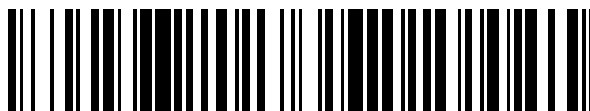


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 679**

51 Int. Cl.:

C12N 15/866 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/015 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.08.2008** **E 08792433 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016** **EP 2191002**

54 Título: **Vectores baculovirales con un promotor doble de vertebrado y baculovirus que controla un gen de fusión inmunogénico**

30 Prioridad:

07.08.2007 JP 2007205785

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

30.06.2016

73 Titular/es:

EDUCATIONAL FOUNDATION JICHI MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)

3311-1, YAKUSHIJI

SHIMOTSUKE-SHI, TOCHIGI 329-0498, JP y

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

YOSHIDA, SHIGETO;

KAWASAKI, MASANORI;

MATSUMOTO, MAKOTO;

OHBA, YOSHIO;

SAITO, MASAHIRO;

GOTO, YOSHIHIRO;

INAGAKI, KATSUYA;

MIZUKOSHI, MASAMI;

HARIGUCHI, NORIMITSU y

HIROTA, KUNIKO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 575 679 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vectores baculovirales con un promotor doble de vertebrado y baculovirus que controla un gen de fusión inmunogénico

Campo técnico

5 La presente divulgación proporciona un nuevo vector de transferencia, un baculovirus recombinante obtenido mediante recombinación homóloga del vector de transferencia y un ADN baculoviral, y métodos para la producción de los mismos.

10 La presente divulgación proporciona además productos farmacéuticos (p. ej., vacunas, y fármacos preventivos o terapéuticos para enfermedades infecciosas tales como malaria y gripe) que contienen el baculovirus recombinante como un principio activo.

Técnica anterior

15 Los baculovirus se han usado como un vector en métodos para producir industrialmente una proteína deseada usando células de insecto. En los últimos años, se ha descubierto que los baculovirus pueden introducir un gen extraño no solo en células de insecto sino también en células de mamífero, y se ha descubierto la posibilidad de su uso como un vector para introducir un gen terapéutico. El Documento de Patente 1 divulga un vector de expresión baculoviral recombinante que contiene múltiples promotores independientes que comprenden un promotor derivado de un gen temprano baculoviral, que tiene una región de ADN que contiene un gen que codifica una proteína no estructural viral, y un promotor derivado de un gen tardío baculoviral, que tiene una región de ADN que contiene un gen que codifica una proteína estructural viral.

20 El Documento de Patente 2 divulga un método que comprende introducir en células de mamífero un vector viral de ADN no mamífero que contiene múltiples promotores independientes controlados para expresar un gen extraño deseado conectado a los promotores; y que expresa el gen extraño en las células de mamífero.

25 Además, el Documento de Patente 3 divulga un método para producir una proteína con tecnología de recombinación génica usando un baculovirus. El método comprende expresar un gen de fusión obtenido al conectar el gen de gp64 baculoviral a un gen que codifica una proteína deseada para producir la proteína deseada en una forma fusionada con partículas virales, recoger las partículas virales fusionadas con la proteína deseada y escindir la proteína deseada de las partículas virales para recoger la proteína.

30 Con respecto a un sistema de expresión baculoviral, el Documento de Patente 4 divulga un vector de expresión baculoviral recombinante que tiene múltiples promotores independientes que contienen una primera secuencia de ácido nucleico que codifica un marcador de detección, que está conectado, en una forma capaz de funcionar, a un primer promotor que es activo en células hospedadoras e inactivo en células no aceptables, y una segunda secuencia de ácido nucleico que contiene una secuencia de ácido nucleico extraña, que está conectada, de una forma capaz de funcionar, a un segundo promotor que es activo en células no aceptables.

35 El Documento de Patente 5 divulga que un vector baculoviral recombinante que expresa antígeno de hemaglutinina (HA) del virus de la gripe conectado a un promotor de CAG derivado de actina β de pollo tiene efectos de prevención de la infección por virus de la gripe y por lo tanto es útil como una formulación vacunal.

40 El Documento de Patente 6 divulga un método para producir un vector baculoviral que comprende la etapa de cotransfectar en células de insecto un plásmido que contiene un promotor baculoviral y un promotor derivado de células de mamífero que tiene conectado al mismo un gen que codifica una proteína expresable sobre la superficie celular, o se ha conectado un plásmido que contiene dos promotores baculovirales que tienen conectado a los mismos un gen que codifica una proteína expresable sobre la superficie celular.

45 El Documento de Patente 7 describe investigar una actividad contra el virus de la gripe, es decir, una actividad contra la infección por el virus de la gripe, de un baculovirus recombinante que tiene ADNc de HA de virus de la gripe incorporado en un promotor de CAG, y divulga que no solo el baculovirus recombinante sino también el baculovirus natural tiene una actividad contra el virus de la gripe.

50 Como se muestra anteriormente, se han desarrollado en los últimos años diversos vectores baculovirales recombinantes, y se han hecho muchos intentos de desarrollar productos farmacéuticos para mamíferos que contienen tal vector baculoviral recombinante como un principio activo.

55 En este campo técnico, se ha deseado el desarrollo de formulaciones farmacéuticas, particularmente formulaciones vacunales que contienen, como un principio activo, un nuevo baculovirus recombinante, que es un vector baculoviral

recombinante que tiene una nueva estructura y que es eficaz contra la malaria, la gripe, la tuberculosis, y enfermedades infecciosas similares, o enfermedades tales como el cáncer.

Documento de Patente 1: Patente japonesa N° 3366328, Multiple Promoter Baculovirus Expression System and Defect Particle Products.

- 5 Documento de Patente 2: WO98/011243, Non-mammalian ADN Virus Having Modified Coating Protein.

Documento de Patente 3: JP N° 2002-235236-A, Methods of Producing Proteins.

Documento de Patente 4: JP N° 2003-284557-A, Novel Baculovirus-Transfecting Vector and Recombinant Baculovirus for Expression of Foreign Gene.

Documento de Patente 5: WO02/062381, Baculovirus Vector Vaccine.

- 10 Documento de Patente 6: WO04/029259, Baculovirus Vector, Method of Producing Baculovirus Vector, and Method of Introducing Gene.

Documento de Patente 7: JP N° 2005-15346-A, Baculovirus-containing Anti-viral Agent.

Documento de Patente 8: EP1983047 (2008-10-22) Disponible sólo como técnica anterior Artículo 54(3) EPC.

Breve descripción de los dibujos

- 15 La FIG. 1 muestra los resultados de prueba de la expresión de antígenos vacunales procedentes de baculovirus recombinantes de la presente invención en células de insecto en el Ejemplo 3.

Detectado por el anticuerpo monoclonal gp64 (AcV5)

Carril 1: AcNPV-WT

Carril 2: AcNPV-CAP-PfCSP

- 20 Carril 3: AcNPV-CAP-HA1/Anhui

Carril 4: AcNPV-CAP-HA1/Vietnam

La FIG. 2 (A) muestra un análisis de inmunotransferencia que muestra la expresión del gen CSP (PfCSP) de malaria humana en partículas virales de baculovirus recombinantes producidos a partir de vectores de transferencia recombinantes.

- 25 Detectado por el anticuerpo monoclonal Anti-PfCSP (2A10)

Carril 1: AcNPV-CAP-PfCSP

Carril 2: AcNPV-CAP-PfCSP/272

Carril 3: AcNPV-CAP-PfCSP/467

- 30 La FIG. 2 (B) muestra un análisis de inmunotransferencia que muestra la expresión del gen H5N1/HA1 en partículas virales de baculovirus recombinantes producidos a partir de vectores de transferencia recombinantes.

Detectado por el anticuerpo policlonal de conejo H5N1/Vietnam (IT-003-005)

Carril 1: AcNPV-WT (Lisado celular)

Carril 2: AcNPV-CAP-HA1/Anhui (Lisado celular)

Carril 3: AcNPV-CAP-HA1/Vietnam (Lisado celular)

Carril 4: AcNPV-WT (Virión)

Carril 5: AcNPV-CAP-HA1/Vietnam (Virión)

Carril 6: Antígeno H5N1/Anhui purificado (IT-003-0053p)

- 5 La FIG. 3 muestra células HepG2 teñidas con anticuerpo marcado fluorescentemente, que indica que un antígeno ha sido expresado por un baculovirus recombinante que contiene un gen de fusión del gen PfMSP1 y el gen PfCSP en las células HepG2. Los resultados de la FIG. 3 (A) confirmaron que se ha expresado un antígeno de PfCSP. Los resultados de FIG. 3 (B) confirmaban que se ha expresado un antígeno de PfMSP-1₁₉.

La FIG. 4 muestra los resultados de la medida de títulos de anticuerpos obtenidos en el Ejemplo 6.

- 10 La FIG. 5 muestra los vectores de transferencia de la presente invención.

Divulgación de la invención

Problemas a resolver por la invención

- 15 Un objetivo de la presente divulgación es proporcionar un nuevo vector de transferencia recombinante, un baculovirus recombinante obtenido mediante recombinación homóloga del vector de transferencia recombinante y un ADN baculoviral, y métodos para la producción de los mismos. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una preparación farmacéutica como la reivindicada, particularmente una formulación vacunal que contiene el baculovirus recombinante como un principio activo.

Medios para resolver los problemas

- 20 Los presentes inventores descubrieron un vector de transferencia que tiene una nueva estructura capaz de expresar una proteína de fusión de una proteína que tiene una inmunogenicidad deseada o una proteína parcial de la misma con una proteína estructural viral en células de insecto y en células de vertebrado (particularmente mamífero y ave); y un baculovirus recombinante obtenido mediante la recombinación homóloga del vector de transferencia y un ADN baculoviral. Usando el baculovirus recombinante obtenido, los presentes inventores llevaron a cabo una investigación intensiva sobre productos farmacéuticos que contienen como un principio activo un baculovirus
- 25 recombinante que tiene efectos preventivos y terapéuticos sobre enfermedades infecciosas. Como resultado, los inventores descubrieron que el baculovirus recombinante obtenido tiene los efectos farmacéuticos deseados.

- 30 Así, los inventores de la presente invención descubrieron un vector de transferencia recombinante que tiene una nueva estructura, un baculovirus recombinante obtenido mediante la recombinación homóloga del vector de transferencia y un ADN baculoviral, y métodos para la producción de los mismos, y determinaron que el propio baculovirus recombinante es útil como un producto farmacéutico capaz de expresar una proteína que tiene la inmunogenicidad deseada en células diana, y como un producto farmacéutico para prevenir enfermedades infecciosas tales como malaria y gripe. La presente invención se ha completado basándose en estos hallazgos.

- 35 La presente invención proporciona las invenciones mostradas en los siguientes puntos 1 a 2:

[1] Una composición farmacéutica que comprende un virus de nucleopoliedrosis de Autographa californica (AcNPV) recombinante como un agente activo y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable,

en donde el AcNPV recombinante contiene una estructura génica que tiene un gen de fusión de

- 40 (A) un gen que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 19-373 de SEQ ID NO: 70 (Proteína de circumesporozoítos de Plasmodium falciparum; PfCSP), y

(B) un gen que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 21-512 de proteína de partícula viral gp64 (gp64) codificada en el genoma de AcNPV (Nº de Registro del GenBank L22858) bajo el control de un promotor doble que comprende promotor de poliedrina y promotor de CAG conectados entre sí (CAP).

[2] Una composición farmacéutica de [1], que es una vacuna para la malaria.

También se divulgan en la presente:

5 Punto 1. Un vector de transferencia que es uno cualquiera de pCAP-PfCSP, pCAP-PfCSP/272, pCAP-PfCSP/467, pCAP-PfCSP(A361E), pCAP-PfCSP(A361E)/272, pCAP-PfCSP(A361E)/467, pCAP-PfCSP-76, pCAP-PfCSP-76/467, pCAP-PfCSP+209, pCAP-PfCSP+209/467, pCAP-PfCSP+76/209, pCAP-PfCSP+76/209/467, pCAP-HA1/Anhui, pCAP-HA1/Anhui/272, pCAP-HA1/Anhui/467, pCAP-HA1/Vietnam, pCAP-HA1/Vietnam/51, pCAP-HA1/Vietnam/101, pCAP-HA1/Vietnam/154, pCAP-HA1/Vietnam/201, pCAP-HA1/Vietnam/272, pCAP-HA1/Vietnam/467, pCAP-AH/345, pCAP-AH/345/467, pCAP-AH/410, pCAP-AH/410/467, pCAP-AH/473, pCAP-AH/473/467, pCAP-AH/520, pCAP-AH/520/467, pCAP-VN/346, pCAP-VN/346/467, pCAP-VN/410, pCAP-VN/410/467, pCAP-VN/473, pCAP-VN/473/467, pCAP-VN/520, pCAP-VN/520/467, pCAP-CO/full, pCAP-CO/full/467, pCAP-CO/19, pCAP-CO/19/467, pCAP-CO/76, pCAP-CO/76/467, pCAP-CO/205, pCAP-CO/205/467, pCA39-HA1/Anhui, pCA64-HA1/Anhui, pCA39-PfCSP(A361E), pCA64-PfCSP(A361E), pCAP-CO/full/VSV, pCAP-CO/19/VSV, pCAP-CO/76/VSV, pCAP-CO/205/VSV, pDual-Pfs25-PfCSP-gp64 y pDual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

15 Punto 2. Un baculovirus recombinante que es uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

Punto 3. Una composición para enfermedades infecciosas que comprende el baculovirus recombinante del punto 2 como un principio activo.

30 Punto 4. Una composición para enfermedades infecciosas que comprende el baculovirus recombinante del punto 2 como un principio activo, administrándose la composición mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 5. Una vacuna que comprende el baculovirus recombinante del punto 2 como un principio activo.

Punto 6. Una vacuna que comprende el baculovirus recombinante del punto 3 como un principio activo, administrándose la composición mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

35 Punto 7. Un agente terapéutico o preventivo para la infección por el virus de la gripe, que comprende como un principio activo uno cualquiera de AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui y AcNPV-CA64-HA1/Anhui.

45 Punto 8. Un agente terapéutico o preventivo para la infección por el virus de la gripe según el punto 7, que se administra mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

50 Punto 9. Una vacuna contra la infección por el virus de la gripe, que comprende como un principio activo uno cualquiera de AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui y AcNPV-CA64-HA1/Anhui.

Punto 10. Una vacuna contra la infección por el virus de la gripe según el punto 7, que se administra mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 11. Un agente terapéutico o preventivo para la infección por malaria humana, que comprende como un principio activo uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

Punto 12. Un agente terapéutico o preventivo para la infección por malaria humana según el punto 11, que se administra mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 13. Un agente terapéutico o preventivo para la infección por malaria humana, que comprende como un principio activo uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64, y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

Punto 14. Un agente terapéutico o preventivo para la infección por malaria humana según el punto 13, que se administra mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 15. Un método para prevenir la infección por malaria o gripe o para tratar malaria o gripe, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del baculovirus recombinante del punto 2, la composición para enfermedades infecciosas del punto 3 o 4, o la vacuna del punto 5, 6, 9, 10, 13 o 14.

Punto 16. Un método según el punto 15, en el que el baculovirus recombinante, la composición o la vacuna se administra al sujeto como una formulación liposómica.

Punto 17. Un método según el punto 15, en el que el baculovirus recombinante, la composición o la vacuna se administra al sujeto mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 18. Un método según el punto 16, en el que el baculovirus recombinante, la composición o la vacuna se administra al sujeto mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 19. Un método de inmunestimulación que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del baculovirus recombinante del punto 2, la composición para enfermedades infecciosas del punto 3 o 4 o la vacuna del punto 5, 6, 9, 10, 13 o 14.

Punto 20. Un método según el punto 19, en el que el baculovirus recombinante, la composición o la vacuna se administra al sujeto como una formulación liposómica.

Punto 21. Un método según el punto 19, en el que el baculovirus recombinante, la composición o la vacuna se administra al sujeto mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Punto 22. Un método según el punto 20, en el que el baculovirus recombinante, la composición o la vacuna se administra al sujeto mediante la vía intramuscular, respiratoria o nasal.

Efecto de la invención

Según la presente divulgación, se proporcionan un nuevo vector de transferencia recombinante, un baculovirus recombinante obtenido mediante la recombinación homóloga del vector de transferencia recombinante y un ADN baculoviral, y métodos para la producción de los mismos. Los productos farmacéuticos que contienen el baculovirus recombinante de la presente divulgación como un principio activo son útiles como fármacos terapéuticos o preventivos para enfermedades infecciosas tales como malaria y gripe, o como formulaciones de medicina celular y vacunales.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Las abreviaturas utilizadas para los aminoácidos, péptidos, secuencias de bases y ácidos nucleicos en la presente memoria descriptiva se basan en las abreviaturas especificadas en la IUPAC-IUB Communication on Biochemical Nomenclature, Eur. J. Biochem., 138: 9 (1984) y "Guideline for Preparing Specifications Including Base Sequences and Amino Acid Sequences" (Oficina de Patentes) y las usadas comúnmente en este campo técnico. En la presente memoria descriptiva, la molécula de ADN puede incluir no solo ADN de doble hebra sino también ADN de una sola hebra, es decir, una cadena de sentido y una cadena antisentido que constituyen el ADN de doble hebra, y no está limitada a la longitud completa de la misma. El polinucleótido (molécula de ADN) que codifica el gen extraño inmunogénico de la presente divulgación abarca ADN de doble hebra que contiene ADN genómico, ADN de una sola hebra (cadena de sentido) que contiene ADNc y ADN de una sola hebra (cadena antisentido) que tiene una secuencia complementaria a la cadena de sentido, ADN sintético, y fragmentos de los mismos, a menos que se mencione otra cosa.

El polinucleótido o molécula de ADN usado en la presente no está limitado en la región funcional, y puede incluir al menos uno de una región de supresión de la expresión, una región codificante, una secuencia líder, un exón y un intrón.

Además, ejemplos del polinucleótido incluyen ARN y ADN. El polipéptido que contiene una secuencia de aminoácidos específica y el polinucleótido que contiene una secuencia de ADN específica incluyen fragmentos, homólogos, derivados y mutantes del polinucleótido.

Ejemplos de mutantes del polinucleótido, tales como ADN mutante, incluyen mutantes alélicos naturales; mutantes artificiales; y mutantes que tienen eliminación, sustitución, adición y/o inserción. Sin embargo, se debe entender que tales mutantes codifican polipéptidos que tienen sustancialmente la misma función que el polipéptido codificado por el polinucleótido no mutado original.

En la presente invención, el vector de transferencia se refiere a un plásmido para producir un baculovirus recombinante que tiene una estructura en la que un gen de fusión, formado al conectar al menos un gen que codifica una proteína capaz de ser un componente de partículas virales a al menos un gen extraño inmunogénico, se incorpora aguas abajo de un promotor doble que comprende dos promotores conectados, es decir, un promotor de vertebrado (p. ej., un promotor de mamífero o un promotor de ave) y un promotor baculoviral.

En una realización preferible de la invención, el gen extraño inmunogénico está situado aguas abajo del promotor doble y aguas arriba del gen que codifica una proteína capaz de ser un componente de partículas virales. El baculovirus recombinante de la presente divulgación se usa como un principio activo de productos farmacéuticos o vacunas para vertebrados. Ejemplos de vertebrados incluyen mamíferos tales como seres humanos, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, cabras, monos, ratones, perros y gatos. Ejemplos de aves incluyen pollos, codornices, gansos, patos silvestres, palomas, pavos, pintadas y loros.

