agcaggtggc	gcccggatcg	ggcgtgcaga	ccgtggacgt	tcagatacc	18300
actaccagta	gcaccagtat	tgccaccgcc	acagagggca	tggagacaca	aacgtccccg	18360
gttgcctcag	cggtggcggg	tgccgcgggtg	caggcggctg	ctgcccggcg	gtccaagacc	18420
tctacggagg	tgcaaacgga	cccgtggatg	tttcgcgttt	cagccccccg	gcccgcgcg	18480
ggttcgagga	agtacggcgc	cgccagcgcg	ctactgcccg	aatatgccc	acatcctcc	18540
attgcgccta	cccccgcta	tcgtggctac	acctaccgcc	ccagaagacg	agcaactacc	18600
cgacgccgaa	ccaccactgg	aaccgcgcg	cgccgtcgcc	gtcgccagcc	cgtgctggcc	18660
ccgatttccg	tcgcaggggt	ggctcgcgaa	ggagcgagga	ccctgggtgct	ccaacagcg	18720
cgctaccacc	ccagcatcgt	ttaaagccg	gtctttgtgg	ttcttgacga	tatggccctc	18780
acctgccgcc	tccgtttccc	ggtgccggga	ttccgaggaa	gaatgcaccg	taggaggggc	18840
atggccggcc	acggcctgac	ggcggcatg	cgtcgtgcgc	accaccggcg	gcccgcgcg	18900
tcgaccctc	gcatgcgcgg	cggtatcctg	cccctcctta	ttccactgat	cgccgcggcg	18960
attggcgcg	tgcccggaat	tgcatccgtg	gccttgacag	cgacagacac	ctgattaaaa	19020
acaagtgtca	tgtggaaaa	tcaaaataaa	aagtctggac	tctcacgctc	gcttggctcc	19080
gtaactattt	tgtagaatgg	aagacatcaa	ctttgcgtct	ctggccccgc	gacacggctc	19140
gcgcccgctc	atgggaaact	ggcaagatat	cggcaccagc	aatatgagcg	gtggcgccct	19200
cagctggggc	tcgctgtgga	gcggcattaa	aaatttcggt	tccaccgtta	agaactatgg	19260
cagcaaggcc	tggaacagca	gcacaggcca	gatgctgagg	gataagttga	aagagcaaaa	19320
tttccaacaa	aaggtggtag	atggcctggc	ctctggcatt	agcggggtgg	tggacctggc	19380
caaccaggca	gtgcaaaata	agattaacag	taagcttgat	ccccgcctc	ccgtagagga	19440
gectccaccg	gccgtggaga	cagtgtctcc	agagggggcgt	ggcgaaaagc	gtccgcgccc	19500
cgacagggaa	gaaactctgg	tgacgcaact	agacggacct	ccctcgtacg	aggaggcact	19560
aaagcaaggc	ctgcccacca	cccgtcccat	cgcgcccctg	gctaccggag	tgctgggcca	19620
gcacacacc	gtaacgctgg	acctgcctcc	ccccgcgcg	accagcaga	aacctgtgct	19680
gccaggccc	accgcctgtg	ttgtaaccgc	tcctagccgc	gcgtccctgc	gcccgcgccc	19740
cagcggctcc	cgatcgttgc	ggcccgtagc	cagtggcaac	tggcaagca	cactgaacag	19800
catcgtgggt	ctgggggtgc	aatccctgaa	gcgcgcgacga	tgcttctgaa	tagctaactg	19860
gtcgtatgtg	tgtcatgtat	gcgtccatgt	cgccgcccaga	ggagctgctg	agccgcgcg	19920
cgcccgcctt	ccaagatggc	tacccttcg	atgctgcgc	agtggcttta	catgcacatc	19980
tcgggcccagg	tcagctcgga	gtacctgagc	accgggctgg	tgacgttgc	ccgcgccacc	20040
gagacgtact	tcagcctgaa	taacaagttt	agaaaccca	cggtggcgcc	tacgcacgac	20100
gtgaccacag	accggtccca	gcgtttgacg	ctgcggttca	tcctgtgga	ccgtgaggat	20160
actgcgtact	cgtacaaggc	gcgggtccacc	ctagctgtgg	gtgataaccg	tgtgctggac	20220
atggcttcca	cgtactttga	catccgcggc	gtgctggaca	ggggccctac	ttttaagccc	20280
tactctggca	ctgcctaca	cgccctggct	cccagggttg	ccccaatcc	ttgcgaatgg	20340
gatgaagctg	ctactgctct	tgaataaac	ctagaagaag	aggacgatga	caacgaagac	20400
gaagtacag	agcaagctga	gcagcaaaaa	actcacgtat	ttgggcaggc	gccttattct	20460
ggtataaata	ttacaagga	gggtattcaa	ataggtgtcg	aaggtcaaac	acctaaatat	20520
gccgataaaa	catttcaacc	tgaacctcaa	ataggagaat	ctcagtggtg	cgaaactgaa	20580
attaatcatg	cagctgggag	agtccttaaa	aagactacce	caatgaaacc	atggtacggt	20640
tcatatgcaa	aaccacaaa	tgaaaatgga	gggcaaggca	ttcttgtaaa	gcaacaaaat	20700
ggaaagctag	aaagtcaagt	ggaaatgcaa	ttttctcaa	ctactgaggc	gaccgcagcc	20760
aatggtgata	acttgactcc	taaagtggtg	ttgtactag	aagatgtaga	tatagaaac	20820
ccagcactc	atatttctta	catgcccact	attaaggaag	gtaactcacg	agaactaatg	20880
ggccaacaat	ctatgccc	caggccta	tacattgctt	ttagggacaa	ttttattggt	20940
ctaattgatt	acaacagcac	gggtaatatg	ggtgttctgg	cgggccaagc	atcgcagttg	21000
aatgctggtg	tagatttgca	agacagaaac	acagagcttt	cataccagct	tttgcttgat	21060
tccattgggtg	atagaaccag	gtacttttct	atgtggaatc	aggctgttga	cagctatgat	21120
ccagatgta	gaattattga	aaatcatgga	actgaagatg	aacttccaaa	ttactgcttt	21180
ccactgggag	gtgtgattaa	tacagagact	cttaccgaag	taaacctaa	aacaggtcag	21240