En una realización, la presente divulgación proporciona un vector de transferencia que contiene una nueva estructura que tiene incorporado en ella un gen de fusión de un gen extraño inmunogénico y un gen que codifica una proteína membranaria viral que se puede expresar en células de insecto bajo el control de un promotor doble que comprende un promotor de vertebrado y un promotor baculoviral conectados entre sí. La cotransfección de este vector de transferencia con un ADN baculoviral en células de insecto induce una recombinación homóloga y de ese modo produce un baculovirus recombinante que tiene incorporado en el mismo el gen de fusión que se expresa bajo el control de un promotor baculoviral en células de insecto y que puede producir una proteína de fusión capaz de ser un componente de partículas virales brotadas.

En la presente invención, cuando el baculovirus recombinante se administra a un vertebrado, una proteína de fusión de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales brotadas con una proteína inmunogénica parece funcionar como una vacuna acelular. Además, el baculovirus recombinante administrado al vertebrado entra en la célula del vertebrado, y un antígeno de fusión con el antígeno extraño inmunogénico deseado se produce a partir del genoma viral en la célula del vertebrado, y funciona como una vacuna de ADN.

Así, por ejemplo, cuando el baculovirus recombinante de la presente divulgación se administra a un mamífero, una proteína de fusión de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales con una proteína inmunogénica se presenta como un antígeno sobre la superficie de las partículas virales, y una proteína de fusión de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales con una proteína inmunogénica se produce en la célula de mamífero, y parece funcionar como un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas, tales como una infección viral, protozoaria y bacteriana, debido a su acción inmunopotenciadora.

El ADN baculoviral que se va a cotransfectar con el vector de transferencia puede ser un ADN baculoviral natural, mutante o recombinante. Ejemplos de células hospedadoras que se van a cotransfectar incluyen células de insecto tales como células de *Spodoptera frugiperda*.

En la presente divulgación, el gen extraño inmunogénico se refiere a un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica usada como un inmunógeno en inmunoterapia, tal como una terapia vacunal, para la prevención y el tratamiento de enfermedades infecciosas, tales como malaria y gripe. Ejemplos

El gen "extraño" que se usa en la presente se refiere a un gen introducido desde fuera. Aunque el mismo gen esté presente en la célula, el gen introducido desde fuera se denomina el gen "extraño".

En la presente divulgación, el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína usada como el inmunógeno no está particularmente limitado, con tal de que el gen sea capaz de codificar la secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica que tiene inmunogenicidad contra una sustancia que provoca enfermedades tales como enfermedades infecciosas. Ejemplos de genes que codifican la secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica que tiene inmunogenicidad son como sigue.

Ejemplos de genes que codifican la secuencia de aminoácidos de un antígeno de malaria incluyen genes que codifican las secuencias de aminoácidos de antígeno superficial de esporozoitos CSP (proteína de circumesporozoitos) de parásitos de malaria, proteína membranaria superficial de merozoitos MSP1 (proteína superficial de merozoitos 1), antígeno S de malaria secretado de eritrocitos infectados con malaria, proteína PfEMP1 presente en los nudos de eritrocitos infectados con malaria, proteína SERA, proteína TRAMP, proteína AMA1 y proteínas similares.

Ejemplos de genes que codifican las secuencias de aminoácidos de antígenos del virus de la gripe incluyen genes que codifican las secuencias de aminoácidos de antígeno de HA (antígeno de hemaglutinina), antígeno de NA (antígeno de neuraminidasa), antígeno de M2 (antígeno de proteína de matriz), antígeno de NP (antígeno de nucleoproteína) y proteínas similares.

De los genes de vertebrado, ejemplos de genes de mamífero incluyen genes que codifican las secuencias de aminoácidos de proteínas antigénicas de enfermedades infecciosas en seres humanos, ganado bovino, caballos, cerdos, ovejas, monos, ratones, perros y gatos. Ejemplos de genes aviares incluyen genes de antígeno (p. ej., antígeno de HA de la gripe aviar) de enfermedades infecciosas de pollos, patos silvestres, palomas, pavos, pintadas y loros.

Se ha informado que genes patógenos cuya asociación con enfermedades infecciosas en los mamíferos y las aves que se mencionan anteriormente están fácilmente disponibles de instituciones que almacenan datos públicos registrados sobre genes patógenos, tales como Genbank.

La presente divulgación puede proporcionar un vector de transferencia que tiene tal gen extraño inmunogénico y un baculovirus recombinante obtenido mediante la recombinación homóloga del vector de transferencia. Por otra parte, la presente invención puede proporcionar una composición farmacéutica como la reivindicada que contiene como un principio activo el baculovirus recombinante que tiene el gen extraño inmunogénico, y una formulación vacunal de la composición farmacéutica.

El baculovirus usado en la presente divulgación se refiere a virus patógenos de insecto que provocan infección en insectos, que son un grupo (*Baculoviridae*) de virus de ADN que tienen un ADN de doble hebra cíclico como un gen. Entre estos, un grupo de los virus denominado el virus de la nucleopoliedrosis (NPV) produce un cuerpo de inclusión, denominado poliedro, en el núcleo de células infectadas en la fase tardía de la infección. Aunque se inserte un gen extraño que se va a expresar en lugar del gen de poliedrina, la infección y el crecimiento del virus ocurren suficientemente para producir una gran cantidad del producto génico extraño deseado. Por lo tanto, este virus se ha usado en los últimos años para la producción de proteínas deseadas.

Ejemplos del baculovirus usado en la presente divulgación incluyen virus de nucleopoliedrosis de *Autographa californica*: AcNPV, virus de nucleopoliedrosis de *Bombyx mori*: BmNPV, virus de nucleopoliedrosis de *Orgyia pseudotsugata*: OpNPV, y virus de nucleopoliedrosis de *Lymantria dispar*: LdNPV.

El ADN baculoviral puede ser cualquier ADN que se pueda recombinar homológamente con el vector de transferencia de la presente divulgación. Más específicamente, el gen viral del ADN baculoviral que se puede recombinar homológamente con el vector de transferencia de la presente divulgación es tan grande como 130 kpb de tamaño, y un gen extraño inmunogénico de 15 kpb o más se puede insertar en el mismo. Debido a que el propio gen baculoviral se expresa escasamente en células de vertebrado, casi no hay necesidad de considerar su citotoxicidad. Así, se cree que no se induce una respuesta inmunitaria perjudicial.

(1) Vector de transferencia y producción del vector de transferencia usado en la presente invención

Producción de ADN del gen extraño inmunogénico

El ADN del gen extraño inmunogénico capaz de fusionarse al gen viral, que es uno de los componentes del vector de transferencia baculoviral, se puede producir u obtener fácilmente mediante una síntesis basada en la información de la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína antigénica que tiene la inmunogenicidad deseada divulgada en esta memoria descriptiva, o sintetizando directamente el ADN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico de la región codificante del gen extraño inmunogénico, basado en la información de la secuencia de ácido nucleico del gen extraño inmunogénico (método de síntesis química de ADN). Se pueden usar para esta producción técnicas de genomanipulación generales (véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning" 2ª Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Zoku Seikagaku Jikken Kouza, "Idenshi Kenkyuho I, II, III", editado por la Japanese Biochemistry Society, 1986).

Ejemplos de métodos para sintetizar el ADN incluyen medios de síntesis química, tales como el método del triéster de fosfato y el método de fosfatoamidita (J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); *ibid.*, 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); *ibid.*, 24, 245 (1983)) y métodos de combinación de los mismos. El ADN también se puede sintetizar químicamente mediante el método de la fosforamidita o el método del triéster, o se puede sintetizar al usar un sintetizador de oligonucleótidos automático disponible comercialmente. Un fragmento de doble hebra se puede obtener al sintetizar una hebra complementaria y reasociar la hebra complementaria con una hebra simple sintetizada químicamente bajo condiciones apropiadas, o añadir la hebra complementaria con secuencias cebadoras apropiadas a una hebra simple sintetizada químicamente usando una ADN polimerasa.

Ejemplos específicos del ADN del gen extraño inmunogénico producido en la presente divulgación incluyen ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína de antígeno de malaria, y una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína de antígeno del virus de la gripe.

El ADN usado en la presente divulgación no se limita a una secuencia de ADN de longitud completa que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido de una proteína antigénica que tiene la inmunogenicidad, y puede ser una secuencia de ADN que codifica una secuencia parcial de la misma, con tal de que la proteína de la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ADN tenga la inmunogenicidad.

El ADN del gen extraño inmunogénico usado en la presente divulgación no se limita a moléculas de ADN que tienen tal secuencia de ADN específica, y pueden ser moléculas de ADN que tienen una secuencia de ADN producida al seleccionar adecuadamente codones para cada residuo de aminoácido. La elección de los codones se puede realizar según un método estándar, por ejemplo, al considerar la frecuencia de uso de codones en el hospedador usado (Nucleic Acids Res., 9, 43(1981)).

El ADN del gen extraño inmunogénico usado en la presente invención se puede producir mediante técnicas de genomanipulación, más específicamente al preparar una biblioteca de ADNc a partir de un origen apropiado que expresa el ADN de un gen extraño inmunogénico según un método estándar, y seleccionar un clon deseado de la biblioteca usando una sonda apropiada o un anticuerpo contra el producto expresado, que es específico para el gen extraño inmunogénico (véase, por ejemplo, Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 78, 6613 (1981); Science, 222, 778 (1983)).

Ejemplos del origen de ADN genómico incluyen diversas células, tejidos y células cultivadas derivadas de los mismos, que expresan el ADN del gen extraño inmunogénico. Son particularmente preferibles extractos de eritrocitos infectados con parásitos de malaria, y extractos de células infectadas con virus de la gripe. La extracción y la separación de ADN y ARN total del origen, la separación y la purificación de ARNm y la producción y la clonación de ADNc se pueden realizar según métodos estándar.

Según se describe anteriormente, el ADN del gen extraño inmunogénico se puede producir al usar la biblioteca de ADNc de cada inmunógeno preparado mediante extracción, separación y purificación del ARNm del tejido o las células inmunogénicas procedentes del susodicho extracto. El ADN del gen extraño inmunogénico también se puede producir al usar una biblioteca de fagos preparada al extraer el ARNm de cada inmunógeno, añadir poli A al ARN, recoger el ARN con polil A añadido, producir ADNc usando una transcriptasa inversa, añadir sitios de enzima de restricción a ambos extremos del ADNc e incorporar el ADNc a un fago.

El método de cribado de ADN de gen extraño inmunogénico a partir de la biblioteca de ADNc no está particularmente limitado, y se puede realizar según un método habitual. Ejemplos específicos de tales métodos incluyen un método de selección de un clon de ADNc correspondiente mediante cribado inmunológico usando un anticuerpo específico (p. ej., anticuerpo contra la malaria, anticuerpo contra el virus de la gripe, etc.) contra la proteína producida por el ADNc; un método de hibridación por calvas usando una sonda que se une selectivamente a la secuencia de ADN diana; un método de hibridación en colonias; y combinaciones de los mismos.

La sonda usada en tales métodos de hibridación es habitualmente un fragmento de ADN sintetizado químicamente basándose en la información sobre la secuencia de ADN del gen extraño inmunogénico. Las secuencias de ADN del

gen extraño inmunogénico ya obtenidas o fragmentos de las mismas también se pueden usar ventajosamente como la sonda. También se pueden usar como la sonda para el cribado un cebador de sentido y un cebador antisentido diseñados basándose en la información de la secuencia de ADN del gen extraño inmunogénico.

- 5 El ADN (nucleótidos) usado como la sonda es un ADN (nucleótidos) parcial correspondiente a la secuencia de ADN de un gen extraño inmunogénico. El ADN (nucleótidos) tiene una secuencia de al menos 15 ADN consecutivos, preferiblemente al menos 20 ADN consecutivos, y más preferiblemente al menos 30 ADN consecutivos. También se puede usar como la sonda un propio clon positivo para producir el ADN que se menciona anteriormente.
- 10 Para obtener el ADN del gen extraño inmunogénico, se usa preferiblemente un método de amplificación de ADN/ARN mediante PCR (Science, 230, 1350 (1985)). En particular, cuando un ADNc de longitud completa se obtiene difícilmente de la biblioteca, se usa preferiblemente el método de RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc; Jikken Igaku 12(6), 35(1994)), particularmente el método de 5'-RACE (M. A. Frohman, y cols., Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 8, 8998(1988)).
- 15 Los cebadores usados para la PCR se pueden diseñar, basándose en la información de la secuencia de ADN del gen extraño inmunogénico, y sintetizar según métodos estándar. Como los cebadores, también se pueden usar porciones de ADN (promotor/cebador de SP6 y terminador/cebador de T7) añadidas a ambos extremos de un plásmido vectorial que tiene el ADN del gen extraño inmunogénico incorporado en el mismo, como se describe en los Ejemplos posteriormente.
- 20 El aislamiento/la purificación del fragmento de ADN/ARN amplificado por PCR se pueden realizar según métodos estándar, por ejemplo, mediante electroforesis en gel.
- 25 La secuencia de ADN del ADN del gen extraño inmunogénico así obtenido o diversos fragmentos de ADN del mismo se puede determinar según métodos estándar, por ejemplo, mediante el método de dideoxi (Proc. Natl. Acad. Sci., USA., 74, 5463(1977)) o el método de Maxam-Gilbert (Methods in Enzymology, 65, 499(1980)), o simplemente al usar un estuche de secuenciación disponible comercialmente.
- 30 El gen que codifica los aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales puede ser cualquier gen que pueda codificar una proteína que se forme como una proteína de fusión con un gen extraño inmunogénico como el susodicho en células diana y se pueda expresar como una proteína capaz de ser un componente de partículas virales en células de insecto.
- 35 Ejemplos del gen que codifica los aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales incluye genes de proteína gp64 (Nº Registro del GenBank L22858), glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSVG: Nº Registro del GenBank J02428), glicoproteína del virus del herpes simple (KOS: Nº Registro del GenBank K01760), gp120 del virus de la inmunodeficiencia humana tipo I (Nº Registro del GenBank U47783), glicoproteína membranaria del virus respiratorio sincitial humano (Nº Registro del GenBank M86651), proteína de hemaglutinina del virus de la gripe A (Nº Registro del GenBank U38242) y genes de proteínas de envuelta de virus muy relacionados con baculovirus.
- 40

Secuencia de aminoácidos de proteína de partículas virales gp64 (gp64) codificada por los nucleótidos 108179 a 109717 en el genoma de AcNPV (Nº Registro del GenBank L22858):

```
MVSAIVLYVLLAAAHSAFAAEHCNAQMKTGPKYKIKNLDITPPKETLQKDVEITIVETDYNENVIIGYKG
YYQAYAYNGGSLDPNTRVEETMKTLNVGKEDLLMWSIRQQCEVGEELIDRWGSDSDDCFRDNEGRGQWVK
GKELVKRQNNHFAHHTCNKSWRCGISTSKMYSRLCQDDTDECQVYILDAEGNPINVTVDVLHRDGV
MILKQKSTFTTRQIKAACLLIKDDKNNPESVTRHCLIDNDIYDLKNTWNCNCFNRCIKRKVEHRVKKRP
PTWRHNVRAKYTEGDTATKGDLMHIEELMYENDLLKMNIELMHAHINKLNMLHDLIVSVAKVDERLIG
NLMNNSVSSTFLSDDTFLMPCNTNPPAHTSNYCYNNSIYKEGRWVANTDSSQCIDFSNYKELAIDDDFEFW
IPTIGNTTYHDSWKDASGWSFIAQQKSNLITTMENTKFGGVGTSLSDITSMAEGELAAKLTSPFMFGHVVN
FVILIVILFLYCMIRNRNQY
```

- 45 Aminoácidos 21-512 de gp64 codificados en el genoma de AcNPV (Nº Registro del GenBank L22858):

```
AEHCNAQMKTGPKYKIKNLDITPPKETLQKDVEITIVETDYNENVIIGYKGYYQAYAYNGGSLDPNTRVEE
TMKTLNVGKEDLLMWSIRQQCEVGEELIDRWGSDSDDCFRDNEGRGQWVKGKELVKRQNNHFAHHTCNK
SWRCGISTSKMYSRLCQDDTDECQVYILDAEGNPINVTVDVLHRDGVSMILKQKSTFTTRQIKAACLL
IKDDKNNPESVTRHCLIDNDIYDLKNTWNCNCFNRCIKRKVEHRVKKRPPTWRHNVRAKYTEGDTATKG
DLMHIEELMYENDLLKMNIELMHAHINKLNMLHDLIVSVAKVDERLIGNLMNNSVSSTFLSDDTFLM
PCNTNPPAHTSNYCYNNSIYKEGRWVANTDSSQCIDFSNYKELAIDDDFEFWIPITIGNTTYHDSWKDASGWS
FIAQQKSNLITTMENTKFGGVGTSLSDITSMAEGELAAKLTSPFMFGHVNVFVILIVILFLYCMIRNRNQY
```

En la presente invención, se usa el gen de gp64 descrito en los Ejemplos posteriores.

El ADN del gen que codifica los aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales se puede producir u obtener fácilmente mediante la síntesis basada en la información de la secuencia de ácido nucleico del polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos del polipéptido del gen que codifica los aminoácidos de la proteína diana capaz de ser un componente de partículas virales; o al sintetizar directamente el ADN correspondiente a la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos, basándose en la información de la secuencia de aminoácidos del gen que codifica los aminoácidos de la proteína capaz de ser un componente de partículas virales (síntesis química de ADN), como en el caso de la producción del ADN del gen extraño inmunogénico.

La secuencia de ADN correspondiente a la secuencia de ácido nucleico que codifica los aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales no se limita a una región codificante de longitud completa, y puede ser ADN que contiene una secuencia de ADN parcial del mismo.

Como en el caso de la producción de la molécula de ADN del gen extraño inmunogénico, el ADN del gen que codifica los aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales se puede producir mediante técnicas de genomanipulación generales (véanse, por ejemplo, Molecular Cloning 2ª Ed, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989); Zoku Seikagaku Jikken Kouza, "Idenshi Kenkyuho I, II, III", editado por la Japanese Biochemistry Society, 1986).

En la presente invención, también se pueden usar plásmidos vectoriales disponibles comercialmente en los que se ha incorporado una parte del promotor que controla la expresión del gen extraño inmunogénico descrito más tarde y se ha introducido un gen (parcial) que codifica los aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales.

Promotores de vertebrado

Ejemplos del promotor de vertebrado (promotor capaz de funcionar en células de vertebrado) que es uno de los componentes del vector de transferencia usado en la presente divulgación incluyen promotores de mamífero y promotores aviares.

Promotores de mamífero

Ejemplos del promotor de mamífero (promotor capaz de funcionar en células de mamífero) que es uno de los componentes del vector de transferencia usado en la presente divulgación incluyen promotores de citomegalovirus, promotores de SV40, promotores de retrovirus, promotores de metalotioneína, promotores de proteína de choque térmico, promotores de CAG, promotores del factor de elongación 1α, promotores de actina, promotores de ubiquitina, promotores de albúmina y promotores de MHC.

Promotores aviares

Ejemplos del promotor aviar incluyen promotores de actina β, promotores de proteína de choque térmico, promotores del factor de elongación, promotores de ubiquitina y promotores de albúmina.

Promotores baculovirales

Ejemplos del promotor baculoviral que es uno de los componentes del vector de transferencia baculoviral usado en la presente divulgación incluyen promotor de poliedrina, promotor de p10, promotor de ie1, promotor de p35, promotor de vp39 y promotor de gp64.

Producción de un vector de transferencia recombinante

La presente divulgación se refiere a un nuevo vector de transferencia que tiene una estructura capaz de expresar el gen extraño inmunogénico deseado como una proteína antigénica tanto en células de insecto como en células de vertebrado, particularmente células de mamífero. El nuevo vector de transferencia producido en la presente invención tiene una estructura en la que una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de la proteína inmunogénica deseada y una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales están conectadas aguas abajo de promotores conectados que comprenden un promotor de vertebrado, particularmente un promotor de mamífero, y un promotor baculoviral. Las regiones de ADN que contienen las secuencias de ADN de los dos promotores, es decir, un promotor de vertebrado, particularmente un promotor de mamífero, y un promotor baculoviral, pueden estar conectadas directamente entre sí,

o puede estar presente una secuencia de ADN intercalada entre las secuencias de ADN de los dos promotores (siempre y cuando, sin embargo, los dos promotores tengan actividad promotora en células de insecto y en células de vertebrado, y particularmente células de mamífero). La región promotora tiene una estructura tal que cualquiera de un promotor de vertebrado, particularmente un promotor de mamífero, y un promotor baculoviral, conectados entre sí, puedan estar dispuestos más cercanamente al gen que se va a expresar. En los Ejemplos descritos posteriormente, un promotor baculoviral está dispuesto más cercanamente al gen que se va a expresar que un promotor de mamífero.

En la estructura anterior, la secuencia de ADN del gen de fusión de un gen que codifica una proteína capaz de ser un componente de partículas virales y un gen extraño inmunogénico deseado puede ser tal que estos dos genes estén conectados directamente entre sí, o una secuencia de ADN intercalada está presente entre los genes (con tal, sin embargo, de que es necesario que no provoque un desplazamiento del marco del gen aguas abajo y el gen aguas arriba). Preferiblemente, el dominio de presentación de antígeno de la proteína de un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada se fusiona a una proteína capaz de ser un componente de partículas virales. Por lo tanto, la proteína de un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada no se debe separar de la proteína capaz de ser un componente de partículas virales, sino que se debe usar en una forma fusionada con la misma.

Un gen de fusión que contiene estos dos genes se puede preparar por adelantado, y a continuación se puede incorporar en el vector. Alternativamente, uno de los genes se puede incorporar primero en el vector y a continuación el otro se puede incorporar en el vector para formar un gen de fusión en el vector.

Para producir tal vector de transferencia, se pueden usar vectores de expresión disponibles comercialmente que ya tienen algunos componentes esenciales del vector de transferencia usado en la presente invención, es decir, una región promotora que contiene un promotor de vertebrado, particularmente un promotor de mamífero, y un promotor baculoviral, y una región génica que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales, y los componentes requeridos se pueden insertar al escindir opcionalmente tal vector de expresión disponible comercialmente con enzimas de restricción e incorporar otro promotor para insertar una secuencia de ADN fusionada de un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada y un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales en la región de clonación del vector, o al insertar un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada en el lado del extremo N de la región de ADN de un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales, ya incorporado en un plásmido.

En la presente invención, el vector plasmídico que tiene una estructura capaz de expresar una proteína extraña que tiene la inmunogenicidad deseada como una proteína antigénica tanto en células de insecto como en células de vertebrado, particularmente células de mamífero, se puede producir al usar un plásmido disponible comercialmente que ya tiene una estructura parcial del mismo. La secuencia de aminoácidos de un péptido para escindir la proteína de fusión con enzimas en células de vertebrado se puede intercalar. En el vector de transferencia usado en la presente invención, un mejorador para incrementar la actividad de transcripción en células de vertebrado, particularmente células de mamífero, puede estar dispuesto aguas arriba de los dos promotores, o una secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de un péptido de señal para facilitar la secreción extracelular de la proteína expresada desde células hospedadoras puede estar unida al gen que se va a fusionar y expresar. Para terminar la transcripción, una región terminadora de vertebrado, tal como un terminador de globina β de conejo, que es eficaz en células de vertebrado, puede estar dispuesta aguas abajo del gen que se va a fusionar y expresar.

Se pueden producir de ese modo un vector de transferencia capaz de expresar un gen de fusión de un gen extraño inmunogénico capaz de expresar la inmunogenicidad deseada en partículas baculovirales y un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales.

Ejemplos específicos del vector de transferencia y el método para producir el mismo según la presente divulgación son como se muestran en los Ejemplos descritos posteriormente. Más específicamente, vectores de transferencia que tienen una estructura en la que se inserta un promotor de CAG modificado a partir de un promotor de citomegalovirus (CMV) como un promotor de vertebrado, particularmente un promotor de mamífero, y un promotor de poliedrina (polh), un promotor de vp39 o un promotor de gp64 como un promotor baculoviral, están conectados entre sí, y una secuencia de ADN fusionada de un gen de antígeno del virus de la gripe o un gen de antígeno de la malaria como un gen extraño y un gen de antígeno de gp64 como un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de la partícula viral se pueden mencionar como ejemplos de pCAP-PfCSP, pCAP-PfCSP/272, pCAP-PfCSP/467, pCAP-PfCSP(A361E), pCAP-PfCSP(A361E)/272, pCAP-PfCSP(A361E)/467, pCAP-PfCSP-76, pCAP-PfCSP-76/467, pCAP-PfCSP+209, pCAP-PfCSP+209/467, pCAP-PfCSP+76/209, pCAP-PfCSP+76/209/467, pCAP-HA1/Anhui, pCAP-HA1/Anhui/272, pCAP-HA1/Anhui/467, pCAP-HA1/Vietnam, pCAP-HA1/Vietnam/51, pCAP-HA1/Vietnam/101, pCAP-HA1/Vietnam/154, pCAP-HA1/Vietnam/201, pCAP-HA1/Vietnam/272, pCAP-HA1/Vietnam/467, pCAP-AH/345, pCAP-AH/345/467, pCAP-AH/410, pCAP-AH/410/467, pCAP-AH/473, pCAP-AH/473/467, pCAP-AH/520, pCAP-AH/520/467, pCAP-VN/346, pCAP-VN/346/467, pCAP-VN/410, pCAP-VN/410/467, pCAP-VN/473, pCAP-VN/473/467, pCAP-VN/520, pCAP-VN/520/467, pCAP-CO/full, pCAP-CO/full/467, pCAP-CO/19, pCAP-CO/19/467, pCAP-CO/76, pCAP-CO/76/467,

pCAP-CO/205, pCAP-CO/205/467, pCA39-HA1/Anhui, pCA64-HA1/Anhui, pCA39-PfCSP(A361E), pCA64-PfCSP(A361E), pCAP-CO/full/VSV, pCAP-CO/19/VSV, pCAP-CO/76/VSV, pCAP-CO/205/VSV, pDual-Pfs25-PfCSP-gp64 y pDual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

(2) Producción de un baculovirus recombinante

- 5 La presente divulgación proporciona un método para producir un baculovirus recombinante que comprende la etapa de producir un vector de transferencia que tiene una estructura en la que un gen de fusión que contiene al menos un gen que codifica una proteína capaz de ser un componente de la partícula viral y al menos un gen extraño inmunogénico se incorpora aguas abajo de un promotor doble que consiste en dos promotores conectados, es decir, un promotor de vertebrado y un promotor baculoviral, y la etapa de cotransfectar el vector de transferencia y un ADN baculoviral en una célula hospedadora y aislar el baculovirus recombinante.

En el procedimiento anterior para producir el baculovirus recombinante, el método para introducir el ADN recombinante (vector de transferencia) deseado en la célula hospedadora y el método de transformación por el mismo no están particularmente limitados. Se pueden usar diversos métodos que son muy conocidos y comúnmente usados en este campo. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de recombinación genética generales (p. ej., Science, 224, 1431 (1984); Biochem. Biophys. Res. Comm., 130, 692 (1985); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5990 (1983) para preparar el baculovirus recombinante. El ADN recombinante (vector de transferencia) se puede expresar y producir con referencia a Ohno y cols., "Tanpaku Jikken Protocol 1 Functional Analysis, Saibo Kogaku Bessatsu, Jikken Protocol Series, 1997, Shujun-sha". Los métodos generales usados para el manejo de células de insecto, la recombinación génica y la cotransfección pueden ser iguales que métodos bien conocidos para producir un virus recombinante en células de insecto (BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL, Oxford University Press, 1994).

El baculovirus recombinante resultante se puede cultivar según métodos estándar. Un producto de fusión (producto expresado) del ADN de un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada con el ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales usada en la presente invención se expresa y se produce (se acumula y se secreta) dentro, fuera o sobre la membrana celular de células de insecto mediante el cultivo del baculovirus.

Como un medio usado para el cultivo, se pueden usar selectivamente diversos medios usados comúnmente según la célula hospedadora usada. El cultivo se puede realizar bajo condiciones adecuadas para el crecimiento de la célula hospedadora.

Más específicamente, el método para producir el baculovirus recombinante comprende la etapa de preparar un ADN baculoviral que se va a someter a recombinación homóloga con un vector de transferencia producido anteriormente, y la etapa de cotransfectar el vector de transferencia y el ADN baculoviral en células de insecto, tales como células Sf9 y células Sf21 derivadas de *Spodoptera frugiperda*, y células Tn5 (células High Five) derivadas de *Trichoplusia ni*, como células hospedadoras.

El ADN baculoviral así producido para ser sometido a recombinación homóloga con el vector de transferencia puede ser un ADN baculoviral natural, mutante o recombinante. El ADN baculoviral puede mejorar la probabilidad de su recombinación homóloga con el vector de transferencia usado en la presente invención con tal de que tenga una estructura de ADN homóloga al ADN derivado de baculovirus que contiene el ADN de la región promotora doble, y ADN de un gen de fusión obtenido mediante la fusión de un gen extraño inmunogénico y un gen que codifica una proteína capaz de ser un componente de partículas virales.

Para inducir la recombinación homóloga, la relación de mezclado del vector de transferencia al ADN baculoviral en peso es preferiblemente de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1.

Después de la etapa de cotransfección de introducción simultánea en células de insecto, las células se cultivan y se obtienen calvas virales a partir del sobrenadante de cultivo y a continuación se suspenden en un medio. El virus se eluye de agar mediante turbulencia y se centrifuga para dar una solución que contiene el virus recombinante. En el procedimiento anterior, se pueden usar como el ADN baculoviral productos disponibles comercialmente. Por ejemplo, se pueden usar ADN BacVector-1000 y ADN BacVector-2000 (suministrados por Novagen) en los que el gen de poliedrina se ha retirado de AcNPV.

La cotransfección para la recombinación homóloga del vector de transferencia obtenido y ADN baculoviral en células de insecto se puede realizar usando un estuche de transfección de vectores disponible comercialmente (BacVector Transfection Kits, suministrados por Novagen) según se describe anteriormente según las instrucciones incluidas en el estuche de transfección de vectores. Así, el vector de transferencia obtenido se puede cotransfectar junto con el ADN baculoviral en células de insecto tales como una célula Sf9 para dar un baculovirus recombinante.

En la presente divulgación, según el método anterior para producir un baculovirus recombinante, un vector de transferencia que es uno cualquiera de pCAP-PfCSP, pCAP-PfCSP/272, pCAP-PfCSP/467, pCAP-PfCSP(A361E), pCAP-PfCSP(A361E)/272, pCAP-PfCSP(A361E)/467, pCAP-PfCSP-76, pCAP-PfCSP-76/467, pCAP-PfCSP+209, pCAP-PfCSP+209/467, pCAP-PfCSP+76/209, pCAP-PfCSP+76/209/467, pCAP-HA1/Anhui, pCAP-HA1/Anhui/272, pCAP-HA1/Anhui/467, pCAP-HA1/Vietnam, pCAP-HA1/Vietnam/51, pCAP-HA1/Vietnam/101, pCAP-HA1/Vietnam/154, pCAP-HA1/Vietnam/201, pCAP-HA1/Vietnam/272, pCAP-HA1/Vietnam/467, pCAP-AH/345, pCAP-AH/345/467, pCAP-AH/410, pCAP-AH/410/467, pCAP-AH/473, pCAP-AH/473/467, pCAP-AH/520, pCAP-AH/520/467, pCAP-VN/346, pCAP-VN/346/467, pCAP-VN/410, pCAP-VN/410/467, pCAP-VN/473, pCAP-VN/473/467, pCAP-VN/520, pCAP-VN/520/467, pCAP-CO/full, pCAP-CO/full/467, pCAP-CO/19, pCAP-CO/19/467, pCAP-CO/76, pCAP-CO/76/467, pCAP-CO/205, pCAP-CO/205/467, pCA39-HA1/Anhui, pCA64-HA1/Anhui, pCA39-PfCSP(A361E), pCA64-PfCSP(A361E), pCAP-CO/full/VSV, pCAP-CO/19/VSV, pCAP-CO/76/VSV, pCAP-CO/205/VSV, pDual-Pfs25-PfCSP-gp64 y pDual-PfMSP1-PfCSP-gp64 y un ADN baculoviral se pueden cotransfectar en células de insecto Sf9 para dar un baculovirus recombinante de uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

Además del método anterior para producir un baculovirus recombinante, otros métodos para producir un baculovirus recombinante incluyen, por ejemplo, un método para usar un transposón como un fagémido (bácmido) que tiene todo el genoma del baculovirus incorporado en el mismo para insertar eficazmente un gen extraño en *Escherichia coli*.

Según este método, un bácmido que soporta un gen viral se extrae de células bacterianas y se transfecta en células de insecto para de ese modo producir y recoger fácilmente un baculovirus recombinante.

La purificación del baculovirus recombinante de la presente divulgación obtenida mediante el método anterior para producir un baculovirus recombinante se puede realizar usando métodos de purificación de virus conocidos.

Para la purificación del baculovirus recombinante, por ejemplo, de 0,5 a 1,0 ml de un virus de reserva obtenido mediante el método anterior para producir un baculovirus recombinante se inoculan en células de insecto (1×10^7 células/cápsula de 10 cm), tales como células Sf9, el sobrenadante de cultivo se recoge varios días después de la infección, y una pella de virus obtenida mediante centrifugación se suspende en un tampón, tal como PBS. La suspensión resultante se somete a un gradiente de sacarosa de 10 a 60% y a continuación se centrifuga (25.000 rpm, 60 minutos, 4°C) para recoger una banda de virus. El virus recogido se suspende adicionalmente en PBS, posteriormente se centrifuga (bajo las mismas condiciones que anteriormente), y la pella de virus recombinante purificado resultante se almacena a 4°C en un tampón, tal como PBS.

El título de infectividad del virus recombinante purificado resultante anterior se puede medir mediante un ensayo de calvas (BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL, Oxford University Press, 1994) usando células de insecto tales como células Sf9.

En los virus recombinantes descritos en los Ejemplos, el extremo N de la proteína baculoviral gp64 está expuesto fuera de la partícula, mientras que el extremo C de la misma está dentro de la partícula. Por lo tanto, si la proteína codificada por un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada se fusiona al extremo N de gp64, la entidad de la misma se expone como un componente de la partícula viral fuera de la partícula proteínica viral en células de insecto, y así el antígeno se presenta más fácilmente, lo que es adecuado para el uso como la formulación vacunal de la presente invención.

(3) Composición farmacéutica de la presente invención (producto farmacéutico que contiene el baculovirus recombinante de la presente invención como un principio activo)

El baculovirus recombinante usado en la presente invención, que es un principio activo de la composición farmacéutica de la presente invención, se puede obtener mediante las técnicas de genomaniplulación mostradas en el (2) anterior.

La composición farmacéutica de la presente invención contiene esencialmente como el principio activo un baculovirus recombinante obtenido mediante la recombinación homóloga de un ADN baculoviral y un vector de transferencia construido de modo que un gen de fusión obtenido mediante la fusión de un gen extraño inmunogénico usado en la presente invención a un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de la partícula viral se pueda expresar en células de insecto y células de vertebrado, particularmente células de mamíferos, incluyendo seres humanos.

La presente divulgación proporciona particularmente una composición farmacéutica que comprende como un principio activo un baculovirus recombinante específico que es uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

El baculovirus recombinante de la presente divulgación que es uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64, usado como un principio activo de la composición farmacéutica de la presente divulgación, tiene la acción de mejorar los efectos preventivos de la infección contra un antígeno infeccioso y reducir el título de infectividad. Utilizando esta acción y actividad, el baculovirus recombinante se puede usar para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección de células y tejidos diana. Ejemplos de células diana afectadas por tal infección incluyen células sanguíneas, células hepáticas, células renales, células cerebrales, células pulmonares, células epiteliales y células musculares. Ejemplos de tejidos que comprenden tales células incluyen el pulmón, el hígado, el riñón, el cerebro, las arterias y las venas, el estómago, los intestinos, la uretra, la piel y el músculo.

La composición farmacéutica mejora los efectos preventivos de la infección contra antígenos infecciosos, por ejemplo, antígenos de malaria tales como antígenos superficiales de esporozoítos (CSP y TRAP) de parásitos de malaria, proteína membranaria superficial de merozoítos MSP1, antígeno S de malaria secretado de eritrocitos infectados con malaria, proteína PfEMP1 presente en los nudos de eritrocitos infectados con malaria, proteína SERA, proteína TRAMP, proteína AMA1 y Pfs25 conocido como un antígeno de bloqueo de la transmisión; y antígenos de la gripe tales como antígeno de HA, antígeno de NA, antígeno de M2 y antígeno de NP, y reduce el título de infectividad (p. ej., título de infectividad viral), incrementando de ese modo el período de supervivencia y el grado de supervivencia de mamíferos incluyendo seres humanos, en comparación con el grupo al que no se administra la composición farmacéutica de la presente divulgación. Por lo tanto, la composición farmacéutica es particularmente útil como un agente preventivo o terapéutico para infecciones por malaria y virus de la gripe.

La composición farmacéutica de la invención tiene la acción de mejorar los efectos preventivos de la infección contra antígenos infecciosos y reducir los títulos de infectividad, y por lo tanto es útil como un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas provocadas por patógenos tales como malaria, y complicaciones de las mismas.

Al usar un gen inmunogénico para vertebrados no humanos como un gen extraño inmunogénico del vector de transferencia para obtener un baculovirus recombinante usado como un principio activo de la composición farmacéutica de la presente divulgación, por ejemplo, se puede preparar una vacuna para la gripe del pollo, que

tiene la acción de mejorar los efectos preventivos de la infección contra el antígeno infeccioso y reducir el título de infectividad. Al utilizar esta acción y actividad, la composición farmacéutica se puede usar para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección de células y tejidos diana.

- 5 La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar como una composición que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del baculovirus recombinante usado en la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 10 El efecto preventivo de la infección del baculovirus recombinante usado en la presente invención en vertebrados, particularmente mamíferos, incluyendo seres humanos, o células de mamífero se puede proporcionar, por ejemplo, al administrar la composición farmacéutica que contiene el baculovirus recombinante usado en la presente invención y aditivos para la administración farmacéutica a vertebrados, particularmente mamíferos, incluyendo seres humanos, mediante la vía intramuscular, subcutánea, intracutánea, intraperitoneal, nasal o respiratoria, y a continuación inmunizar los vertebrados con la composición farmacéutica que contiene el baculovirus recombinante usado en la presente invención como un principio activo varias veces. La administración respiratoria de la composición farmacéutica de la invención es particularmente preferible.

- 20 El efecto preventivo de la infección se puede evaluar al comparar el grado de supervivencia de vertebrados, particularmente mamíferos, incluyendo seres humanos, que han sido inmunizados con la composición farmacéutica de la invención varias veces y a continuación infectados con un patógeno diana con el grado de supervivencia de aquellos a los que no se ha administrado la composición farmacéutica.

(4) Vacuna de la presente invención

- 25 El baculovirus recombinante que es uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64 usado como el principio activo de la composición farmacéutica de la presente divulgación puede mejorar los efectos preventivos de la infección por patógenos según se describe en los Ejemplos posteriores, y un producto de fusión expresado de la secuencia de ADN obtenido mediante la fusión de un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de una proteína capaz de ser un componente de partículas virales y un gen extraño con la inmunogenicidad deseada de la presente divulgación capaz de reducir el título de infectividad se produce como partículas virales brotadas de células de insecto. Cuando la composición farmacéutica de la invención se administra en la forma de partículas virales a vertebrados, particularmente mamíferos, incluyendo seres humanos, una proteína antigénica extraña contenida como un componente de partículas virales promueve la inmunidad adquirida (inmunidad humoral e inmunidad celular) y, además, la proteína antigénica como un producto expresado de la secuencia de ADN parece promover la inmunidad adquirida (inmunidad humoral e inmunidad celular) en células de vertebrado, particularmente células de mamíferos, incluyendo seres humanos. Así, el baculovirus recombinante usado en la presente invención es útil como una vacuna.