gaaaatggat gggaaaaaga tgctacagaa ttttcagata aaaatgaaat aagagttgga 21300
aataattttg ccatggaaat caatctaaat gccaacctgt ggagaaattt cctgtactcc 21360
aacatagcgc tgtatttgcc cgacaagcta aagtacagtc cttccaacgt aaaaatttct 21420
gataacccaa acacctacga ctacatgaac aagcgagtg tggctcccgg gttagtggaac 21480
tgctacatta accttgagc acgctggtcc cttgactata tggacaacgt caaccattt 21540
aaccaccacc gcaatgctgg cctgcgctac cgctcaatgt tgctgggcaa tggctcgctat 21600
gtgcccttcc acatccaggt gcctcagaag ttctttgcca ttaaaaacct cettctcctg 21660
ccgggtcat acacctacga gtggaacttc aggaaggatg ttaacatggt tetgcagagc 21720
tccctaggaa atgacctaa ggttgacgga gccagcatta agtttgatag cattgcctt 21780
tacgccacct tcttcccat ggcccacaac accgcctcca cgcttgaggc catgcttaga 21840
aacgacacca acgaccagtc cttaacgac tatctctccg ccgccaacat gctctaccct 21900
atacccgcca acgctaccaa cgtgccata tccatccct cccgcaactg ggcggtttc 21960
cgcggctggg ccttcacgcg ccttaagact aaggaaacce catcactggg etcgggctac 22020
gacccttatt acacctactc tggctctata ccctacctag atggaacctt ttacctcaac 22080
cacaccttta agaaggtggc cattaccttt gactctctg tcagctggcc tggcaatgac 22140
cgcctgctta cccccacga gtttgaatt aagcctcag ttgacgggga gggttacaac 22200
gttgccaggt gtaactgac caaagactgg tcctggtac aaatgctagc taactacaac 22260
attggctacc agggcttcta tatcccagag agctacaagg accgcatgta ctcttcttt 22320
agaaacttcc agcccatgag ccgtcaggtg gtggatgata ctaaatacaa ggactacaa 22380
caggtgggca tccctacacca acacaacaac tctggatttg ttggtacct tgccccacc 22440
atgcgcgaag gacaggccta ccctgtaac ttcccctatc cgcttatagg caagaccgca 22500
gttgacagca ttaccagaa aaagtttctt tgcgatgca ccttttggcg catccattc 22560
tccagtaact ttatgctcat gggcgactc acagacctgg gccaaaacct tctctagcc 22620
aactccgccc acgctgtaga catgactttt gaggtggatc ccatggacga gccaccctt 22680
ctttatgttt tgtttgaagt ctttgactg gtccgtgtgc accggccgca ccgcggtc 22740
atcgaaccg tgtacctgcg cacgccctc tcggccggca acgccacaac ataaagaagc 22800
aagcaacatc aacaacagct gccgccatgg gctccagtga gcaggaactg aaagccattg 22860
tcaaagatct tggttgtggg ccatatttt tgggcaccta tgacaagcgc tttccagget 22920
ttgtttctcc acacaagctc gcctgcgcca tagtcaatac ggccggctgc gagactggg 22980
gcgtacactg gatggcctt ccttggactc cgcactcaa aacatgctac ctctttgagc 23040
cctttggctt ttctgaccag cgactcaagc aggtttacca gtttgagtac gactactcc 23100
tgccgctag cgcattgct tcttccccg accgctgtat aacgctggaa aagtcaccc 23160
aaagcgtaca ggggcccaac tcggccgct gtggactatt ctgctgcatg tttctccag 23220
cctttgccaa ctggccccaa actcccaggt atcacaacce caccatgaac cttattaccg 23280
gggtacccaa ctccatgctc aacagtcccc aggtacagcc caccctgctc cgcaaccagg 23340
aacagctcta cagcttctg gagcgcact cgcctactt cgcagccac agtgcgaga 23400
ttaggagcgc cacttcttt tgtcacttga aaaacatgta aaaataatgt actagacaa 23460
ctttcaataa aggcaaatgc ttttatttgt acactctcgg gtgattattt acccccacc 23520
ttgccgtctg cgcgctttaa aaatcaaagg ggttctgccc cgcctcgeta tgcgccactg 23580
gcagggacac gttgagatac tgggtgttag tgctccactt aaactcaggc acaaccatcc 23640
gcggcagctc ggtgaagttt tcaactcaca ggctgcgca catcaccaac gcgttagca 23700
ggtcgggccc cgatecttg aagtcgcat tgggacctc gccctgcgcg cgcgagttgc 23760
gatccacagg gttgacgac tggaaacta tcagcgcgg gtgggtgcag ctggcagca 23820
cgctcttctc ggagatcaga tccgctcca ggtcctccc gttgctcagg gcgaaccagg 23880
tcaactttgg tagctgcctt cccaaaagg gcgctgccc aggtttgag ttgactcgc 23940
accgtagtgg catcaaaagg tgaccgtgcc cggctggggc gttaggatac agcgcctgca 24000
taaaagcctt gatctgctta aaagccacct gagcctttgc gcctcagag aagaacatgc 24060
cgcaagactt gccggaaaac tgattggccg gacagccgc gtcgtgcagc cagcaccttg 24120
cgtcgggtgt ggagatctgc accacatttc ggccccacc gttcttcacg atctggcct 24180
tgctagactg ctcttcagc gcgctctcc cgttttctg etccacatcc atttcaatca 24240
cgtgctcctt atttatcata atgcttccgt gtagacactt aagctcgcct tcgatctcag 24300
cgcagcggtg cagccacaac gcgagcccg tgggctcgtg atgctttag gtcacctctg 24360
caaacgactg caggtacgcc tgcaggaatc gccccatcat cgtcacaag gtcttgttc 24420
tggtagaggt cagctgcaac ccgctgctc cctcgttcag ccaggtcttg catacggccg 24480
ccagagcttc cacttggctc ggagtagtt tgaagttgc ctttagatcg ttatccactg 24540
ggtacttctc catcagcgc cgcgagctt ccatgccct ctcccagca gacacatcg 24600
gcacactcag cgggttctc accgtaattt cactttccgc ttegetggg tctctctct 24660
cctcttgcgt ccgcatacca cgcgccactg ggtcgtctc attcagccgc cgcactgtgc 24720
gcttacctcc tttgccatgc ttgattagca ccgggtgggt gctgaaacce accatttga 24780
gcgccacatc ttctcttct tctcgtctgt ccaagattac ctctggtgat ggcgggcgt 24840
cgggcttggg agaagggcgc tctttttct tcttgggccc aatggccaaa tccgcccgg 24900
aggtcagatg ccgcccgtg ggtgtgcgct gcaccagcgc gcttttgg gtcttctct 24960
cgtcctcggg ctcgatacgc cgcctcatcc gctttttgg gggcgcccgg ggagctcctg 25020
gcgacgggga cggggacgac acgtctcca tgggtggggg acgtcgcgcc gcaccgctc 25080
cgcgctcggg ggtggtttcg cgtgctcct cttcccagct ggccatttcc ttctctata 25140