- 50 La presente divulgación proporciona particularmente una vacuna que contiene como un principio activo un baculovirus recombinante específico que es uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV,

AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

Como en la composición farmacéutica del (3) anterior, la vacuna mejora efectos preventivos de la infección contra antígenos infecciosos tales como antígeno de malaria tales como antígenos superficiales de esporozoítos (CSP y TRAP) del parásito de la malaria, proteína membranaria superficial de merozoítos MSP1, antígeno S de malaria secretado de eritrocitos infectados con malaria, proteína PfEMP1 presente en los nudos de eritrocitos infectados con malaria, proteína SERA, proteína TRAMP y proteína AMA1; y antígenos de la gripe tales como antígeno de HA del virus de la gripe, antígeno de NA del virus de la gripe, antígeno de M2 del virus de la gripe y antígeno de NP del virus de la gripe; la vacuna también reduce el título de infectividad (p. ej., el título de infectividad viral), incrementando de ese modo el período de supervivencia y el grado de supervivencia de mamíferos, incluyendo seres humanos, en comparación con el grupo al que no se administra la composición farmacéutica de la presente divulgación. Así, la vacuna es particularmente útil como un agente preventivo o terapéutico para la infección por malaria y virus de la gripe.

La vacuna de la divulgación mejora los efectos preventivos de la infección contra antígenos infecciosos y reduce el título de infectividad, y por lo tanto es útil como un agente preventivo o terapéutico para enfermedades infecciosas provocadas por patógenos tales como virus de la gripe y malaria, y complicaciones de las mismas.

Al usar un gen inmunogénico para vertebrados no humanos como un gen extraño inmunogénico del vector de transferencia para obtener un baculovirus recombinante usado como un principio activo de la composición farmacéutica de la presente divulgación, por ejemplo, se puede preparar una vacuna para la gripe del pollo, que puede mejorar los efectos preventivos de la infección contra el antígeno infeccioso y reducir el título de infectividad. Al utilizar esta actividad, la vacuna se puede usar para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección de células y tejidos diana.

El baculovirus recombinante que es uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64, usado como un principio activo de la vacuna de la presente divulgación, puede mejorar los efectos preventivos de la infección contra un antígeno infeccioso y reducir el título de infectividad.

Al utilizar esta actividad, el baculovirus recombinante se puede usar para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección de células y tejidos diana.

Ejemplos de células diana afectadas por tal infección incluyen células sanguíneas, células hepáticas, células renales, células cerebrales, células pulmonares, células epiteliales y células musculares. Ejemplos de tejidos que contienen tales células incluyen los tejidos del pulmón, el hígado, el riñón, el cerebro, los vasos arteriales y venosos, el estómago, el intestino, la uretra, la piel y el músculo.

La vacuna de la presente divulgación se puede preparar como una composición farmacéutica del (3) anterior que contiene una cantidad farmacéuticamente eficaz del baculovirus recombinante de la divulgación (uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-

CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64), y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La vacuna se puede preparar en la forma de una composición farmacéutica al usar un vehículo farmacéuticamente aceptable como el usado en la composición farmacéutica del (3) anterior, según un método estándar. Ejemplos de vehículos incluyen soluciones fisiológicamente aceptables, tales como solución salina estéril y solución salina tamponada estéril.

La vacuna (la formulación es posteriormente en la presente igual que en la composición farmacéutica) se puede preparar como una formulación liposómica que contiene como un principio activo el baculovirus recombinante de la divulgación (uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64), y se puede usar en combinación con un adyuvante.

Ejemplos específicos de la vacuna (la composición farmacéutica) de la presente invención incluyen formulaciones liposómicas. La formulación liposómica puede ser una en la que el baculovirus recombinante usado en la presente invención es retenido en un liposoma que contiene un fosfolípido ácido como un componente membranario, o que contiene un fosfolípido neutro y un fosfolípido ácido como componentes membranarios.

El fosfolípido ácido y el fosfolípido neutro usados como componentes membranarios no están particularmente limitados, y diversos lípidos usados comúnmente para formulaciones liposómicas se pueden usar solos o en una combinación de dos o más.

La membrana liposómica se produce según un método estándar al usar un fosfolípido ácido solo o junto con un fosfolípido neutro. Cuando se usa un fosfolípido ácido junto con un fosfolípido neutro, la proporción de los fosfolípidos ácidos en los componentes de la membrana liposómica es preferiblemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 100% en moles, más preferiblemente de 1 a 90% en moles y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 50% en moles.

Para preparar el liposoma, por ejemplo, se puede añadir colesterol o similares. Esto puede controlar la fluidez de los fosfolípidos y facilita la preparación del liposoma. En general, el colesterol se añade al fosfolípido preferiblemente en una cantidad equivalente o menos, y preferiblemente en una cantidad de 0,5 veces con respecto a una cantidad en peso equivalente.

La relación de mezcla del fosfolípido ácido al principio activo en la formulación liposómica es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 100 equivalentes, preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 60 equivalentes, y más preferiblemente de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 20 equivalentes.

El baculovirus recombinante usado en la presente invención como un principio activo se usa en una cantidad de varios % en moles a varias decenas de % en moles, preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 10% en moles, y habitualmente alrededor de 5% en moles, basado en la cantidad total de los lípidos.

La producción, la concentración y el control del diámetro de partícula de la formulación liposómica se pueden realizar según métodos estándar. Si se desea, los diversos aditivos que se describen anteriormente también se pueden incorporar en la formulación liposómica.

Para producir la formulación liposómica, el baculovirus recombinante usado en la invención como un principio activo se puede usar en una forma que está unida a un ácido graso (p. ej., ácido behénico, ácido esteárico, ácido palmítico, ácido mirístico y ácido oleico), un grupo alquilo, un grupo colesterilo o similares. La formulación liposómica que contiene tales componentes unidos también se puede producir según un método estándar (véase, por ejemplo, Long Circulating Liposomes: Old Drugs, New Therapeutics., M. C. Woodle, G. Storm, Eds: Springer-Verlag Berlin (1998)).

La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se puede usar preferiblemente como una composición vacunal. La vacuna se usa preferiblemente en combinación con una cantidad farmacéuticamente eficaz de un adyuvante para mejorar los efectos contra la infección (antipalúdicos).

Cualquier adyuvante usado comúnmente para este tipo de vacuna se puede usar como el adyuvante. Ejemplos de tales adyuvantes incluyen adyuvante completo de Freund, dipéptido muramílico, hidróxido de aluminio, BCG, IL-12, N-acetilmuramino-L-alanil-D-isoglutamina (MDP), timosina $\alpha 1$ y QS-21. La cantidad de adyuvante usada se puede seleccionar adecuadamente según el grado de los síntomas, tales como reblandecimiento de la piel, dolor, eritema, fiebre, cefalea y dolor muscular, que se podría expresar como parte de la respuesta inmunitaria en seres humanos o animales después de la administración de este tipo de vacuna.

La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se puede usar en combinación con otros productos farmacéuticos conocidos públicamente, tales como péptidos promotores de la respuesta inmunitaria y agentes antibacterianos (agentes antibacterianos sintéticos).

La vacuna (composición farmacéutica) puede contener además otros fármacos y aditivos. Ejemplos de los mismos incluyen fármacos que ayudan a la absorción intracelular del baculovirus recombinante usado en la presente invención, tales como iones de calcio. También se pueden usar el liposoma y otros fármacos y aditivos que facilitan la transfección, tales como emulsionantes fluorocarbonados, cocleatos, túbulos, partículas de oro, microesferas biodegradables y polímeros catiónicos.

La cantidad del principio activo contenido en la vacuna (composición farmacéutica) (fármaco) de la presente invención no está particularmente limitada y se puede seleccionar de un amplio intervalo con tal de que sea una cantidad farmacéuticamente eficaz. La dosificación de la vacuna (composición farmacéutica) no está particularmente limitada, y se puede seleccionar apropiadamente de un amplio intervalo según el efecto terapéutico deseado, el método de administración (vía de administración), el período terapéutico, la edad, el sexo y otras condiciones del paciente, etc.

Cuando el baculovirus recombinante como un principio activo de la vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se administra a un ser humano, el baculovirus recombinante se administra en una cantidad correspondiente a de 10^2 a 10^{14} UFP, preferiblemente de 10^5 a 10^{12} UFP y más preferiblemente de 10^6 a 10^{10} UFP por paciente, calculadas como las UFP del virus recombinante.

La dosificación del baculovirus recombinante (uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64), usado como un principio activo de la vacuna (composición farmacéutica) de la presente divulgación, se puede seleccionar de un intervalo muy amplio, en lo relativo a la cantidad de ADN expresable introducido en el hospedador de la vacuna o la cantidad de ARN transcrito. Estas cantidades también dependen de la intensidad de los promotores de la transcripción y la traducción usados en el vector de transferencia de la divulgación.

La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se administra al inyectar directamente una suspensión de baculovirus recombinante preparada al suspender el baculovirus recombinante en PBS (solución salina tamponada con fosfato) o solución salina en un punto local (p. ej., en el tejido pulmonar, el hígado, el músculo o el cerebro), o mediante inhalación nasal o respiratoria, o mediante administración intravascular (p. ej., intraarterial, intravenosa y venosa portal), subcutánea, intracutánea o intraperitoneal. La vacuna de la invención se administra preferiblemente mediante inhalación respiratoria.

La vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención se administra preferiblemente más de una vez. Más específicamente, después de la administración inicial, se realizan preferiblemente vacunaciones adicionales de una vez a varias veces mientras se observa la afección. Esto puede mejorar el efecto deseado. Después de la administración de la vacuna (composición farmacéutica), se puede realizar una inmunización de refuerzo con una composición farmacéutica que contiene el baculovirus recombinante de la presente divulgación (uno cualquiera de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-

CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64). Además, el uso de varios otros fármacos con la vacuna de la invención, según se menciona anteriormente, puede mejorar el efecto terapéutico alcanzado por la administración de la vacuna (composición farmacéutica).

En una realización de la vacuna (composición farmacéutica) de la presente invención, el baculovirus recombinante, usado como uno de los principio activos de la vacuna (composición farmacéutica) de la invención, se prepara generalmente mediante la recombinación homóloga de un ADN baculoviral y un vector de transferencia en el que se ha introducido un gen de fusión obtenido mediante la fusión de un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada y un gen que codifica una proteína capaz de ser un componente de partículas virales. El baculovirus recombinante se mezcla, en una forma de dosificación inyectable (una solución, suspensión o emulsión), con un vehículo farmacéuticamente aceptable (es decir, atóxico para seres humanos y otros vertebrados en la dosificación y la concentración usadas, y compatible con otros ingredientes de la formulación) para producir una formulación. Preferiblemente, la formulación así obtenida no contiene agentes oxidantes ni ningún otro compuesto que se sepa públicamente que sea perjudicial para el baculovirus recombinante.

El vehículo puede contener una cantidad traza de aditivos, tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y la estabilidad química. Tales aditivos son atóxicos para los mamíferos, incluyendo seres humanos, en la dosificación y la concentración usadas, y ejemplos de los mismos incluyen tampones tales como ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético y otros ácidos orgánicos, y sales de los mismos; antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (p. ej., menos de aproximadamente 10 residuos) (p. ej., poliarginina y tripeptido), proteínas (p. ej., albúmina de suero, gelatina e inmunoglobulina); aminoácidos (p. ej., glicina, ácido glutámico, ácido aspártico y arginina); monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos (p. ej., celulosa y derivados de la misma, glucosa, manosa y dextrina), agentes quelantes (p. ej., EDTA); alcoholes sacáricos (p. ej., manitol y sorbitol); iones conjugados (p. ej., sodio); tensioactivos no iónicos (p. ej., polisorbato y poloxámero); y PEG.

La vacuna (composición) farmacéutica que contiene el baculovirus recombinante se puede almacenar típicamente como una solución acuosa o un producto liofilizado en un recipiente de dosis unitaria o múltiples dosis tal como una ampolla sellada o un vial.

La presente divulgación proporciona además un método para prevenir la infección por malaria o gripe o un método para tratar la malaria o la gripe, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del baculovirus recombinante, la vacuna, la formulación y la composición farmacéutica de la divulgación. La presente divulgación proporciona además un método de inmunoestimulación que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz del baculovirus recombinante, la vacuna, la formulación y la composición farmacéutica de la divulgación. Ejemplos de los sujetos usados incluyen los que pueden ser infectados con parásitos de malaria o virus de la gripe, tales como seres humanos y otros animales (tales como mamíferos, aves, reptiles, peces y anfibios), y los infectados con parásitos de malaria o virus de la gripe. El virus de la gripe con el que se infecta el sujeto es preferiblemente un virus de la gripe A, y más preferiblemente un virus de la gripe A subtipo H1 o un virus de la gripe A subtipo H3. Ejemplos de parásitos de la malaria incluyen *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* y *Plasmodium ovale*.

El baculovirus recombinante de la presente divulgación se forma solo o junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable como una vacuna, una formulación o una composición farmacéutica, y se administra al sujeto.

La vía de administración puede ser, por ejemplo, cualquier vía de administración mencionada anteriormente. El vehículo farmacéuticamente aceptable para el uso en la presente invención se puede seleccionar adecuadamente de portadores usados comúnmente en este campo técnico, según la forma de la composición farmacéutica que se va a producir.

Por ejemplo, cuando la composición farmacológica se forma como una solución acuosa, se puede usar como el vehículo agua purificada (agua estéril) o una solución tamponadora fisiológica. Cuando la composición farmacéutica se forma como otras soluciones apropiadas, se pueden usar como el vehículo ésteres orgánicos capaces de ser inyectados, tales como glicol, glicerol y aceite de oliva. La composición puede contener estabilizantes, excipientes y similares comúnmente usados en este campo técnico, y particularmente en el campo de las formulaciones vacunales.

La cantidad de baculovirus recombinante en la vacuna, la formulación o la composición farmacéutica de la presente invención no está particularmente limitada, y se puede seleccionar adecuadamente de un amplio intervalo. En general, la cantidad de baculovirus recombinante en la composición es preferiblemente de aproximadamente 0,0002 a aproximadamente 0,2 (% p/v) y más preferiblemente de 0,001 a 0,1 (% p/v). El método de administración del baculovirus recombinante, la vacuna, la formulación o la composición farmacéutica de la invención no está particularmente limitado y se puede seleccionar adecuadamente según la forma de dosificación, la edad, el sexo y otras condiciones del paciente, la gravedad de la enfermedad, etc. Una forma de dosificación preferible de los mismos es una forma para administración parenteral, tal como inyecciones, gotas, gotas nasales e inhalaciones. Cuando la composición se forma como una inyección o gotas, la inyección se puede administrar intravenosamente según se mezcla con un fluido reconstitutivo tal como una solución de glucosa o una solución de aminoácido según se requiera, o se puede administrar intramuscularmente, intracutáneamente, subcutáneamente o intraperitonealmente.

La dosificación diaria del baculovirus recombinante, la vacuna, la formulación o la composición farmacéutica de la presente invención puede variar dependiendo de la condición, el peso corporal, la edad, el sexo del sujeto, etc., y por lo tanto no se puede especificar completamente. Sin embargo, la dosificación es habitualmente tal que el baculovirus recombinante se administra en una cantidad de 0,001 a 100 mg por kg de peso corporal al día. La vacuna, la formulación o la composición de la invención se puede administrar en una o más administraciones al día.

Cuando se administra el baculovirus recombinante como un principio activo de la vacuna (formulación o composición farmacéutica) de la presente invención, el baculovirus recombinante se administra en una cantidad correspondiente a de 10^2 a 10^{14} UFP, preferiblemente de 10^5 a 10^{12} UFP y más preferiblemente de 10^6 a 10^{10} UFP por paciente, calculada como las UFP del virus recombinante.

La vacuna (composición) de la presente invención se administra según las prácticas médicas correctas, considerando la afección clínica (por ejemplo, la afección que se va a prevenir o tratar) de cada paciente, el punto de aporte de la vacuna (composición) que contiene el baculovirus recombinante, el tejido elegido, el método de administración, el régimen de dosificación y otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, la dosificación apropiada de la vacuna (composición) de la presente se determina teniendo en cuenta lo anterior.

Ejemplos

La presente invención se describirá posteriormente con más detalle con referencia a los Ejemplos. Estos Ejemplos son meramente ejemplos de la presente invención, y no limitan la presente invención.

Ejemplo 1: Plásmido vectorial de transferencia y método para la producción del mismo de la presente invención

(1) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCAP-PfCSP, pCAP-PfCSP/272 y pCAP-PfCSP/467

(1.1) Construcción del plásmido pBACsurf-Hsp65

Se obtuvo un gen Hsp65 al extraer ADN genómico de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* usando un QIAamp ADN Midi Kit (Qiagen), y clonando mediante PCR. Más específicamente, el ADN genómico extraído de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se amplificó mediante PCR usando los cebadores phsp65-F1 (5'-AATAATAGATCTAATGGCCAAGACAATTGCGTACGACGAAGA -3' (SEQ ID NO: 1); el sitio BglII está subrayado) y phsp65-R1 (5'-AATCCAATGCGGCCGCGGGAATTCTGATTCTGCGAGTCCAGAAATCCATGCCACCCATGTGCGCC -3' (SEQ ID NO: 2); el sitio NotI está subrayado). El producto de PCR se purificó, se escindió con las enzimas de restricción BglII y NotI, se ligó a pcADN3.1(+) (de Invitrogen) digerido con BamHI y NotI. El plásmido resultante se denominó pcADN-hsp65. Se realizó PCR con pcADN-hsp65 como una plantilla usando los cebadores phsp65-F2 (5'-CACCCCTGCAGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGAATTCATGGCCAAGAC AATTGCGTACGACGAAGAGGCC -3' (SEQ ID NO: 3); los sitios Sse8387I y EcoRI están subrayados, y la secuencia FLAG está en cursiva) y phsp65-R2 (5'-CCCGGGCGAAATCCATGCCACCCATGTGCGCGCCACC -3' (SEQ ID NO: 4); el sitio Cfr9I está subrayado). El fragmento de ADN del gen Hsp65 resultante se clonó en pENTR/D-TOPO (de Invitrogen), a continuación se escindió con Sse8387I/Cfr9I y se insertó en el sitio PstI/Cfr9I de pBACsurf-CSP (Yoshida y cols., Virology 316: 161-70, 2003). El plásmido así construido se denominó pBACsurf-Hsp65.

(1.2) Construcción del plásmido pENTR-gp64

Se realizó PCR con pBACsurf-1 (de Novagen) como una plantilla usando los cebadores pPolh-F2 (5' -CACCCGGACCGGATAATTAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAG -3' (SEQ ID NO: 5); el sitio RsrII está subrayado) y ppg64-R2 (5' -GGTACCATATTGTCTATTACGGTTTCTAATCATAC -3' (SEQ ID NO: 6); el sitio KpnI está subrayado). El fragmento de ADN del gen de gp64 resultante se insertó en pENTR/D-TOPO para construir un plásmido pENTR-gp64. El plásmido así construido se denominó pENTR-gp64.

(1.3) Construcción del vector de transferencia pDual-Hsp65-gp64

Se escindió pBACsurf-Hsp65 con PstI/Cfr9I, y el fragmento de ADN del gen hsp65 se insertó en el sitio PstI/Cfr9I de pENTR-gp64 para construir un plásmido pENTR-Hsp65-gp64. El pENTR-Hsp65-gp64 se escindió con RsrII/KpnI, y un fragmento de ADN que consistía en un promotor de poliedrina y un gen hsp65-gp64 se insertó en pTriEx-3.1 (Novagen) escindido con RsrII y KpnI para construir un plásmido vectorial de transferencia pDual-Hsp65-gp64 que permitía la expresión de una proteína de fusión de antígeno de Hsp65 y proteína gp64 en células de mamífero e insecto bajo el control del promotor doble deseado que consistía en promotor de CMA y promotor de poliedrina.

(1.4) Construcción del vector de transferencia pDual-H1N1/HA1-gp64

Se extrajo ARN de un sobrenadante de cultivo de células MDCK infectadas con cepa PR/8/34 del virus de la gripe usando un QIAamp MinElute Virus Spin Kit (de Qiagen), y se amplificó mediante RT-PCR usando los cebadores HA-f (5' - CCTGCAGGTATGAAGGCAAACCTACTGGTC - 3' (SEQ ID NO: 7); el sitio SbfI está subrayado) y HA-r (5' - GCCCCGGGCGATGCATATTCTGCA - 3 (SEQ ID NO: 8); el sitio SbfI está subrayado). El fragmento del gen de HA del virus de la gripe resultante se clonó en pCR-Blunt II-TOPO (de Invitrogen). El plásmido resultante se denominó pCR-Blunt-HA. Se realizó PCR con el pCR-Blunt-HA como una plantilla usando los cebadores pHA-F1 (5' - CACCGAATTCCGACACAATATGTATAGGCTACCATGCG-3' (SEQ ID NO: 9); el sitio EcoRI está subrayado) y pHA-R1 (5' - CCCGGGCACCTCTGGATTGGATGGACGGAATG - 3' (SEQ ID NO: 10); el sitio Cfr9I está subrayado). El fragmento de ADN del gen H1N1/HA1 resultante se clonó en pENTR/D-TOPO, a continuación se escindió con EcoRI/Cfr9I y se insertó en el sitio EcoRI/Cfr9I de pDual-Hsp65-gp64 para construir un plásmido pDual-H1N1/HA1-gp64.

(1.5) Construcción del plásmido pBACsurf-HA1

Se escindió pDual-H1N1/HA1-gp64 con EcoRI/CfrI y el fragmento de ADN del gen H1N1/HA1 se insertó en pBACsurf-Hsp65 digerido con EcoRI y CfrI para construir un plásmido pBACsurf-HA1.

(1.6) Construcción del plásmido pCP-H1N1/HA1-gp64

Se realizó PCR con pBACsurf-HA1 como una plantilla usando Polh-f RsrII (5' - GGGCGGACCGGATAATTAATGATAACCATCTCG - 3' (SEQ ID NO: 11); el sitio RsrII está subrayado) y GP64-r DralII (5' - GGGCACTTAGTGATATTGTCTATTACGGTTTCTAATC - 3' (SEQ ID NO: 12); el sitio DralII está subrayado). El fragmento de ADN resultante se insertó en pDual-H1N1/HA1-gp64 digerido con RsrII y DralII para dar pCP-H1N1/HA1-gp64.

(1.7) Construcción del plásmido pCAP-H1N1/HA1-gp64

Se escindió pCP-H1N1/HA1-gp64 con las enzimas de restricción RsrII y DralII para preparar los fragmentos génicos HA1 y gp64. Los fragmentos se insertaron en un vector preparado al digerir pTriEx-1.1 (de Novagen) con las enzimas de restricción RsrII y DralII para dar un plásmido vectorial de transferencia pCAP-H1N1/HA1-gp64 que permite la expresión de una proteína de fusión del antígeno de HA1 y la proteína gp64 en células de mamífero e insecto bajo el control del promotor doble deseado que consiste en el promotor de CAG y el promotor de poliedrina.

(1.8) Construcción del plásmido pCAP-H1N1/NP-gp64

Se realizó RT-PCR con ARN genómico de cepa PR/8/34 del virus de la gripe como una plantilla usando NP-f EcoRI (5'-ACGGAATTCATTCAATTCAAACCTGGA - 3' (SEQ ID NO: 13); el sitio EcoRI está subrayado) y NP-r Cfr9I (5'. GATCCCGGGCCTTGTCAATGCTGAATGGCAA - 3' (SEQ ID NO: 14); el sitio Cfr9I está subrayado). Los fragmentos obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I, y se insertaron en pCAP-H1N1/HA1-gp64 digerido con las enzimas de restricción EcoRI y Cfr9I para dar pCAP-H1N1/NP-gp64.

(1.9) Construcción de los plásmidos pCAP-H1N1/NP/272 y pCAP-H1N1/NP/467

Se realizó PCR usando gp64(272)-f (5' - GACTCCCCGGGTCGAGCACCGAGTCAAGAAG - 3' (SEQ ID NO: 15); el sitio XmaI está subrayado), gp64(467)-f (5'-GACTCCCCGGGACATCACTTCCATGGCTGAA-3' (SEQ ID NO: 16); el sitio XmaI está subrayado) y GP64-r DralII (5'-GGGCACTTAGTGATATTGTCTATTACGGTTTCTAATC-3' (SEQ ID NO: 12); el sitio DralII está subrayado) de pCAP-H1N1/HA1-gp64. Los fragmentos obtenidos se digirieron con las enzimas de restricción XmaI y DralII y se insertaron en pCAP-H1N1/NP-gp64 digerido con XmaI y DralII para dar pCAP-H1N1/NP/272 y pCAP-H1N1/NP/467.

(1.10) Construcción de los vectores de transferencia pCAP-PfCSP, cCAP-PfCSP/272 y pCAP-PfCSP/467

Se extrajo ADN genómico de *P. falciparum* de eritrocitos humanos infectados con cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* usando un QIAamp ADN Midi Kit (de Qiagen). Un gen PfCSP se clonó mediante PCR con este ADN genómico como una plantilla según el siguiente método. La PCR se realizó usando los cebadores PfCSP-f(19) (5' - GACTCTGCAGTTATTCCAGGAATACCAAGTGTATGGAAG - 3' (SEQ ID NO: 17); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP-r(373) (5'-CGATCCCGGGCTTTTCCATTTTACAAATTTTTTTTCAATATC - 3' (SEQ ID NO: 18); el sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN resultante se insertó en pCAP-H1N1/NP-gp64, pCAP-H1N1/NP/272 y pCAP-H1N1/NP/467, cada uno digerido con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-PfCSP, pCAP-PfCSP/272 y pCAP-PfCSP/467.

El número de registro del GenBank de la secuencia de aminoácidos de la proteína de circumesporozoítos (CS) de *Plasmodium falciparum* 3D7 es XP_001351122.

(2) Construcción del vector de transferencia pDual-Pfs25-PfCSP-gp64

(2.1) Construcción del plásmido pDual-PbAMA1D123-gp64

Se recogió una muestra de sangre de un ratón BALB/c infectado con la cepa ANKA del parásito de la malaria *P. berghei*, y se extrajo ADN genómico de *P. berghei* usando un QIAamp ADN Midi Kit (Qiagen). Un dominio 123 (D123) del gen PbAMA1 se clonó mediante PCR con este ADN genómico como una plantilla según el siguiente método. Se realizó PCR usando los cebadores pAMA-F1 (5' - CACCGAATTCAATCCATGGGAAAAGTATACGGAATAATAT - 3' (SEQ ID NO: 19); el sitio EcoRI está subrayado) y pAMA1-R1 (5' - CCCGGGCTTCTCTGGTTTGATGGGCTTTCATATGCAC - 3' (SEQ ID NO: 20); el sitio Cfr9I está subrayado). El fragmento de ADN PbAMA1D123 resultante se clonó en pENTR/D-TOPO, a continuación se escindió con EcoRI/Cfr9I y se insertó en pBACsurf-Hsp65 digerido con EcoRI y Cfr9I. El plásmido construido se denominó pBACsurf-PbAMA1D123.

Posteriormente, el pBACsurf-PbAMA1D123 se escindió con EcoRI/Cfr9I, y el fragmento de ADN del gen PbAMA1D123 se insertó en pDual-Hsp65-gp64 digerido con EcoRI y Cfr9I para dar un plásmido pDual-PbAMA1D123-gp64.

(2.2) Construcción del plásmido pDual-PfCSP-gp64

Un gen PfCSP se clonó mediante PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla según el siguiente método. La PCR se realizó usando los cebadores pPfCSP-F1 (5' - CACCGAATTCTTATTCCAGGAATACCAAGTGTATGGAAGT-3' (SEQ ID NO: 21); el sitio EcoRI está subrayado) y pPfCSP-R1 (5'-CCCGGGCTTTTCCATTTTACAAATTTTTTTTTC-3' (SEQ ID NO: 22); el sitio Cfr9I está subrayado). El fragmento de ADN de PfCSP resultante se clonó en pENTR/D-TOPO, a continuación se escindió con EcoRI/Cfr9I y se insertó en pDual-PbAMA1D123-gp64 digerido con EcoRI y Cfr9I. El plásmido construido se denominó pDual-PfCSP-gp64.

(2.3) Construcción del vector de transferencia pDual-Pfs25-PfCSP-gp64

Un gen Pfs25 se clonó mediante PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla según el siguiente método. La PCR se realizó usando los cebadores pPfs25-F1 (5' - CACCGAATTCAAAGTTACCGTGGATACTGTATGCAAAAAGAGGA - 3' (SEQ ID NO: 23); el sitio EcoRI está subrayado) y pPfs25-R2 (5' - CAATTGAGATCCGCCGCCACCGCCACCAAGTACATATAGAGCTTTCATTATCTATTATAAATCCAT C - 3' (SEQ ID NO: 24); el sitio MunI está subrayado). El fragmento de ADN de Pfs25 resultante se clonó en pENTR/D-TOPO, a continuación se escindió con EcoRI/MunI y se insertó en pDual-PfCSP-gp64 digerido con EcoRI. El plásmido construido se denominó pDual-Pfs25-PfCSP-gp64.

(3) Construcción del plásmido de transferencia pDual-PfMSP1-PfCSP-gp64

Un gen PfMSP1 se clonó mediante PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla según el siguiente método. La PCR se realizó usando los cebadores pPfMSP119-F1 (5' - CACCGAATTCAACATTTTACAACACCAATGCGTAAAAAAC - 3' (SEQ ID NO: 25); el sitio EcoRI está subrayado) y pPfMSP119-R2 (5' - CAATTGAGATCCGCCGCCACCGCCACCGTTAGAGGAAGTGCAGAAAATACCATCGAAAAGTGGA - 3' (SEQ ID NO: 26); el sitio MunI está subrayado). El fragmento de ADN PfMSP119 resultante se clonó en pENTR/D-TOPO, a

continuación se escindió con EcoRI y MunI y se insertó en pDual-PbCSP-gp64 digerido con EcoRI. El plásmido construido se denominó pDual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

(4) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCAP-PfCSP(A361E), pCAP-PfCSP(A361E)/272 y pCAP-PfCSP(A361E)/467

5 Se realizó PCR con pCAP-PfCSP usando PfCSP-f(19) (5'-GACTCTGCAGTTATTCCAGGAATACCAAGTCTATGGAAG-3': (SEQ ID NO: 17); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP-r (373 A361E) (5'-CGATCCCGGGCTTTTCCATTTTACAAATTTTTTTTCAATATCATTTTC-3': (SEQ ID NO: 27); el sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con PstI y XmaI y se insertó en pCAP-H1N1/NP-gp64, pCAP-H1N1/NP/272 y pCAP-H1N1/NP/467, cada uno digerido con PstI y XmaI. Los plásmidos
10 construidos se denominaron pCAP-PfCSP(A361E), pCAP-PfCSP(A361E)/272 y pCAP-PfCSP(A361E)/467.

(5) Construcción de los plásmidos de transferencia pCAP-PfCSP-76 y pCAP-PfCSP-76/467

Se realizó PCR con pCAP-PfCSP(A361E) usando PfCSP-f(76) (5' -GACTCTGCAGGATGATGGAAATAACGAAGACAACG - 3': (SEQ ID NO: 28); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP-r (373 A361E) (5' -CGATCCCGGGCTTTTCCATTTTACAAATTTTTTTTCAATATCATTTTC - 3': (SEQ ID NO: 27); el
15 sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN resultante se escindió con PstI y XmaI y a continuación se insertó en pCAP-H1N1/NP-gp64 y pCAP-H1N1/NP/467, cada uno escindido con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-PfCSP-76 y pCAP-PfCSP-76/467.

(6) Construcción de los plásmidos de transferencia pCAP-PfCSP+209 y pCAP-PfCSP+209/467

Se preparó una secuencia génica artificial (PfCSP+: SEQ ID NO: 29) a partir de la secuencia de aminoácidos de PfCSP de la cepa 3D7 de *P. falciparum* (en la que, sin embargo, la A en la posición 361 se reemplazó por E) usando
20 codones usados frecuentemente en células Sf9 y humanas. Usando la secuencia génica artificial obtenida como una plantilla, se realizó PCR usando PfCSP-f(+209) (5'-GACTCTGCAGAACGCTAATCCAAACGCTAATCCCAACGCTAATCCCAATGCC -3' (SEQ ID NO: 30); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP-r(+A361E) (5'-CGATCCCGGGCTTTTCCATTTTGCAAATTTTTTTT -3' (SEQ ID NO: 31); el
25 sitio XmaI está subrayado). Los fragmentos de ADN resultantes se escindieron con PstI y XmaI y a continuación se insertaron en pCAP-H1N1/NP-gp64 y pCAP-H1N1/NP/467 digeridos con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-PfCSP+209 y pCAP-PfCSP+209/467.

(7) Construcción de los plásmidos de transferencia pCAP-PfCSP+76/209 y pCAP-PfCSP+76/209/467

Usando la secuencia génica artificial (PfCSP+: SEQ ID NO: 29) como una plantilla, se realizó PCR usando PfCSP-f(+76) (5'-GACTCTGCAGGACGACGGCAACAACGAAGACAACG -3' (SEQ ID NO: 32); el sitio PstI está subrayado),
30 PfCSP-r(+128) (5'-CGTTAGGATCCACATTTGGGTTGGCATTGTTGGG -3' (SEQ ID NO: 33); el sitio BamH I está subrayado), PfCSP-f (+209) BamHI (5'-GACTGGATCCTAACGCTAATCCAAACGCTAATCCC- 3':(SEQ ID NO: 34); el sitio BamH I está subrayado) y PfCSP-r(+A361E) (5'-CGATCCCGGGCTTTTCCATTTTGCAAATTTTTTTT -3' (SEQ ID NO: 31); el sitio XmaI está subrayado) a partir de la secuencia génica artificial obtenida. Los fragmentos de
35 ADN resultantes se escindieron con PstI/BamHI y BamHI/XmaI, respectivamente y a continuación se insertaron en pCAP-H1N1/NP-gp64 y pCAP-H1N1/NP/467, cada uno digerido con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-PfCSP+76/209 y pCAP-PfCSP+76/209/467.

(8) Construcción de los plásmidos de transferencia pCAP-HA1/Anhui, pCAP-HA1/Anhui/272 y pCAP-HA1/Anhui/467

Una secuencia génica artificial (SEQ ID NO: 35) se preparó a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA1 de hemaglutinina del virus de la gripe H5N1/Anhui/1/05 usando codones usados frecuentemente en células de Sf9 y
40 humanas. Usando la secuencia génica artificial obtenida como una plantilla, se realizó PCR usando AH-F1 (5'-CAGTCTGCAGGACCAGATTTGCATC-3': (SEQ ID NO: 36); el sitio PstI está subrayado) y AH-R4 (5'-CAGTCCCGGGCTCTCTTGCCTGC-3': (SEQ ID NO: 37); el sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con PstI y XmaI y a continuación se insertó en pCAP-H1N1/NP-gp64, pCAP-H1N1/NP/272 y
45 pCAP-H1N1/NP/467, cada uno digerido con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-HA1/Anhui, pCAP-HA1/Anhui/272 y pCAP-HA1/Anhui/467.

El número de registro del GenBank de la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina del virus de la gripe A/H5N1/Anhui/1/05 es ABD28180.

(9) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCAP-HA1/Vietnam, pCAP-HA1/Vietnam/51, pCAP-HA1/Vietnam/101, pCAP-HA1/Vietnam/154, pCAP-HA1/Vietnam/201, pCAP-HA1/Vietnam/272 y pCAP-HA1/Vietnam/467

Una secuencia génica artificial (SEQ ID NO: 38) se preparó a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA1 de la hemaglutinina del virus de la gripe H5N1/Vietnam/1203/4 usando codones usados frecuentemente en células Sf9 y humanas. Usando la secuencia génica artificial obtenida como una plantilla, se realizó PCR usando VN-F1 (5'-CAGTCTGCAGGACCAGATCTGTATC-3': (SEQ ID NO: 39); el sitio PstI está subrayado) y VN-R4 (5'-CAGTCCCGGGCTCTCTTCTTCTG-3': (SEQ ID NO: 40); el sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con PstI y XmaI y se insertó en pCAP-H1N1/NP-gp64, pCAP-H1N1/NP/272 y pCAP-H1N1/NP/467, cada uno digerido con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-HA1/Vietnam, pCAP-HA1/Vietnam/272 y pCAP-HA1/Vietnam/467.

Además, usando pCAP-HA1/Vietnam como una plantilla, se realizó PCR usando gp64(51)-f (5'-GACTCCCGGGTGGAAATCACCATCGTGGAGACG-3': (SEQ ID NO: 41); el sitio XmaI está subrayado), o gp64(101)-f (5'-GACTCCCGGGGATTTGCTTATGTGGAGCATCAGG-3': (SEQ ID NO: 42); el sitio XmaI está subrayado), o gp64(154)-f (5'-GACTCCCGGGCGCACACACGTGCAACAAATCG-3': (SEQ ID NO: 43); el sitio XmaI está subrayado), o gp64(201)-f (5'-GACTCCCGGGGACACTGTGCTTCATCGAGACGGC-3': (SEQ ID NO: 44); el sitio XmaI está subrayado), y GP64-r DrallI (5'-GGGCACTTAGTGATATTGTCTATTACGGTTTCTAATC-3' (SEQ ID NO: 12); el sitio DrallI está subrayado). Los fragmentos de ADN obtenidos se escindieron con XmaI y DrallI y se insertaron en pCAP-HA1/Vietnam digerido con XmaI y DrallI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-HA1/Vietnam/51, pCAP-HA1/Vietnam/101, pCAP-HA1/Vietnam/154 y pCAP-HA1/Vietnam/201.

El número de registro del GenBank de la secuencia de aminoácidos de la hemaglutinina del virus de la gripe A/H5N1/Vietnam/1203/2004 es AAW80717.

(10) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCAP-AH/345, pCAP-AH/345/467, pCAP-AH/410, pCAP-AH/410/467, pCAP-AH/473, pCAP-AH/473/467, pCAP-AH/520, pCAP-AH/520/467

Una secuencia génica artificial (SEQ ID NO: 45) se preparó a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA de la hemaglutinina del virus de la gripe A/H5N1/Anhui/1/05 mediante optimización de codones usando Gene Designer disponible de ADN2.0, Inc. Usando esta secuencia artificial como una plantilla, se realizó PCR usando AH17-F (5'-GACTCTGCAGGATCAGATCTGTATTGGGTACC-3' : (SEQ ID NO: 46); el sitio PstI está subrayado y AH345-R (5'-CGATCCCGGGCTCTCTTCTCTCTCCGCTCGC-3': (SEQ ID NO: 47); el sitio XmaI está subrayado), o AH410-R (5'-CGATCCCGGGCGGCCTCGAACTGGGTGTTTCATT-3': (SEQ ID NO: 48); el sitio XmaI está subrayado), o AH473-R (5'-CGATCCCGGGCGTCTCTGAGTTGAAGGCGCAC-3': (SEQ ID NO: 49); el sitio XmaI está subrayado), o AH520-R (5'-CGATCCCGGGCGCACTAATTCCTCTCGCTTC-3': (SEQ ID NO: 50); el sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con PstI y XmaI y se insertó en pCAP-HA1/Anhui o pCAP-HA1/Anhui/467 digerido con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-AH/345, pCAP-AH/345/467, pCAP-AH/410, pCAP-AH/410/467, pCAP-AH/473, pCAP-AH/473/467, pCAP-AH/520 y pCAP-AH/520/467.