ggcagaaaa gatcatggag tcagtcgaga agaaggacag cctaaccgcc ccctctgagt 25200
 tegccaccac cgctccaacc gatgcccga acgcgcctac cacettcccc gtcgaggcac 25260
 ccccgcttga ggaggaggaa gtgattatcg agcaggaccc aggttttgta agcgaagacg 25320
 acgaggaccg ctcagtagca acagaggata aaaagcaaga ccaggacaac gcagaggcaa 25380
 acgaggaaca agtcgggcyg ggggacgaaa ggcattggca ctacctagat gtgggagacg 25440
 acgtgctgtt gaagcatctg cagcgcagat gcgccattat ctgagcagcg ttgcaagagc 25500
 gcagcgtgtt gcccccgcc atagcggatg tcagccttgc ctacgaacgc cacctattct 25560
 caccgcgcgt acccccaaa cgccaagaaa acggcacatg cgagcccaac ccgcgcctca 25620
 actttaccce cgtatttgcc gtgccagagg tgcttgccac ctatcacatc tttttcaaa 25680
 actgcaagat acccctatcc tgccgtgcca accgcagccg agcggacaag cagctggcct 25740
 tgccgagggg cgctgtcata cctgatatcg cctcgctcaa cgaagtgcca aaaatctttg 25800
 agggctcttg acgcgacgag aagcgcgcgg caaacgctct gcaacaggaa aacagcгаа 25860
 atgaaagtca ctctggagtg ttggtggaac tcgagggtga caacgcgcgc ctagccgtac 25920
 taaaacgcag catcaggtc acccactttg cctaccggc acttaaccta ccccccaagg 25980
 tcatgagcac agtcatgagt gagctgatcg tgcgccttgc gcagccctg gagagggatg 26040
 caaatttgca agaacaaca gaggaggcc taccgcagt tggcgacgag cagctagcg 26100
 gctggcttca accgcgcgag cctgccgact tggaggagcg acgcaaaacta atgatggccg 26160
 cagtgtctcg taccgtggag cttgagtgca tgcagcgggt ctttgctgac ccggagatgc 26220
 agcgcaagct agaggaaaca ttgcaactaca cctttcgaca gggctacgta cgccaggcct 26280
 gcaagatctc caactggag ctctgcaacc tggctccta ccttggatt ttgcaagaaa 26340
 accgccttg gcaaacgtg cttcattcca cgctcaagg cgaggcgcgc cgcgactacg 26400
 tccgcgactg cgtttactta tttctatgct acacctggca gagggccatg ggcgtttgga 26460
 agcagtgctt ggaggagtgc aacctcaagg acctgcagaa actgctaaag caaaacttga 26520
 aggacctatg gcagccttc aacgagcgt ccgtggccgc gcacctggcg gacatcattt 26580
 tccccgaacg cctgcttaa accctgcaac agggctctgcc agacttcacc agtcaaagca 26640
 tgttgcaaaa ctttaggaac tttatcctag agcgtcagg aatcttgccc gccacctgct 26700
 gtgcaactcc tagcacttt gtgcccatta agtaccgca atgcccctcg ccctctgac 26820
 gccactgcta cctctgcag ctgagcaact accttgctca caacctatgc accccgcaac 26880
 acgtgagcgg tgacggtcta cagctgctta acgaaagtca aattatcggt accttgagc 26940
 tgcagggtcc ctgcctgac gaaaagtcc cggtccggg gttgaaactc actccggggc 27000
 tgtggacgct ggcttacctt cgcaaatttg tacctgagga ctaccacgcc cacgagatta 27060
 ggttctacga agaccaatcc cgcccgcaca atgcccagct taccgcctgc gtcattacce 27120
 agggccacat tcttggccaa ttgcaagcca tcaacaaagc ccgccaagag tttctgctac 27180
 gaaagggacg gggggtttac ttggaccccc agtccggcga ggagctcaac ccaatcccc 27240
 cgccgcgcga gcctatcag cagcagccgc gggcccttgc ttcccaggat ggcacccaa 27300
 aagaagctgc agctgccgc gccacccacg gacgaggagg aatactggga cagtcaagca 27360
 gaggagggtt tggacgagga ggaggaggac atgatggaag actgggagag cctagacgag 27420
 gaagcttccg aggtcgaaga ggtgtcagac gaaacaccgt caccctcggt cgcattcccc 27480
 tcgcccgcgc cccagaatc ggcaaccggt tccagcatgg ctacaacctc cgctcctcag 27540
 gcgcccgcgg cactgccgt tcgcccagcc aaccgtagat gggacaccac tggaaaccagg 27600
 gccggttaagt ccaagcagcc gccgcggtta gcccagagc aacaacagcg ccaaggctac 27660
 cgtcatggc gcgggcaca gaacgccta gttgcttgc tgcaagactc tgggggcaac 27720
 atctccttcg ccggcgcctt tcttctctac catcagggcg tggcctccc ccgtaaacatc 27780
 ctgcattact accgtcatct ctacagcca tactgcaccg gcggcagcgg cagcggcagc 27840
 aacagcagcg gccacacaga agcaagggcg accggatagc aagactctga caaagccca 27900
 gaaatccaca gcggcgcag cagcagggag aggagcgtg cgtctggcgc ccaacgaacc 27960
 cgtatcgacc cgcgagctta gaaacaggat ttttccact ctgtatgcta tatttcaaca 28020
 gagcaggggc caagaacaag agctgaaaat aaaaaacagg tctctgcgat ccctcaccgc 28080
 cagctgcctg tatcacaaaa gcgaagatca gcttcggcgc acgctggaag acgcggaggc 28140
 tctcttcagt aaatactgcg cgctgactct taaggactag tttcgcgcc tttctcaaat 28200
 ttaagcgcga aaactacgtc atctccagcg gccacaccgc gcgccagcac ctgtcgtcag 28260
 cgccattatg agcaaggaaa tcccacgcc ctacatgtgg agttaccagc cacaatggg 28320
 acttgcggt ggagctgcc aagactactc aaccgaata aactacatga gcgcgggacc 28380
 ccacatgata tcccgggtca acggaatccg cgcccaccga aaccgaattc tcttggaaac 28440
 ggcggtactt accaccacac ctcgtaatac ctttaactcc cgtagtggc ccgctgccct 28500
 ggtgtaccag gaaagtccc cctcccaccac tttggtactt ccagagacg cccagggcga 28560
 agttcagatg actaactcag gggcgcagct tgcggggcgc tttcgtcaca ggggtcggtc 28620
 gcccgggcag ggtataactc acctgacaat cagagggcga ggtattcagc tcaacgacga 28680
 gtcggtgagc tcctcgttg gtctccgtcc ggacgggaca tttcagatcg gcggcggcg 28740
 ccgtccttca ttcagcctc gtcaggcaat cctaactctg cagacctcgt cctctgagcc 28800
 gcgctctgga ggcattggaa ctctgcaatt tattgaggag tttgtgcat cggctcactt 28860
 taacccttc tcgggacct ccggccacta tccggtcaa tttattccta actttgacgc 28920
 ggtaaaggac tcggcggacg gctcaactg aatgttaagt ggagaggcag agcaactgcg 28980
 cctgaaacac ctggtccact gtcgcccga caagtgttt gccgcgact ccggtgagt 29040