(11) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCAP-VN/346, pCAP-VN/346/467, pCAP-VN/410, pCAP-VN/410/467, pCAP-VN/473, pCAP-VN/473/467, pCAP-VN/520 y pCAP-VN/520/467

Una secuencia génica artificial (SEQ ID NO: 51) se preparó a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA de la hemaglutinina del virus de la gripe A/H5N1/Vietnam/1203/2004 mediante optimización de codones usando Gene Designer disponible de ADN2.0, Inc. Usando esta secuencia artificial como una plantilla, se realizó PCR usando VN17-F (5'-GACTCTGCAGGATCAGATCTGTATCGGATATC-3': (SEQ ID NO: 52); el sitio PstI está subrayado) y VN346-R (5'-CGATCCCGGGCCCCGCTTTTCTCTCTCCGTTTCG-3': (SEQ ID NO: 53); el sitio XmaI está subrayado), o VN410-R (5'-CGATCCCGGGCCTCAAAGTGGTATTCATTTTG-3': (SEQ ID NO: 54); el sitio XmaI está subrayado), o VN473-R (5'-CGATCCCGGGCTCTAAGCTGGAGCCTGACTTTGTC-3': (SEQ ID NO: 55); el sitio XmaI está subrayado), o VN520-R (5'-CGATCCCGGGCACTAATCTCTCTTTTAAGTC-3': (SEQ ID NO: 56); el sitio XmaI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con PstI y XmaI y se insertó en pCAP-HA1/Anhui o pCAP-HA1/Anhui/467 digeridos con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-VN/346, pCAP-VN/346/467, pCAP-VN/410, pCAP-VN/410/467, pCAP-VN/473, pCAP-VN/473/467, pCAP-VN/520 y pCAP-VN/520/467.

(12) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCAP-CO/full, pCAP-CO/full/467, pCAP-CO/19, pCAP-CO/19/467, pCAP-CO/76, pCAP-CO/76/467, pCAP-CO/205 y pCAP-CO/205/467

Una secuencia génica artificial (SEQ ID NO: 57) se preparó a partir de la secuencia de aminoácidos de la CSP de la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* mediante optimización de codones usando Gene Designer disponible de

ADN2.0, Inc. Usando esta secuencia artificial como una plantilla, se realizó PCR usando un par de cebadores que consiste en PfCSP_opt-f (5'-GACTCTGCAGATGATGCGAAAATTGGCCATACTG-3': (SEQ ID NO: 58); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP_opt-r (397) (5'-CGATCCCGGGCATTGAGGAACAGAAAGGAAAGAACCATG-3': (SEQ ID NO: 59); el sitio XmaI está subrayado); PfCSP_opt-f (19) (5'-GACTCTGCAGCTGTTTCAGGAATACCAGTGCTATGG-3': (SEQ ID NO: 60); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP_opt-r (373) (5'-CGATCCCGGGCCTTCTCCATCTTACAAATTTCTTTTCAATATCATTAGC-3': (SEQ ID NO: 61); el sitio XmaI está subrayado); PfCSP_opt-f (76) (5'-GACTCTGCAGGACGACGGAATAATGAGGACAACG-3': (SEQ ID NO: 62); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP_opt-r (373) (5'-CGATCCCGGGCCTTCTCCATCTTACAAATTTCTTTTCAATATCATTAGC-3': (SEQ ID NO: 61); el sitio XmaI está subrayado); y PfCSP_opt-f (205) (5'-GACTCTGCAGAAATGCAAACCCAAATGCCAATCCAAACGC-3': (SEQ ID NO: 63); el sitio PstI está subrayado) y PfCSP_opt-r (373) (5'-CGATCCCGGGCCTTCTCCATCTTACAAATTTCTTTTCAATATCATTAGC-3': (SEQ ID NO: 61); el sitio XmaI está subrayado). Los fragmentos de ADN obtenidos se escindieron con PstI y XmaI y se insertaron en pCAP-HA1/Anhui o pCAP-HA1/Anhui/467 digeridos con PstI y XmaI. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-CO/full, pCAP-CO/full/467, pCAP-CO/19, pCAP-CO/19/467, pCAP-CO/76, pCAP-CO/76/467, pCAP-CO/205 y pCAP-CO/205/467.

(13) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCA64-HA1/Anhui y pCA64-PfCSP (A361E)

Usando el ADN Triple Cut de BacVector-2000 ADN (de Novagen), se realizó PCR usando gp64-p-f (5'-GACTCGGACCGGCCAGATAAAAAATAATCTTATCAATTAAG-3': (SEQ ID NO: 64); el sitio RsrII está subrayado) y gp64-p-r (5'-CGATACTAGTAGCACTGAGGCTTCTTATATACCCG-3': (SEQ ID NO: 65); el sitio SpeI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con RsrII y SpeI y se insertó en pCAP-HA1/Anhui o pCAP-PfCSP(A361E) digeridos con RsrII y SpeI para construir los plásmidos vectoriales de transferencia pCA64-HA1/Anhui y pCA64-PfCSP(A361E) que permiten la expresión de una proteína de fusión de antígeno de HA1 o antígeno de PfCSP y proteína gp64 en células de mamífero e insecto bajo el control del promotor doble deseado que consiste en promotor de CAG y promotor de gp64.

(14) Construcción de los plásmidos vectoriales de transferencia pCA39-HA1/Anhui y pCA39-PfCSP (A361E)

Usando el ADN Triple Cut de BacVector-2000 ADN (de Novagen), se realizó PCR usando vp39-p-f (5'-GACTCGGACCGCGTCGTACAAATCGAAATATTGTTGTG-3': (SEQ ID NO: 66); el sitio RsrII está subrayado) y vp39-p-r (5'-CGATACTAGTGTGATTGAGAAAGAAATCTCTTATTC-3': (SEQ ID NO: 67); el sitio SpeI está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se escindió con RsrII y SpeI y se insertó en pCAP-HA1/Anhui o pCAP-PfCSP(A361E) digeridos con RsrII y SpeI para construir los plásmidos vectoriales de transferencia pCA39-HA1/Anhui y pCA39-PfCSP(A361E) que permiten la expresión de una proteína de fusión de antígeno de HA1 o antígeno de PfCSP y proteína gp64 en células de mamífero e insecto bajo el control del promotor doble deseado que consiste en promotor de CAG y promotor de vp39.

(15) pCAP-CO/full/VSV, pCAP-CO/19/VSV, pCAP-CO/76/VSV y pCAP-CO/205/VSV

Usando pVSV-G (de Clontech) como una plantilla, se realizó PCR usando VSV-G-f (5'-GACTCCCGGGCGTTTGAACATCCTCACATTCAAG - 3' (SEQ ID NO: 68); el sitio XmaI está subrayado), VSV-G-r (5'-GACTCACTTAGTGCTTCCAAAGTCGGTTCATCTC-3': (SEQ ID NO: 69); el sitio DraIII está subrayado). El fragmento de ADN obtenido se insertó en pCAP-CO/full, pCAP-CO/19, pCAP-CO/76 y pCAP-CO/205, cada uno digerido con XmaI y DraIII. Los plásmidos construidos se denominaron pCAP-CO/full/VSV, pCAP-CO/19/VSV, pCAP-CO/76/VSV y pCAP-CO/205/VSV.

Ejemplo 2: Baculovirus recombinantes de la presente divulgación y método para la producción de los mismos

(1) Se produjeron baculovirus recombinantes usando un estuche para producir baculovirus recombinantes (BacVector-2000 Transfection Kit de Novagen) al cotransfectar ADN BacVector-2000 con cada uno de los siguientes vectores de transferencia construidos en el Ejemplo 1: pCAP-PfCSP, pCAP-PfCSP/272, pCAP-PfCSP/467, pCAP-PfCSP(A361E), pCAP-PfCSP(A361E)/272, pCAP-PfCSP(A361E)/467, pCAP-PfCSP-76, pCAP-PfCSP-76/467, pCAP-PfCSP+209, pCAP-PfCSP+209/467, pCAP-PfCSP+76/209, pCAP-PfCSP+76/209/467, pCAP-HA1/Anhui, pCAP-HA1/Anhui/272, pCAP-HA1/Anhui/467, pCAP-HA1/Vietnam, pCAP-HA1/Vietnam/51, pCAP-HA1/Vietnam/101, pCAP-HA1/Vietnam/154, pCAP-HA1/Vietnam/201, pCAP-HA1/Vietnam/272, pCAP-HA1/Vietnam/467, pCAP-AH/345, pCAP-AH/345/467, pCAP-AH/410, pCAP-AH/410/467, pCAP-AH/473, pCAP-AH/473/467, pCAP-AH/520, pCAP-AH/520/467, pCAP-VN/346, pCAP-VN/346/467, pCAP-VN/410, pCAP-VN/410/467, pCAP-VN/473, pCAP-VN/473/467, pCAP-VN/520, pCAP-VN/520/467, pCAP-CO/full, pCAP-CO/full/467, pCAP-CO/19, pCAP-CO/19/467, pCAP-CO/76, pCAP-CO/76/467, pCAP-CO/205, pCAP-CO/205/467, pCA39-HA1/Anhui, pCA64-HA1/Anhui, pCA39-PfCSP(A361E), pCA64-PfCSP(A361E), pCAP-CO/full/VSV, pCAP-CO/19/VSV, pCAP-CO/76/VSV, pCAP-CO/205/VSV, pDual-Pfs25-PfCSP-gp64, pDual-PfMSP1-PfCSP-gp64 en células Sf9. Se diseñaron los baculovirus recombinantes resultantes AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-

PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/272, AcNPV-CAP-PfCSP(A361E)/467, AcNPV-CAP-PfCSP-76, AcNPV-CAP-PfCSP-76/467, AcNPV-CAP-PfCSP+209, AcNPV-CAP-PfCSP+209/467, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209, AcNPV-CAP-PfCSP+76/209/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/272, AcNPV-CAP-HA1/Anhui/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/51, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/101, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/154, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/201, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/272, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam/467, AcNPV-CAP-AH/345, AcNPV-CAP-AH/345/467, AcNPV-CAP-AH/410, AcNPV-CAP-AH/410/467, AcNPV-CAP-AH/473, AcNPV-CAP-AH/473/467, AcNPV-CAP-AH/520, AcNPV-CAP-AH/520/467, AcNPV-CAP-VN/346, AcNPV-CAP-VN/346/467, AcNPV-CAP-VN/410, AcNPV-CAP-VN/410/467, AcNPV-CAP-VN/473, AcNPV-CAP-VN/473/467, AcNPV-CAP-VN/520, AcNPV-CAP-VN/520/467, AcNPV-CAP-CO/full, AcNPV-CAP-CO/full/467, AcNPV-CAP-CO/19, AcNPV-CAP-CO/19/467, AcNPV-CAP-CO/76, AcNPV-CAP-CO/76/467, AcNPV-CAP-CO/205, AcNPV-CAP-CO/205/467, AcNPV-CA39-HA1/Anhui, AcNPV-CA64-HA1/Anhui, AcNPV-CA39-PfCSP(A361E), AcNPV-CA64-PfCSP(A361E), AcNPV-CAP-CO/full/VSV, AcNPV-CAP-CO/19/VSV, AcNPV-CAP-CO/76/VSV, AcNPV-CAP-CO/205/VSV, AcNPV-Dual-Pfs25-PfCSP-gp64 y AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP-gp64.

Ejemplo 3: Prueba de expresión de antígeno vacunal procedente de baculovirus recombinante de la presente divulgación en células de insecto

Se cultivaron células Sf9 en una concentración de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 48 pocillos (de Corning) y se infectaron con los baculovirus AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-HA1/Anhui y AcNPV-CAP-HA1/Vietnam obtenidos en el Ejemplo 2, o un baculovirus natural AcNPV-WT como un control a una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,1. Después de 5 días, el sobrenadante de cultivo se retiró de cada pocillo, y a continuación se añadió Sample Buffer Solution (+2ME, x2) (de Wako) en una cantidad de 0,05 ml por pocillo para someter completamente a lisis a las células. El lisado celular se calentó a 100°C durante 5 minutos, y se sometió a electroforesis sobre SDS al 7,5%-PAGE. Después de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P de Millipore) y el bloqueo se realizó a 4°C durante la noche al sumergir la membrana en leche desnatada al 2,5% SuperBlock (de Pierce). La membrana a la que se ha transferido la proteína de células Sf9 infectadas con cada baculovirus se incubó con un anticuerpo anti-gp64 (AcV5 de eBioScience) como el anticuerpo primario, y a continuación se incubó con un anticuerpo caprino contra IgG (H+L) de coneja marcado con HRP (de BioRad) como el anticuerpo secundario. El color se desarrolló con un ECLplus Western Blotting Detection kit (de GE Healthcare) para detectar la banda de proteína. La FIG. 1 muestra los resultados.

La FIG. 1 muestra un análisis por inmunotransferencia que muestra la expresión de antígenos de fusión en células de insecto a partir de baculovirus recombinantes que contienen el gen PfCSP de malaria humana, el gen de HA1 de la cepa del virus de la gripe H5N1/Anhui/1/05 y el gen de HA1 de la cepa H5N1/Vietnam/1203/04. En la FIG. 1, el Carril 1 muestra la banda de un baculovirus natural (AcNPV-WT); el Carril 2 muestra la banda de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-PfCSP) que contiene el gen PfCSP y el gen de gp64 de longitud completa insertado agua abajo del promotor doble usado en la presente invención; el Carril 3 muestra la banda de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-HA1/Anhui) que contiene el gen de HA1 de la cepa H5N1/Anhui/1/05 del virus de la gripe y el gen de gp64 de longitud completa insertado aguas abajo del promotor doble usado en la presente invención; y el Carril 4 muestra la banda de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-HA1/Vietnam) que contiene el gen de HA1 de la cepa H5N1/Vietnam/1203/04 del virus de la gripe y el gen de gp64 de longitud completa insertado aguas abajo del promotor doble usado en la presente invención.

Como se muestra en los Carriles 2, 3 y 4 de la FIG. 1, una banda correspondiente a la proteína de fusión expresada de un gen antigénico extraño inmunogénico y el gen de gp64 se observaba en los baculovirus recombinantes que tenían un gen antigénico y el gen de gp64 fusionados y expresados aguas abajo del promotor doble usado en la presente invención.

Los resultados anteriores confirmaron que cuando se usaba el virus recombinante usado en la presente invención, un gen antigénico extraño inmunogénico y el gen de gp64 se pueden fusionar y expresar como un producto de fusión expresado en células de insecto.

Ejemplo 4: Prueba de identificación de un antígeno de fusión en un antígeno vacunal presentado sobre una partícula viral (virión) de un baculovirus recombinante de la presente divulgación

Se cultivaron células Sf9 hasta una concentración de 1×10^7 células por placa de cultivo celular de 150 mm (de Sumilon), y se infectaron con cada uno de los susodichos baculovirus con una multiplicidad de infección de aproximadamente 0,1. Después de 7 días, el medio se centrifugó a 3.000 x g a 4°C durante 15 minutos dos veces y la solución de virus se estratificó sobre una solución de sacarosa al 25% y se centrifugó usando una ultracentrífuga a 25.000 rpm a 4°C durante 90 minutos para dar partículas virales. Se añadieron 0,05 ml de Sample Buffer Solution (+2ME, x2) (de Wako) a 0,05 ml de cada uno de los concentrados de virus (1×10^8 UFP/ml) de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-HA1/Vietnam y AcNPV-WT recogidos por ultracentrifugación. Las mezclas resultantes se calentaron a 100°C durante 5 minutos y se sometieron a electroforesis sobre SDS al 7,5%-PAGE. Después de la electroforesis, las proteínas obtenidas se transfirieron a

membranas de PVDF (Immobilon-P de Millipore) y se sumergieron en leche desnatada al 2,5%/SuperBlock (de Pierce) para realizar el bloqueo a 4°C durante la noche. Las membranas a las que se han transferido las soluciones de virus de AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/272 y AcNPV-CAP-PfCSP/467 se incubaron con un anticuerpo anti-PfCSP (2A10, MR-4) como el anticuerpo primario, y a continuación se incubaron con un anticuerpo caprino contra IgG (H+L) de ratón marcado con HRP (de BioRad) como el anticuerpo secundario. La membrana a la que se ha transferido la solución de virus de AcNPV-CAP-HA1/Vietnam se incubó con un anticuerpo anti-H5N1 (IT-003-005 de Immune Technology) como el anticuerpo primario, y a continuación se incubó con un anticuerpo caprino contra IgG de conejo marcado con HRP (de GE Healthcare) como el anticuerpo secundario. El color se desarrolló con un ECLplus Western Blotting Detection kit (de GE Healthcare) para detectar las bandas de las proteínas. La FIG. 2 muestra los resultados.

La FIG. 2 (A) muestra un análisis de inmunotransferencia que muestra la expresión del gen de CSP (PfCSP) de malaria humana en partículas virales de baculovirus recombinantes preparadas usando vectores de transferencia recombinantes. El Carril 1, el carril de la izquierda de la FIG. 2 (A), muestra la banda de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-PfCSP) que contiene el gen de PfCSP y el gen de gp64 de longitud completa insertados aguas abajo del promotor doble usado en la invención; el Carril 2 muestra la banda de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-PfCSP/272) que contiene el gen de PfCSP y el gen de gp64 de longitud parcial (241 residuos de aminoácidos desde el extremo C) insertados aguas abajo del promotor doble usado en la invención; el Carril 3 muestra la banda de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-PfCSP/467) que contiene el gen de PfCSP y el gen de gp64 de longitud parcial (46 residuos de aminoácidos desde el extremo C) insertados aguas abajo del promotor doble usado en la invención. Los baculovirus se sometieron a electroforesis y se comprobó la presencia de un producto de fusión expresado del gen de PfCSP y el gen de gp64. Una banda intensa, que indicaba la presencia de un antígeno de fusión del gen de PfCSP y el gen de gp64 en las partículas virales recombinantes, se detectó en todos los carriles de la FIG. 2 (A).

La FIG. 2 (B) muestra un análisis de inmunotransferencia que muestra la expresión del gen de H5N1/HA1 en partículas virales de baculovirus recombinantes preparadas usando vectores de transferencia recombinantes. El Carril 1, el carril de la izquierda de la FIG. 2 (B), muestra los resultados obtenidos usando el lisado celular de AcNPV-WT infectado preparado en el Ejemplo 3; el Carril 2 muestra los resultados obtenidos usando el lisado celular infectado con AcNPV-CAP-HA1/Anhui preparado en el Ejemplo 3; el Carril 3 muestra los resultados obtenidos usando el lisado celular infectado con AcNPV-CAP-HA1/Vietnam preparado en el Ejemplo 3; y el Carril 4 muestra los resultados de partículas virales de un baculovirus natural (AcNPV-WT); el Carril 5 muestra los resultados de partículas virales de un baculovirus recombinante (AcNPV-CAP-HA1/Vietnam) que contiene el gen de HA1 de la cepa del virus de la gripe H5N1/Vietnam/1203/04 y el gen de gp64 de longitud completa insertado aguas abajo del promotor doble usado en la presente invención; y el Carril 6 muestra los resultados de antígeno de HA purificado de H5N1 (IT-003-0053p de Immune Technology). Los baculovirus se sometieron a electroforesis y se comprobó la presencia de un producto de fusión expresada del gen de PfCSP y el gen de gp64. Una banda intensa, que indica la presencia de un antígeno de fusión del gen de HA1 de H5N1/Vietnam/1203/04 y el gen de gp64 en las partículas virales recombinantes, se detectó en el Carril 5 de la FIG. 2(B).

Los resultados anteriores del Ejemplo 4 muestran que un gen extraño que tiene la inmunogenicidad deseada y el gen de gp64 se pueden fusionar y expresar en partículas virales recombinantes del baculovirus recombinante de la presente divulgación producido al usar el vector de transferencia recombinante de la presente divulgación.

Ejemplo 5: Prueba de expresión de antígeno vacunal procedente de baculovirus recombinante de la presente divulgación en mamíferos

Se infectaron células HepG2 con AcNPV-Dual-PfMSP1-PfCSP con una multiplicidad de infección de 1. Después de 48 horas, el sobrenadante de cultivo se retiró y la placa se enjuagó con PBS tres veces. Se añadió una solución de acetona/etanol (una relación de mezcla de 7:3) enfriada hasta -20°C para inmovilizar las células a -20°C durante 5 minutos. Se añadió un suero caprino normal al 5% (de Sigma) para realizar el bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora. Para detectar la expresión de PfCSP, se añadió un anticuerpo anti-PfCSP (2A10, MR-4) marcado con Alexa Flour 594; y para detectar la expresión de PfMSP-1₁₉, se añadieron un anticuerpo anti-PfMSP-1₁₉ (5.2, MR-4) y a continuación un anticuerpo contra inmunoglobulinas de ratón marcado con FITC. Después de la incubación, las células que reaccionaban se detectaron bajo un microscopio de fluorescencia.

La FIG. 3 muestra los resultados.

La FIG. 3 muestra células HepG2 teñidas con un anticuerpo marcado fluorescentemente, que indica que un antígeno se ha expresado desde un baculovirus recombinante que contiene un gen de fusión del gen de PfMSP1 y el gen de PfCSP en las células HepG2. Los resultados de la FIG. 3 (A) confirmaron que se ha expresado un antígeno de PfCSP. Los resultados de la FIG. 3 (B) confirmaron que se ha expresado un antígeno de PfMSP-1₁₉. Se confirmó así que se pueden expresar antígenos de fusión en células de mamífero. Los resultados de las FIG. 3 (A) y (B) muestran claramente que el baculovirus recombinante producido al usar el vector de transferencia que contiene el promotor doble de la presente divulgación puede expresar el antígeno deseado en células de mamífero.

Esto sugiere que cuando el baculovirus recombinante producido usando el vector de transferencia recombinante de la presente divulgación se administra a seres humanos y otros mamíferos, las partículas de virus entran en las células de mamífero, y un promotor de mamífero trabaja para producir un producto de fusión del gen de antígeno extraño deseado y el gen de gp64 en las células de mamífero, induciendo así la inmunidad adquirida.

Ejemplo 6: Inducción de anticuerpo mediante virus recombinante de antígeno de PfCSP y virus recombinante de antígeno de H5N1/HA1

1. Inoculación de solución de virus

Se inocularon soluciones de virus de AcNPV-WT, AcNPV-CAP-PfCSP, AcNPV-CAP-PfCSP/467, AcNPV-CAP-HA1/Anhui y AcNPV-CAP-HA1/Vietnam concentradas mediante ultracentrifugación en los músculos de los muslos de ratones hembra BALB/c en una cantidad de 1×10^8 UFP dos veces a intervalos de dos semanas.

2. Medida de títulos de anticuerpo

Los ratones fueron sometidos a eutanasia dos semanas después de la inmunización final y se recogieron sueros de los ratones y se usaron para medir títulos de anticuerpos específicos para antígenos. La inducción de títulos de anticuerpos específicos para antígeno de PfCSP mediante AcNPV-CAP-PfCSP y AcNPV-CAP-PfCSP/467 se midió mediante ELISA usando una placa sobre la que se ha inmovilizado péptido (NANP)₄NVDPC (de Sigma), es decir, epítipo de células B de PfCSP. La inducción de títulos de anticuerpos específicos para antígeno de H5N1/HA mediante AcNPV-CAP-HA1/Anhui y AcNPV-CAP-HA1/Vietnam se midió mediante ELISA usando una placa sobre la que se ha inmovilizado antígeno de HA purificado de virus H5N1 (IT-003-005p de Immune Technology). La absorbancia a OD450 nm se midió usando MaxiSorp (de NUNC) como la placa de ELISA, anticuerpo caprino contra IgG (H y L) de ratón marcado con HRP (de American Qualex) como el anticuerpo secundario y TMB (de Calbiochem) para la reacción cromática.

La FIG. 4 muestra los resultados.

La FIG. 4 (A) es una gráfica que representa la absorbancia media de cada grupo a OD450 nm obtenida cuando los sueros de ratón se sometían a una dilución en serie duplicada desde diluciones de 800 veces hasta 102.400 veces. En los grupos inoculados con PBS y AcNPV-WT, cuyos sueros no contenían anticuerpo para el antígeno, la absorbancia de las diluciones incluso de 800 veces era 0,1 o menos, indicando una baja reactividad. En contraste, en los grupos inoculados con AcNPV-CAP-PfCSP y AcNPV-CAP-PfCSP/467, la absorbancia de las diluciones de 800 veces era 1,138 y 1,878, respectivamente, indicando una reactividad intensa y mostrando claramente que se inducían anticuerpos específicos para los antígenos. La FIG. 4 (B) es una gráfica que representa la absorbancia media de cada grupo a OD450 nm obtenida cuando los sueros de ratón se sometían a una dilución en serie duplicada desde diluciones de 400 veces hasta 25.600 veces. En los grupos inoculados con PBS y AcNPV-WT, cuyos sueros no contenían anticuerpo para el antígeno, la absorbancia de las diluciones de 400 veces era 0,1 o menos, indicando una baja reactividad. En contraste, en el grupo inoculado con AcNPV-CAP-HA1/Anhui y AcNPV-CAP-HA1/Vietnam, la absorbancia de la dilución de 3.200 veces era 1,551 y 2,503, respectivamente, indicando una reactividad intensa y mostrando claramente que se inducían anticuerpos específicos para antígenos. La FIG. 4 muestra claramente que el baculovirus recombinante producido usando un vector de transferencia que contiene el promotor doble usado en la presente invención puede inducir un anticuerpo para el antígeno deseado en mamíferos.

3. Medida del índice de neutralización

Se realizó una prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI) usando un suero de ratón inoculado con AcNPV-CAP-HA1/Anhui. Más específicamente, la prueba se realizó según el método descrito en las instrucciones incluidas en un reactivo de HI para la gripe "Seiken" (de Denka Seiken Co., Ltd.), usando antígeno de HA purificado de virus H5N1 (IT-003-0053p de Immune Technology). La absorción de aglutininas no específicas se realizó usando eritrocitos, y la retirada de los inhibidores de la aglutinación no específicos se realizó usando RDE (II) de "Seiken" (de Denka Seiken Co., Ltd.). La prueba de HI se realizó del siguiente modo. Se sometieron 0,025 ml de un antisuero diluido 10 veces en una placa de 96 pocillos a una dilución en serie duplicada usando un diluyente. Se añadieron a cada pocillo de la placa de 96 pocillos que contenía el antisuero diluido 0,025 ml de antígeno de HA de virus H5N1 diluido para obtener un título de HA de 4 por 0,025 ml del mismo. Se dejó que la placa reposara a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron 0,05 ml de una suspensión de eritrocitos para la reacción y se agitaron bien. Se dejó que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 60 minutos. La dilución final de la muestra de prueba a la que se inhibía completamente la hemaglutinación se definió como el título de anticuerpo de HI.

Los resultados muestran que los sueros inoculados con PBS y AcNPV-WT tenían títulos de anticuerpo de HI de 10 o menos, mientras que el suero inoculado con AcNPV-CAP-HA1/Anhui tenía un título de anticuerpo de HI de 40.

Los resultados parecen indicar que cuando se administra a seres humanos y otros mamíferos, el baculovirus recombinante producido a partir del vector de transferencia recombinante de la presente divulgación puede inducir un anticuerpo eficaz para el gen antigénico extraño deseado, proporcionado así efectos vacunadores.

- 5 **Texto libre de la lista de secuencias**
- SEQ ID NOS: 1 y 2 son las secuencias de los cebadores phsp65-F1 y phsp65-R1 para PCR de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.
- 10 SEQ ID NOS: 3 y 4 son las secuencias de los cebadores phsp65-F2 y phsp65-R2 para PCR con pcADN-hps65 como una plantilla.
- SEQ ID NOS: 5 y 6 son las secuencias de los cebadores pPolh-F2 y pgp64-R2 para PCR con pBACsurf-1 como una plantilla para producir un fragmento de ADN del gen de gp64.
- SEQ ID NOS: 7 y 8 son las secuencias de los cebadores HA-f y HA-r para PCR para producir un fragmento del gen de HA del virus de la gripe.
- 15 SEQ ID NOS: 9 y 10 son las secuencias de los cebadores pHA-F1 y pHA-R1 para PCR con pCR-Blunt-HA como una plantilla.
- SEQ ID NOS: 11 y 12 son las secuencias de los cebadores Polh-f RsrII y GP64-r DraIII para PCR con pBACsurf-HA1 como una plantilla.
- 20 SEQ ID NOS: 13 y 14 son las secuencias de los cebadores NP-f EcoRI y NP-r Cfr9I para RT-PCR de ARN genómico de la cepa PR/8/34 de virus de la gripe.
- SEQ ID NOS: 15, 16, y 12 son las secuencias de los cebadores gp64(272)-f, gp64(467)-f, y GP64-r DraIII para PCR de pCAP-H1N1/HA1-gp64.
- SEQ ID NOS: 17 y 18 son las secuencias de los cebadores PfCSP-f(19) y PfCSP-r(373) para PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla.
- 25 SEQ ID NOS: 19 y 20 son las secuencias de los cebadores pAMA-F1 y pAMA1-R1 para PCR con ADN genómico de *P. berghei* como una plantilla.
- SEQ ID NOS: 21 y 22 son las secuencias de los cebadores pPfCSP-F1 y pPfCSP-R1 para PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla.
- 30 SEQ ID NOS: 23 y 24 son las secuencias de los cebadores pPfs25-F1 y pPfs25-R2 para PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla.
- SEQ ID NOS: 25 y 26 son las secuencias de los cebadores pPfMSP119-F1 y pPfMSP119-R2 para PCR con ADN genómico de *P. falciparum* como una plantilla.
- SEQ ID NOS: 17 y 27 son las secuencias de los cebadores PfCSP-f(19) y PfCSP-r(373 A361E) para PCR con pCAP-PfCSP como una plantilla.
- 35 SEQ ID NOS: 28 y 27 son las secuencias de los cebadores PfCSP-f(76) y PfCSP-r(373 A361E) para PCR con pCAP-PfCSP como una plantilla.
- SEQ ID NO: 29 es la secuencia de un gen artificial (PfCSP+) producido a partir de la secuencia de aminoácidos del PfCSP de la cepa 3D7 de *P. falciparum* (en la que, sin embargo, la A en la posición 361 se reemplazó por E) usando codones usados frecuentemente en células Sf9 y células humanas.
- 40 SEQ ID NOS: 30 y 31 son las secuencias de los cebadores PfCSP-f(+209) y PfCSP-r(+A361E) para PCR con PfCSP+ como una plantilla.

SEQ ID NOS: 32, 33, 34 y 31 son las secuencias de los cebadores PfCSP-f(+76), PfCSP-r(+128), PfCSP-f(+209) BamHI y PfCSP-r(+A361E) para PCR con PfCSP+ como una plantilla.

5 SEQ ID NO: 35 es la secuencia de un gen artificial producido a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA1 de la hemaglutinina del virus de la gripe H5N1/Anhui/1/05 usando codones usados frecuentemente en células Sf9 y células humanas.

SEQ ID NOS: 36 y 37 son las secuencias de los cebadores AH-F1 (5'-CAGTCTGCAGGACCAGATTTGCATC-3': (SEQ ID NO: 36); el sitio PstI está subrayado) y AH-R4 (5'-CAGTCCCGGGCTCTCTTGCGCCTGC-3': (SEQ ID NO: 37); el sitio XmaI está subrayado) para PCR con la secuencia génica artificial de SEQ ID NO: 35 como una plantilla.

10 SEQ ID NO: 38 es la secuencia de un gen artificial producido a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA1 de la hemaglutinina del virus de la gripe H5N1/Vietnam/1203/04 usando codones usados frecuentemente en células Sf9 y humanas.

SEQ ID NOS: 39 y 40 son las secuencias de los cebadores VN-F1 (5'-CAGTCTGCAGGACCAGATCTGTATC-3': (SEQ ID NO: 39); el sitio PstI está subrayado) y VN-R4 (5'-CAGTCCCGGGCTCTCTTCTTCCTGC-3': (SEQ ID NO: 40); el sitio XmaI está subrayado) para PCR con la secuencia génica artificial de SEQ ID NO: 38 como una plantilla.

15 SEQ ID NOS: 41, 42, 43, 44, y 12 son las secuencias de los cebadores gp64(51)-f (5'-GACTCCCGGGTGGAAATCACCATCGTGGAGACG-3': (SEQ ID NO: 41); el sitio XmaI está subrayado), gp64(101)-f (5'-GACTCCCGGGGATTTGCTTATGTGGAGCATCAGG-3': (SEQ ID NO: 42); el sitio XmaI está subrayado), gp64(154)-f (5'-GACTCCCGGGGCGCACCACACGTGCAACAAATCG-3': (SEQ ID NO: 43); el sitio XmaI está subrayado), gp64(201)-f (5'-GACTCCCGGGGACACTGTGCTTCATCGAGACGGC-3': (SEQ ID NO: 44); el sitio XmaI está subrayado), y GP64-r DralII (5'-GGGCACTTAGTGATATTGTCTATTACGGTTTCTAATC-3' (SEQ ID NO: 20 12); el sitio DralII está subrayado).

SEQ ID NO: 45 es la secuencia de un gen artificial producido a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA1 de la hemaglutinina de virus de la gripe H5N1/Anhui/1/05 mediante optimización de codones usando Gene Designer disponible de ADN2.0, Inc.

25 SEQ ID NOS: 46, 47, 48, 49, y 50 son las secuencias de AH17-F (5'-GACTCTGCAGGATCAGATCTGTATTGGGTACC-3': (SEQ ID NO: 46); el sitio PstI está subrayado, y AH345-R (5'-CGATCCCGGGCTCTCTTTCTCCTCCGCTCGC-3': (SEQ ID NO: 47); el sitio XmaI está subrayado), AH410-R (5'-CGATCCCGGGCGGCTCGAAGTGGGTGTTTCATT-3': (SEQ ID NO: 48); el sitio XmaI está subrayado), AH473-R (5'-CGATCCCGGGCGTCTCTGAGTTGAAGGCGCAC-3': (SEQ ID NO: 49); el sitio XmaI está subrayado, y AH520-R (5'-CGATCCCGGGCACCACTAATTTCTCTCGCTTC-3': (SEQ ID NO: 50); el sitio XmaI está subrayado) para PCR con la secuencia génica artificial de SEQ ID NO: 45 como una plantilla.

SEQ ID NO: 51 es la secuencia de un gen artificial producido a partir de la secuencia de aminoácidos de la región HA1 de la hemaglutinina de virus de la gripe H5N1/Vietnam/1203/04 mediante optimización de codones usando Gene Designer disponible de ADN2.0, Inc.

35 SEQ ID NOS: 52, 53, 54, 55, y 56 son las secuencias de los cebadores VN17-F (5'-GACTCTGCAGGATCAGATCTGTATCGGATATC-3': (SEQ ID NO: 52); el sitio PstI está subrayado) y VN346-R (5'-CGATCCCGGGCCCGCTTTTTCTCCTCCGTTTCG-3' : (SEQ ID NO: 53); el sitio XmaI está subrayado), VN410-R (5'-CGATCCCGGGCCTCAAAGTGCATTCATTTTG-3' : (SEQ ID NO: 54); el sitio XmaI está subrayado), VN473-R (5'-CGATCCCGGGCTCTAAGCTGGAGCCTGACTTTGTG-3': (SEQ ID NO: 55); el sitio XmaI está subrayado) y 40 VN520-R (5'-CGATCCCGGGCACTAATCTCCTCTCTTTTAAGTC-3': (SEQ ID NO: 56); el sitio XmaI está subrayado) para PCR con la secuencia génica artificial de SEQ ID NO: 51 como una plantilla.

SEQ ID NO: 57 es la secuencia de un gen artificial producido a partir de la secuencia de aminoácidos de la CSP de la cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* mediante optimización de codones usando Gene Designer disponible de ADN2.0, Inc.

45 SEQ ID NOS: 58, 59, 60, 61, y 62 son las secuencias de los cebadores PfCSP_opt-f (5'-GACTCTGCAGATGATGCGAAAATTGGCCATACTG-3': (SEQ ID NO: 58); el sitio PstI está subrayado), PfCSP_opt-r (397) (5'-CGATCCCGGGCATTGAGGAACAGAAAGGAAAGAACCATG-3': (SEQ ID NO: 59); el sitio XmaI está subrayado), PfCSP_opt-f (19) (5'-GACTCTGCAGTGTTTCAGGAATACCACTGCTATGG-3': (SEQ ID NO: 60); el sitio (elPstI está subrayado), PfCSP_opt-r(373) (5'-CGATCCCGGGCCTTCTCCATCTTACAAATTTCTTTTCAATATCATTAGC -3': (SEQ ID NO: 61); (el sitio XmaI está subrayado), PfCSP_opt-f (76) (5'-GACTCTGCAGGACGACGGAAATAATGAGGACAACG-3': (SEQ ID NO: 62); el

sitio PstI está subrayado), y PfCSP_opt-f (205) (5'-GACTCTGCAGAATGCAAACCCAAATGCCAATCCAAACGC-3': (SEQ ID NO: 63) ; el sitio PstI está subrayado) para PCR con la secuencia génica artificial de SEQ ID NO: 57 como una plantilla.

5 SEQ ID NOS: 64, 65, 66, y 67 son las secuencias de los cebadores gp64-p-f (5'-GACTCGGACCGGCCAGATAAAAAATAATCTTATCAATTAAG-3': (SEQ ID NO: 64); el sitio RsrII está subrayado), gp64-p-r (5'-CGATACTAGTAGCACTGAGGCTTCTTATATACCCG-3': (SEQ ID NO: 65); el sitio SpeI está subrayado) y vp39-p-f (5'-GACTCGGACCGCGTCGTACAAATCGAAATATTGTTGTG-3': (SEQ ID NO: 66) ; el sitio RsrII está subrayado) y vp39-p-r (5'-CGATACTAGTGTGATTGAGAAAGAAATCTTATTC-3': (SEQ ID NO: 67); el sitio SpeI está subrayado) para PCR con ADN genómico baculoviral como una plantilla.

10 SEQ ID NOS: 68 y 69 son las secuencias de los cebadores VSV-G-f (5'-GACTCCCCGGGCGTTTGAACATCCTCACATTCAAG -3' (SEQ ID NO: 68); el sitio XmaI está subrayado) y VSV-G-r (5'-GACTCACTTAGTGTCTTCCAAGTCGGTTCATCTC-3': (SEQ ID NO: 69); el sitio DraIII está subrayado) para PCR con pVSV-G como una plantilla.