ttgctacttt gaattgccc aggatcatat cgagggcccc ggcgacggcg tccggcttac 29100
 cgcccagggg gagcttgccc gtagcctgat teggagttt acccagcgcc ccctgctagt 29160
 tgagcgggac aggggaccct gtgttctcac tgtgatttgc aactgtccta accttgatt 29220
 acatcaagat cctctagtta taactagagt acccgggat cttattccct ttaactaata 29280
 aaaaaaata ataaagcatc acttacttaa aatcagttag caaatttctg tccagtttat 29340
 tcagcagcac ctcttgccc tcctcccagc tctggattg cagcttccct ctggctgcaa 29400
 actttctcca caatetaaat ggaatgtcag ttctctcctg ttctgtcca tccgcacca 29460
 ctatcttcat gttgtgag atgaagcgcg caagaccgct tgaagatacc tcaaccccg 29520
 tgtatccata tgacacggaa accggtctc caactgtgcc ttttcttact cctcccttg 29580
 tatcccccaa tgggttcaa gagagtcccc ctggggtact ctcttgccg ctatccgaac 29640
 ctctagttac ctccaatggc atgcttgccg tcaaatggg caacggcctc tctctggagc 29700
 aggcgggcaa ccttacctcc caaatgtaa ccactgtgag cccacctctc aaaaaacca 29760
 agtcaaacat aaacctggaa atatctgac ccctcacagt tacctcagaa gccctaactg 29820
 tggctgcccg cgcacctcta atggtcggg gcaacacact caccatgcaa tcacaggccc 29880
 cgctaacctg gcacgactcc aaacttagca ttgccacca aggaccctc acagtgtcag 29940
 aaggaaagct agccctgcaa acatcaggcc cctcaccac caccgatagc agtacctta 30000
 ctatcactgc ctaccccc ctactactg ccactggtag cttgggcatt gacttgaaag 30060
 agcccattta tacacaaat ggaaaactag gactaaagta cggggctcct ttgcatgtaa 30120
 cagacgacct aaacacttg accgtagcaa ctgggtccagg tgtgactatt aataacttt 30180
 ccttgcaaac taaagtact ggagccttg gttttgattc acaaggcaat atgcaactta 30240
 atctagcagg aggactaagg attgattctc aaaacagacg ccttatactt gatgttagtt 30300
 atccgtttga tgctcaaac caactaatc taagactagg acagggccct cttttataa 30360
 actcagccca caactggat attaactaca acaaaggcct ttacttgttt acagttcaa 30420
 acaattccaa aaagcttgag gttaacctaa gcaactgcaa ggggttgatg ttgacgcta 30480
 cagccatagc cattaatgca ggagatggg ttgaatttgg ttcacctaata gcaccaaaca 30540
 caaatcccc caaaaacaaa attggccatg gectagaatt tgattcaaac aaggctatgg 30600
 ttctaaact aggaactggc cttagttttg acagcacagg tgccattaca gtaggaaaca 30660
 aaaataatga taagctaac ttgtggacca caccagctcc atctcctaac tgtagactaa 30720
 atgcagagaa agatgctaaa ctcactttgg tcttaacaaa atgtggcagt caaatactt 30780
 ctacagtttc agttttggct gttaaaggca gtttgctcc aatatctgga acagttcaa 30840
 gtgctcatct tattataaga ttgacgaaa atggagtgt actaaacaat tcttctctgg 30900
 acccagaata ttggaacttt agaaatggag atcttactga aggcacagcc tatacaaac 30960
 ctgttgatt tatgcctaac ctatcagctt atccaaaac tcacggtaaa actgcaaaa 31020
 ttaacattgt cagtcaggtt tacttaaac gagacaaaac taaacctgta acactaaca 31080
 ttacactaaa cgttacacag gaaacaggag acacaactcc aagtgcatac tctatgtcat 31140
 tttcatggga ctggtctggc cacaactaca ttaatgaaat atttgccaca tctcttaca 31200
 cttttcata cattgccc aaataaagaa tcgtttgtgt tatgtttcaa cgtgtttatt 31260
 tttcaattgc agaaaatttc aagtcatttt tcatcagta gtatagcccc accaccacat 31320
 agcttataca gatcaccgta ccttaatcaa actcacagaa ccctagtatt caacctgcca 31380
 cctccctccc aacacacaga gtacacagtc ctttctcccc ggctggcctt aaaaagcatc 31440
 atattctggg atcagacat attcttaggt gttatatccc acacggtttc ctgtcagcc 31500
 aaacgctcag cagtgatatt aataaactcc cgggagct cacttaagtt catgtcctg 31560
 tccagctgct gagccacagg ctgctgtcca acttgcggtt gcttaacggg cggcgaagga 31620
 gaagtccacg cctacatggg ggtagagtca taatcgtgca tcaggatagg gcggtggtgc 31680
 tgcagcagcg cgcaataaaa ctgctgcccg cgccgctccg tectgcagga atacaacatg 31740
 gcagtggtct cctcagcagat gatcgcacc gccgcagca taaggcgcct tgtcctccgg 31800
 gcacagcagc gcaccctgat ctcaacttaa tcagcagat aactgcagca cagcaccaca 31860
 atattgttca aaatcccaca gtgcaaggcg ctgtatccaa agctcatggc ggggaccaca 31920
 gaaccacgt ggccatcata ccacaagcgc aggtagatta agtggcgacc cctcataaac 31980
 acgctggaca taaacattae otottttggc atgttghtaat tcaccacctc ccggtaccat 32040
 ataaacctct gattaacat ggcgccatcc accaccatcc taaaccagct ggcaaaaacc 32100
 tgcccgcgg ctatacactg cagggaaacc ggactggaac aatgacagtg gagagcccag 32160
 gactcgtaac catggatcat catgctcgtc atgatataca tgttggcaca acacaggcag 32220
 acgtgcatac acttctcag gattacaagc tcctcccgcg ttagaaccat atcccagga 32280
 acaaccatt cctgaatcag cgtaaatccc aactgcagg gaagacctcg cacgtaactc 32340
 acgttgtgca ttgtcaagt gttacattcg ggcagcagcg gatgatcctc cagtatggt 32400
 ggcgggttt ctgtctcaa aggaggtaga cgatccctac tgtacggagt gcgcccagac 32460
 aaccgagatc gtgttggtcg tagtgtcatg ccaaatggaa cgccggagct agtcatattt 32520
 cctgaagcaa aaccaggtgc gggcgtgaca aacagatctg cgtctccggt ctgcccgtt 32580
 agctcctct tctgtagtag tgtagtatat ccactctctc aaagcatcca ggcgccctt 32640
 ggctccgggt gctatgtaaa ctcttcatg cgccgctgcc ctgataacat ccaccaccgc 32700
 agaataagcc acaccagcc aacctacaca ttcttctgc gagtcaçaca cgggaggagc 32760
 ggaagagct ggaagaacca tgtttttttt tttattccaa aagattatcc aaaacctca 32820
 aatgaagatc tattaagtga acgcgctccc ctccgggtggc gtggtcaaac tctacagcca 32880
 aagaacagat aatggcattt gtaagatggt gcacaatggc ttccaaaagg caaacggccc 32940

tcacgtccaa	gtggacgtaa	aggctaaacc	cttcagggtg	aatctcctct	ataaacattc	33000
cagcaacctc	aacctatgcc	aaataattct	catctcgcca	ccttctcaat	atatctctaa	33060
gcaaatcccg	aatattaagt	ccggccattg	taaaaatctg	ctccagagcg	ccctccacct	33120
tcagcctcaa	gcagcgaatc	atgattgcaa	aaattcaggt	tcctcacaga	cctgtataag	33180
attcaaaaagc	ggaacattaa	caaaaatacc	gcgatcccgt	aggtcacctc	gcagggccag	33240
ctgaacataa	tcgtgcaggt	ctgcacggac	cagcgcggcc	acttccccgc	caggaacctt	33300
gacaaaagaa	cccacactga	ttatgacacg	catactcgga	gctatgctaa	ccagcgtagc	33360
cccgatgtaa	gctttgttgc	atgggcggcg	atataaaatg	caaggtgctg	ctcaaaaaat	33420
caggcaaagc	ctcgcgcaaa	aaagaaagca	catcgtagtc	atgctcatgc	agataaaggc	33480
aggtaagctc	cggaaccacc	acagaaaaag	acaccattht	tctctcaaac	atgtctgcgg	33540
gtttctgcat	aaacacaaaa	taaaataaca	aaaaaacatt	taaacattag	aagcctgtct	33600
tacaacagga	aaaacaaccc	ttataagcat	aagacggact	acggccatgc	cggcgtgacc	33660
gtaaaaaaac	tggtcaccgt	gattaaaaag	caccaccgac	agctcctcgg	tcatgtccgg	33720
agtcataatg	taagactcgg	taaacacatc	aggttgatcc	atcggtcagt	gctaaaaagc	33780
gaccgaaata	gcccggggga	atacatacce	gcagggcgtag	agacaacatt	acagccccca	33840
taggaggtat	aacaaaatta	ataggagaga	aaaacacata	aacacctgaa	aaacctcctt	33900
gcctaggcaa	aatagcacc	tcccgtccca	gaacaacata	cagcgcttca	cagcggcagc	33960
ctaacagtca	gccttaccag	taaaaaagaa	aacctattaa	aaaaacacca	ctcgacacgg	34020
caccagctca	atcagtcaca	gtgtaaaaaa	gggccaagtg	cagagcgagt	atatatagga	34080
ctaaaaaatg	acgtaacggg	taaagtccac	aaaaaacacc	cagaaaaccg	cacgcgaacc	34140
tacgcccaga	aacgaaagcc	aaaaaaccca	caacttcctc	aaatcgtcac	ttccgthttc	34200
ccacgttacg	taacttccca	ttttaagaaa	actacaattc	ccaacacata	caagttactc	34260
cgccctaaaa	cctacgtcac	ccgcccctgt	cccacgcccc	gcgcccagtc	acaaactcca	34320
ccccctcatt	atcatattgg	cttcaatcca	aaataaggta	tattattgat	gatnnnnntt	34380
aat						34383

REIVINDICACIONES

1. Vector de expresión adenoviral quimérico para la protección contra el virus de la gripe H1N1 pandémico, donde dicho vector comprende un casete de expresión que comprende:
- 5 (a) un primer promotor enlazado funcionalmente a un ácido nucleico que codifica un agonista del receptor de tipo toll 3 (TLR-3), en donde el agonista del TLR-3 es un ARN de doble cadena (dsRNA); y
- (b) un segundo promotor enlazado funcionalmente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido de hemaglutinina a partir del virus A/CA/04/2009 H1N1 de la gripe.
2. Vector de expresión adenoviral quimérico según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico que codifica el agonista del TLR-3 comprende un ARN de horquilla corto.
- 10 3. Vector de expresión adenoviral quimérico según la reivindicación 1, en donde el ácido nucleico que codifica el agonista del TLR-3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-6.
4. Vector de expresión adenoviral quimérico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer promotor y el segundo promotor son iguales.
- 15 5. Vector de expresión adenoviral quimérico según la reivindicación 4, en donde el primer promotor y el segundo promotor son cada uno un promotor de CMV.
6. Composición farmacéutica que comprende el vector de expresión adenoviral quimérico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica se formula para su administración por vía oral, mucosa, o intranasal.
- 20 7. Composición farmacéutica de liberación oral que comprende el vector de expresión adenoviral quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Cantidad inmunogénicamente efectiva de un vector de expresión adenoviral quimérico según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, o una composición según las reivindicaciones 6 o 7, para su uso en un método para provocar una respuesta inmune ante un virus pandémico de la gripe H1N1 en un mamífero,
- 25 en donde la respuesta inmune está dirigida contra el polipéptido de hemaglutinina, y en donde la vía de administración se selecciona del grupo que consiste en: oral, intranasal, y mucosa.
9. Vector de expresión o composición para su uso en el método de la reivindicación 8, en donde la vía de administración es oral.
10. Vector de expresión o composición para su uso en el método de la reivindicación 8 o 9, en donde la respuesta inmune es una respuesta inmune de la mucosa.
- 30 11. Vector de expresión o composición para su uso en el método de cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en donde dicho mamífero es un humano.

Figura 1A

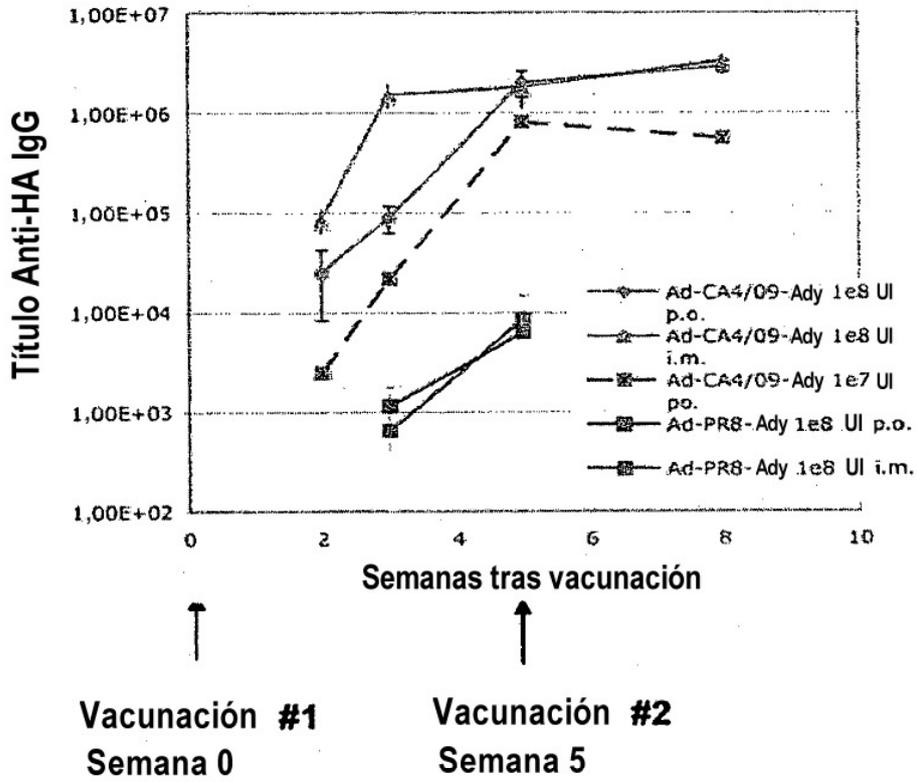


Figura 1B

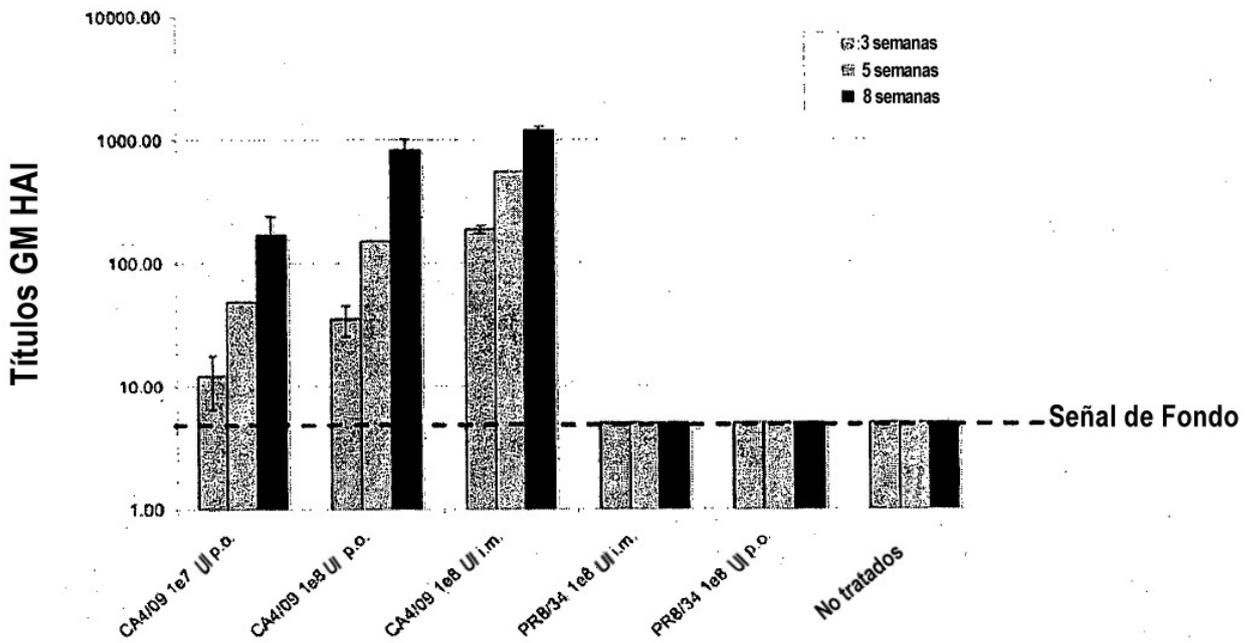


Figura 1C

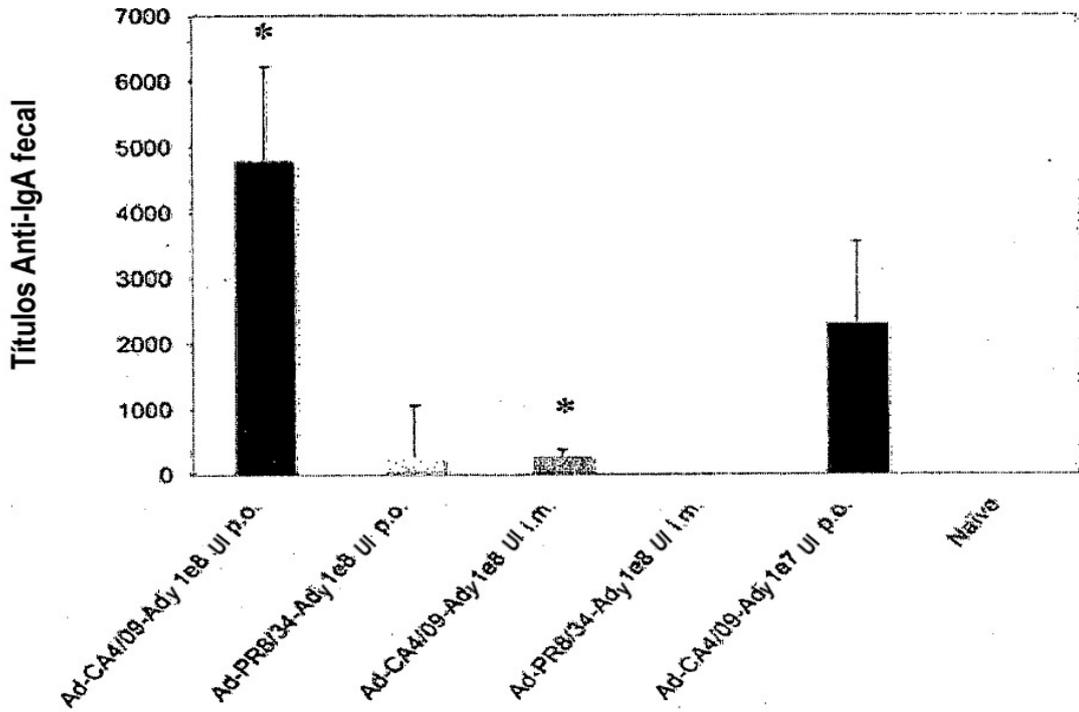


Figura 1D

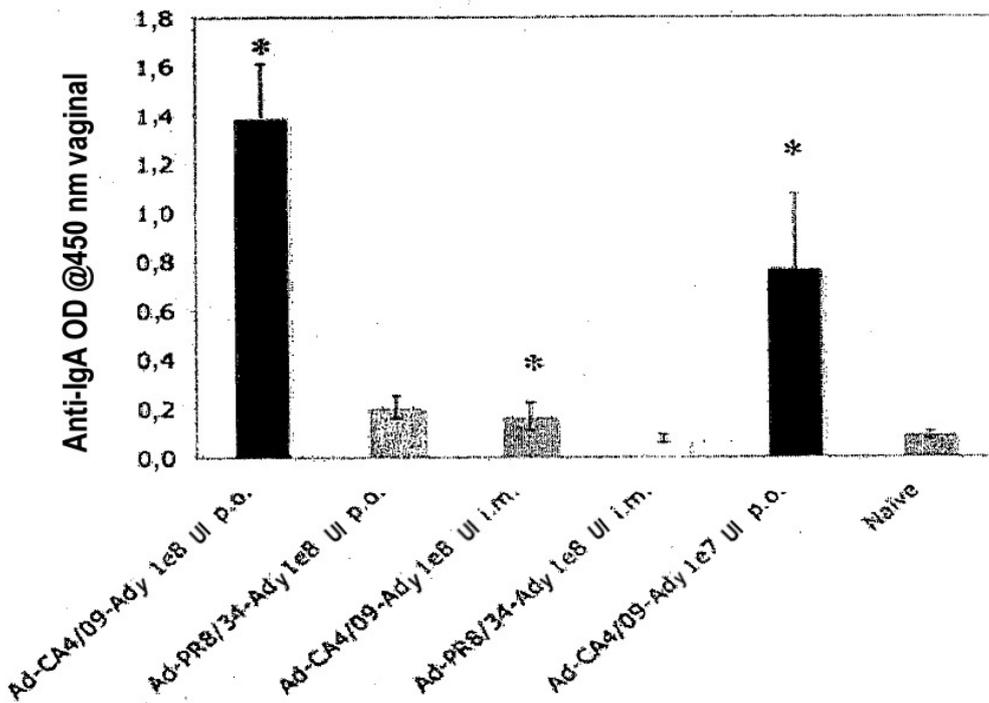


Figura E

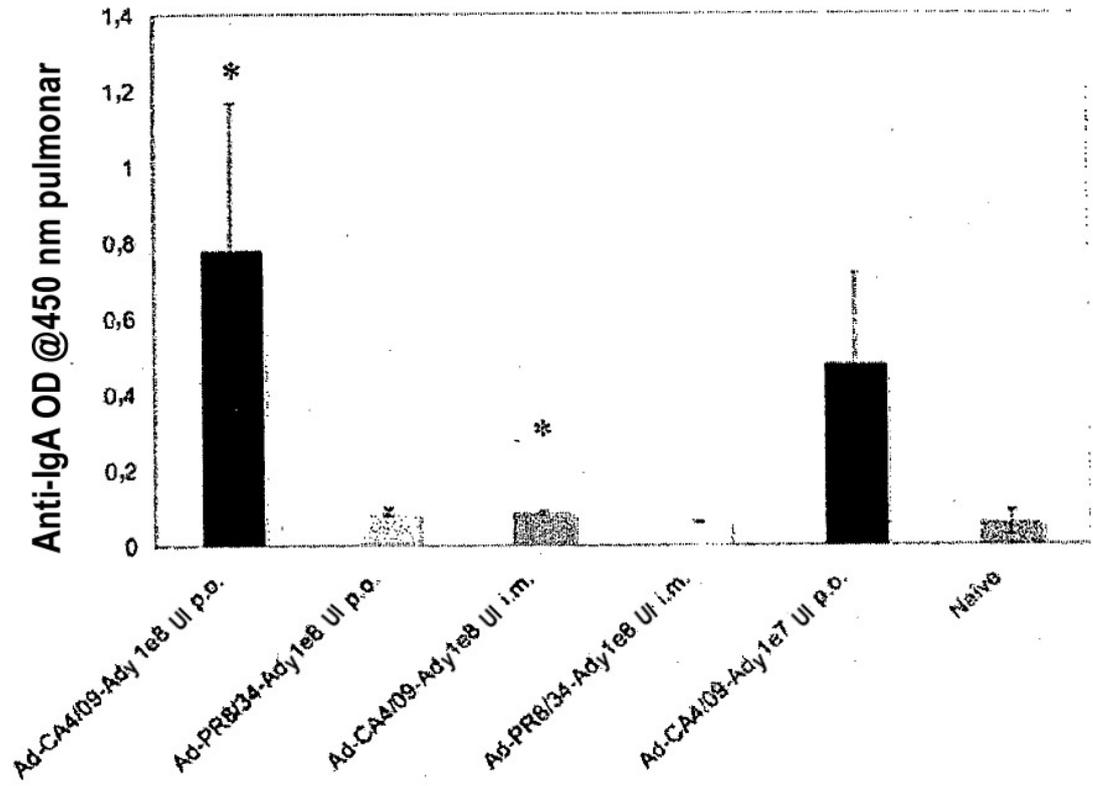


Figura 2A

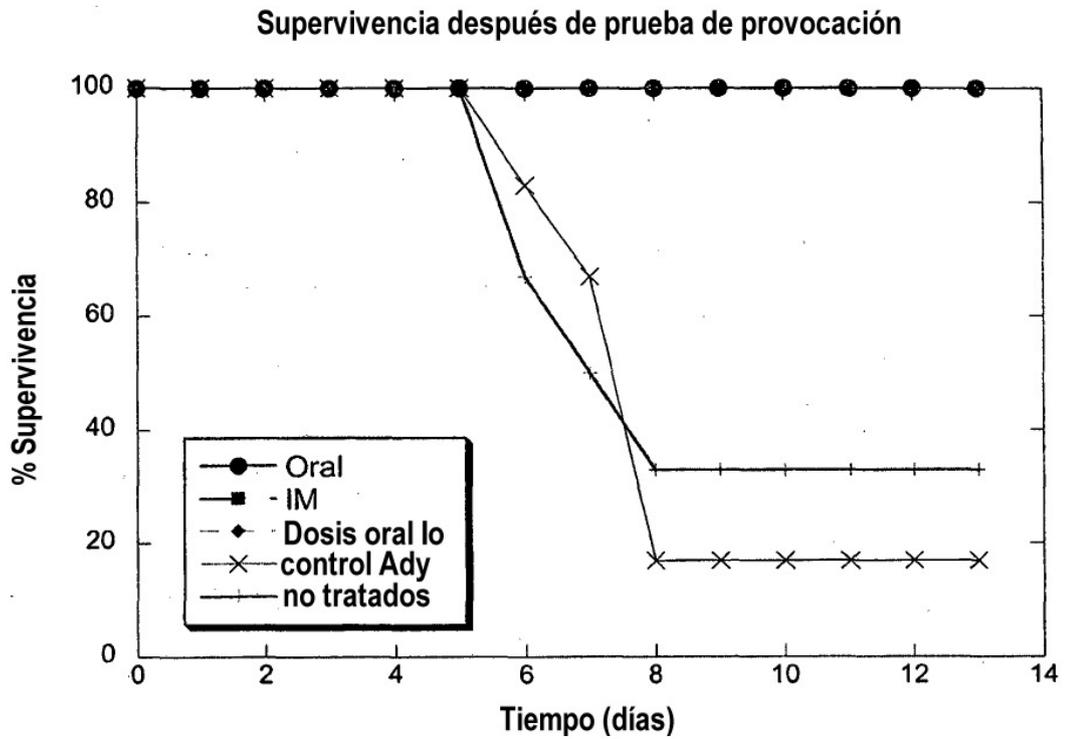


Figura 2B

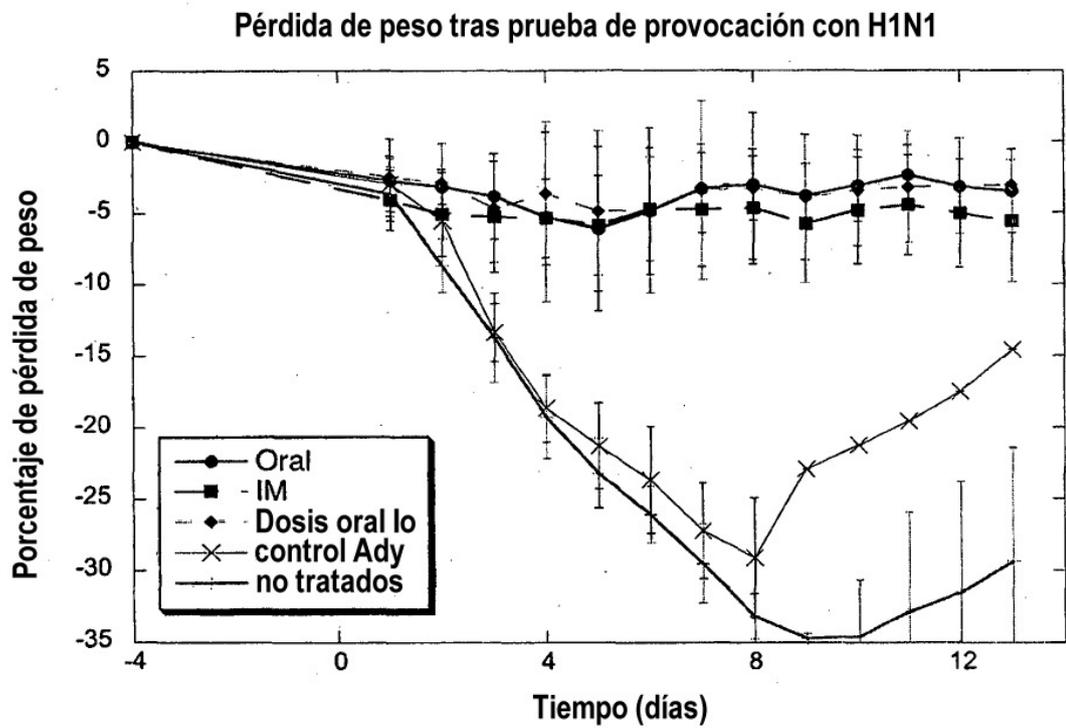


Figura 3