Lista de secuencias

15 <110> EDUCATIONAL FOUNDATION JICHI MEDICAL UNIVERSITY

OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> Nuevo vector viral

<130> P08-76

<150> JP 2007-205785

20 < 151> 2007-08-07

<160> 79

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

< 211> 42

25 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador phsp65-F1

<400> 1

30 aataatagat ctaatggcca agacaattgc gtacgacgaa ga 42

<210> 2

< 211> 63

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador phsp65-R1

<400> 2

aatccaatgc ggccggggga attcgattcc tgcaggtcag aaatccatgc caccatgtc 60
gcc 63

5

<210> 3

< 211> 74

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10

< 223> cebador phsp65-F2

<400> 3

cacccctgca ggactacaag gacgacgatg acaaggaatt catggccaag acaattgcgt 60
acgacgaaga ggcc 74

<210> 4

< 211> 37

15

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador phsp65-R2

<400> 4

20

ccggggcgaa atccatgcca cccatgtcgc cgccacc 37

<210> 5

< 211> 48

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

25

<220>

< 223> cebador pPolh-F2

<400> 5

	cacccggacc ggataattaa aatgataacc atctcgcaaa taaataag	48
	<210> 6	
	< 211> 35	
	< 212> ADN	
5	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador pgp64-R2	
	<400> 6	
	ggtaccatat tgtctattac ggttctaata catac	35
10	<210> 7	
	< 211> 30	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	< 223> cebador HA-f	
	<400> 7	
	cctgcaggta tgaaggcaaa cctactggtc	30
	<210> 8	
	< 211> 23	
20	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador HA-r	
	<400> 8	
25	gcccgggcga tgcataattct gca	23
	<210> 9	
	< 211> 37	
	< 212> ADN	

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador HA-F1

<400> 9

5 caccgaattc gacacaatat gtataggcta ccatgcg 37

<210> 10

< 211> 32

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> cebador pHA-R1

<400> 10

cccgggcacc tctggattgg atggacggaa tg 32

<210> 11

15 < 211> 35

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador Polh-f RsrII

20 <400> 11

ggcgggaccg gataattaaa atgataacca tctcg 35

<210> 12

< 211> 37

< 212> ADN

25 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador GP64-r Dralll

<400> 12

gggcacttag tgatattgtc tattacgggt tctaatac 37

<210> 13

< 211> 27

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador NP-f EcoRI

<400> 13

acggaattcc attcaattca aactgga 27

10 <210> 14

< 211> 31

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> cebador NP-r Cfr9I

<400> 14

gatcccgggc ctgtcaatg ctgaatggca a 31

<210> 15

< 211> 31

20 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador gp64(272)-f

<400> 15

25 gactccccgg gtcgagcacc gagtcaagaa g 31

<210> 16

< 211> 31

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador gp64(467)-f

<400> 16

5 gactccccgg gacatcactt ccatggctga a 31

<210> 17

< 211> 39

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> cebador PfCSP-f(19)

<400> 17

gactctgcag ttattccagg aataccagtg ctatggaag 39

<210> 18

15 < 211> 44

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> PfCSP-r(373)

20 <400> 18

cgatcccggg cttttccat ttacaaatt tttttcaa tatc 44

<210> 19

< 211> 40

< 212> ADN

25 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador pAMA-F1

<400> 19

caccgaattc aatccatggg aaaagtatac ggaaaaatat 40

<210> 20

< 211> 37

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador pAMA1-R1

<400> 20

cccgggcttc tctggttga tgggcttca tatgcac 37

10 <210> 21

< 211> 40

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> cebador pPfCSP-F1

<400> 21

caccgaattc ttattccagg aataccagtg ctatggaagt 40

<210> 22

< 211> 34

20 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador pPfCSP-R1

<400> 22

25 cccgggcttt ttccattta caaatTTTT tttc 34

<210> 23

< 211> 43

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador pPfs25-F1

<400> 23

5 caccgaattc aaagttaccg tggatactgt atgcaaaaga gga 43

<210> 24

< 211> 66

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> cebador pPfs25-R2

<400> 24

caattgagat ccgcccggcac cgccaccagt acatatagag ctttcattat ctattataaa 60

lccatc 66

<210> 25

15 < 211 > 41

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador pPfMSP119-F1

20 <400> 25

caccgaattc aacatttcac aacaccaatg cgtaaaaaaa c 41

<210> 26

< 211> 64

< 212> ADN

25 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador pPfMSP119-R2

ES 2 575 679 T3

<400> 26

caattgagat cgcgcgccac cgccaccgtt agaggaactg cagaaaatac catcgaaaag 60
tgga 64

<210> 27

< 211> 50

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP-r(373 A361E)

<400> 27

10 cgatcccggg cttttccat ttacaaatt tttttcaa tatcatttc 50

<210> 28

< 211> 35

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

< 223> cebador PfCSP-f(76)

<400> 28

gactctgcag gatgatggaa ataacgaaga caacg 35

<210> 29

20 < 211> 1194

< 212> ADN

< 213> Plasmodium falciparum

<400> 29

ES 2 575 679 T3

atgatgcgca aactggccat tctgagcgtg agcagctttc tgtttgtgga agccctgttt 60
 caggaatacc agtgcctacgg cagcagcagc aacaccgcg tgcgaacga actgaactac 120
 gacaacgccg gcaccaacct gtacaacgaa ctggaaatga actactacgg caaacaggaa 180
 aactggtaca gccctgaaaaa aaacagccgc agcctgggagc aaaacgacga cggcaacaac 240
 gaagacaacg aaaaactgcg caaacccaaa cacaaaaaac tgaacagcc cgcgcgacggc 300
 aaccgccgacc ccaacgccaa cccaacgtg gacccaatg ccaacccaaa tctggaccca 360

aatgccaacc caaatgtgga tcctaacgcc aacccaaacg caaatccaa tgccaaccct 420
 aacgctaac caaacgccaa cccaacgct aacctaatg ctaacccaaa cgctaaccct 480
 aacgctaacc ctaacgccaa tccaatgcc aaccccaacg ccaacccaaa cgctaaccct 540
 aacgctaacc ctaacgccaa cccaacgcc aatcccaacg ctaacccaa cgtggacccc 600
 aatgcaaac ccaacgccaa tccaacgct aatccaaacg ctaacccaa cgctaaccct 660
 aatgccaacc caaacgcaaa tccaatgcc aaccccaacg ccaacccaa cgccaaccct 720
 aacgcaaacc caaacgccaa cccaatgcc aacctaacg ctaacccaaa cgccaatccc 780
 aatgccaacc caaacgctaa ccctaacgcc aatcccaaca agaacaacca gggcaatggc 840
 cagggccaca atatgccaaa tgacccaac cgaacgtgg acgaaaacgc caacgccaac 900
 agcgcctga aaaacaacaa caacgaagaa cccagcgaca aacacattaa agaatacctg 960
 aacaaaattc agaacagcct gagcaccgaa tggagccct gcagcgtgac ctgcggcaac 1020
 ggcattcagg tgcgcattaa acccggcagc gccacaac ccaagacga actggactac 1080
 gaaaacgaca ttgaaaaaaa aatttgcaaa atggaaaaat gcagcagcgt gttaacgtg 1140
 tgaacagca gcattggcct gattatggtg ctgagctttc tgtttctgaa ctac 1194

<210> 30

5

< 211> 52

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP-f(+209)

10

<400> 30

gactctgcag aacgctaac caaacgctaa tccaacgct aatcccaatg cc 52

<210> 31

< 211> 35

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP-r(+ A361 E)

<400> 31

5 cgatcccggg cttttccat ttgcaaatt tttt 35

<210> 32

< 211> 35

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> cebador PfCSP-f(+76)

<400> 32

gactctgcag gacgacggca acaacgaaga caacg 35

<210> 33

15 < 211> 32

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP-r(+128)

20 <400> 33

cgtaggatc cacatttggg ttggcatttg gg 32

<210> 34

< 211> 35

< 212> ADN

25 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP-f(+209)

<400> 34

gactggatcc taacgctaata ccaaacgcta atccc 35

<210> 35

< 211> 987

< 212> ADN

5 < 213> Virus de la gripe

<400> 35

gaccagattt gcatcggata ccacgccaac aacagcaccg agcaggtcga taccatcatg 60
gagaaaaacg tgaccgtcac ccacgctcag gacatcctgg agaagactca caatggaaag 120
ctctgcgacc tggacggcgt gaaacccctc atcctgagag attgttctgt ggccggatgg 180
ctgtcgggaa accccatgtg cgatgaattt atcaacgtcc cagagtggag ttacatcgtg 240
gagaaggcca accctgccaa cgacctgtgt taccocggca acttcaacga ctacgaggag 300
ctgaagcacc tgctctcacg catcaaccac ttogagaaga tccagattat ccctaagtct 360
agttggagtg accacgaggc cagttccggc gtgtcctctg cctgtccata ccagggcaca 420
cccagtttct tcagaaacgt cgtctggctg atcaagaaga acaacacata ccccaccatc 480
aagcgaagtt acaacaacac caaccaggag gacctcctca tctgtgggg aatccaccac 540
tctaacgacg ctgccgaaca gacaaagctg taccagaatc ccaccaccta catctccgtg 600
ggaacaagca cctcaacca ggcctgtgtg cccaagatcg ctacacgac aaaggtgaat 660
ggccagtccg gcaggatgga cttttctgg accatcctca aaccaacga cgccatcaat 720
tttgagtcta atggcaactt catgcctccc gactacgctt acaagatcgt caagaaagga 780
gactccgcca tctgaagtc cgagtgagg tacggcaact gcaacaccaa gtgccagacc 840
ccaattggag ccattaactc cagtatgccc ttccacaata tccaccact gacaattggc 900
gaatgcccca aatacgtgaa aagcaacaaa ctggtcctgg ctaccggact gcgcaacagc 960

cccctgcgag agcgcaggcg caagaga 987

10 <210> 36

< 211> 25

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> cebador AH-F1

<400> 36

cagtctgcag gaccagattt gcatc 25

<210> 37

< 211> 25

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

5

<220>

< 223> cebador AH-R4

<400> 37

cagtcccggg ctctcttgcg cctgc 25

<210> 38

10

< 211> 990

< 212> ADN

< 213> virus de la gripe

<400> 38

```

gaccagatct gtatcggata ccacgccaac aacagtaccg aacaggtgga caccattatg 60
gagaagaatg tgaccgtgac ccacgcccag gatatoctgg agaagaagca caacggcaaa 120
ctgtgcgacg tggacggcgt gaagcccctg atcctgogcg attgctccgt ggccggatgg 180
ctgtctggga accctatgtg gacgaattt atcaacgtgc ccgaatggag ttacattgtg 240
gagaaggcta accccgtgaa tgacctgtgc taccocggag acttcaacga ctacgaagag 300
ctgaagcatc tgcgtcaag gattaaccac ttcgagaaga tccagattat tcccaagtct 360
agctggagct cccacgagcg ctcaactggga gtgtccagcg cctgccccta ccagggaag 420
tcaagcttct ttgcgaacgt ggtgtggctg atcaagaaga atagtaccta cccacaatc 480
aagaggtcct acaacaacac caaccaggaa gacctgctgg tgcgtgggg aatccatcac 540
ccaatgacg ctgccgaaca gaccaagctg taccagaacc caactaccta catcagcgtg 600
ggcaccagca cactgaacca ggcctgtgtg cctagaatcg ccaccagatc caaagtgaac 660
ggccagtcgg gccgcatgga attttctgg acaatcctga agcccaatga tgccatcaac 720
ttcgagagca atgaaaactt catcgcccc gaatacgctt acaagattgt gaaaaaggc 780
gattccacca tcatgaagtc agaactggag tacggcaact gtaacacaa gtgccagact 840
cccatggcgg ccatcaactc cagcatgcca ttccacaaca tccatccact gaccatcggc 900

```

15

```

gagtgcocca agtacgtgaa gtccaacaga ctggtgctgg ctaccggact gogcaattcc 960
ccacagaggg agagacgcag gaagaagaga 990

```

<210> 39

< 211> 25
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 < 223> cebador VN-F1
 <400> 39
 cagtctgcag gaccagatct gtatc 25
 <210> 40
 < 211> 25
 10 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> cebador VN-R4
 <400> 40
 15 cagtcccggg ctctcttctt cctgc 25
 <210> 41
 < 211> 34
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 < 223> cebador gp64(51)-f
 <400> 41
 gactccccgg gtggaaatca ccatcgtgga gacg 34
 <210> 42
 25 < 211> 34
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>

	< 223> cebador gp64(101)-f	
	<400> 42	
	gactccccgg gatttgctta tgtggagcat cagg	34
	<210> 43	
5	< 211> 34	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador gp64(154)-f	
10	<400> 43	
	gactccccgg gcgcaccaca cgtgcaaca atcg	34
	<210> 44	
	< 211> 34	
	< 212> ADN	
15	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador gp64(201)-f	
	<400> 44	
	gactccccgg gacactgtgc ttcacgaga cggc	34
20	<210> 45	
	< 211> 1701	
	< 212> ADN	
	< 213> virus de la gripe	
	<400> 45	

atggagaaga tcgtgctggt gctggcaata gttagtttgg tcaagtcaga tcagatctgt 60
 attgggtacc acgctaataa ttctacagaa caggtagaca cgatcatgga gaaaaacgtg 120
 accgtcactc atgcgcaaga tattttggag aagacacaca acgggaagct ctgcgatctg 180
 gatgggggta agcctctgat tcttcgggac tgcctcgtgg cgggggtggt gcttggcaac 240
 cctatgigtg atgagttcat caacgtgcct gaatgtctt atattgtga aaaagcgaat 300
 cccgctaacg accttggta ccttggtaac ttoaacgatt acgaagaact caaacacctc 360
 ctcagcagaa tcaatcactt cgaaaaata cagattatc ccaaatcttc ctggtccgac 420
 catgaggcat ccagcggagt atcaagtga tgcctgacc agggcactcc ctcatcttc 480
 cgcaacgtgg tgtgtgat caagaaaaat aacacttacc cgaccatcaa gagaagctac 540
 aacaacacta accaggagga cctgttgatc ctttgggca tacatcatag caacgacgcg 600
 gcagaacaga ccaagcttta ccagaacct acaacatata tcagcgtggg caccagtact 660
 ctaatacaac ggttgggtcc caagatcgt acaaggagta aggtgaatgg gcagagcggg 720
 cgaatggatt tctctggac cattcttaaa ccaatgacg ctataaactt tgagagcaac 780
 ggcaacttta tgcctccga atatgcatac aagattgtga agaagggtga cagcgccatt 840
 gtaaaaagcg aggtggagta cggtaatgt aacacaaagt gccaaacacc tataggggcc 900
 attaatagct caatgccttt ccacaacatt caccactga ctatcgtga atgccccaaa 960
 tacgtgaagt caaacaact ggtactggca acagggtcc ggaattctcc cctgcgcgag 1020
 cggaggagaa agagaggact ttttgggccc attgcaggct tcattgaggg aggtggcag 1080
 ggcatgtag acggatggtg tgggtatcat catagtaacg aacagggatc cggctacgcg 1140
 gccgataagg agtcaaccca gaaggcaatt gacggcgtca caaataaggt caactocata 1200
 attgataaaa tgaacacca gtgcaggcc gtagggcgcg aatttaacaa cctcgaaaga 1260
 aggatcgaga acctgaataa gaagatggag gatgggttcc tcgacgttg gacttataat 1320
 gctgaactct tggtoctcat ggaaaacgaa cgaacacttg actttcacga tagtaacgtc 1380
 aaaaatctgt atgataaagt gcgccttoaa ctacagagaca acgccaagga actcgggaac 1440
 ggggtcctcg agttctatca caaatgcgac aacgaatga tggagagcgt gagaaacggc 1500
 acttatgact accacaata ctctgaggaa gcccgactga agcgagagga aattagtgtt 1560
 gtgaagctgg aaagcatcgg aacctatcaa attttgagta ttactctac agtggcaagc 1620
 tcaactggcg ttgcaatcat ggtggctggc cttagcttgt ggatgtgctc caatggaagc 1680
 ttgcagtgc gaatttgcac c 1701

<210> 46

< 211> 32

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador AH17-F

<400> 46

gactctgcag gatcagatct gtattgggta cc 32

<210> 47

5 < 211> 31

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador AH345-R

10 <400> 47

cgatcccggg ctctctttct cctccgctcg c 31

<210> 48

< 211> 33

< 212> ADN

15 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador AH410-R

<400> 48

cgatcccggg cggcctcgaa ctgggtgttc att 33

20 <210> 49

< 211> 32

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

25 < 223> cebador AH473-R

<400> 49

cgatcccggg cgtctctgag ttgaaggcgc ac 32

<210> 50

< 211> 33

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> cebador AH520-R

<400> 50

cgatcccggg caccactaat ttctctcgc ttc 33

<210> 51

< 211> 1704

10 < 212> ADN

< 213> virus de la gripe

<400> 51

atggagaaaa ttgtcctgct gttcgtctatt gttccctgg ttaaaccga tcagatctgt 60
atcggatata acgcgaataa tagcacagag caagtgata ccattatgga aaagaatgtg 120
actgtgaccc acgctcagga cattctggag aaaaagcaca acggaaaatt gtgcgacctt 180
gatgggtga agccattgat tctgagagac tgcctgtgg ctggatggct gctggggaac 240
cctatgtgog atgagttcat taatgtccc gattggtcct acatagtoga aaaggctaata 300
cctgtcaatg atctttgcta cctggggat ttaataact atgaggagct gaaacatttg 360
ttgagtagaa tcaaccactt tgagaaaac cagatcatcc ccaagagttc ctggtcatct 420
catgaagcaa gccttgggtg gagctcagcc tgccttata aaggcaaac cagcttctt 480
cggaacgtgg tctggctcat caagaaaaa tcaacctata cgactatcaa gagatcctat 540
aacaacacaa atcaggagga tctgttgga ctgtgggca tccaccatcc taacgatga 600
gcagagcaga ccaagctcta ccagaacca actacctata totcgttg aactagcaca 660
ctgaaccaga gattgttacc tagaattgt accgatcca aagtaatgg ccagtcgga 720
agaatggaat tctctggac aattctgaaa ccaatgacg cattaattt cgagtcaaac 780
ggcaatttca ttgtccaga gtatgcttac aagatcgtga aaaagggtga tagtacaatt 840
atgaagagtg agttggagta cggcaactgc aatacaaat gtcaaacacc catggcgct 900
atcaattcat ccatgctt ccacaatac caccctta ctatcgaga gtgcccgaag 960
tatgtcaagt ccaacaggct ggtcctggca actggactgc ggaatagccc gcaacgcga 1020
cggaggagga aaaagcggg actgttga gctattcag gcttcata aggtgttg 1080
caggcgatgg tggacgttg gtatgggtat catcactcca acaacaggg gagcggtat 1140
gccgcagaca aagagtcaac tcagaaggca attgatggag ttacaaaca agtgaatagc 1200
attatcgaca aaatgaatac gcagtttag gctgtcgcc gcgagttcaa taatctggag 1260
cggagaatcg aaaacctgaa caaaaagatg gaggacggct tctggacgt gtggacatat 1320
aacgcagaac tgcctgtgct tatggagaat gaacggaccc tcgatttca cgactccaac 1380
gtaagaatc tctatgaaa agtcaggctc cagcttagag ataacgcaa ggaattggg 1440
aatggatgtt ttgaattcta ccataagtc gacaacgagt gcatggagtc cgtagaaac 1500
ggaacctatg actatccca gtactcagag gaggcaagac taaaagaga ggagattagt 1560
ggtgtgaaac tcgagttcat aggcattat cagatcctga gtatctact tacgtggcg 1620
tcacccctgg cctggccat catggttct ggctgtcac tctgagtg tagtaacggg 1680
agtctgcaat gcagaatatg tatt 1704

<210> 52

< 211> 32

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador VN17-F

<400> 52

gactctgcag gatcagatct gtatcggata tc 32

<210> 53

5 < 211> 33

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador VN346-R

10 <400> 53

cgatcccggg cccgcttttt cctcctccgt tcg 33

<210> 54

< 211> 33

< 212> ADN

15 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador VN410-R

<400> 54

cgatcccggg cctcaaactg cgtattcatt ttg 33

20 <210> 55

< 211> 35

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

25 < 223> cebador VN473-R

<400> 55

cgatcccggg ctctaagctg gagcctgact ttgtc 35

<210> 56

< 211> 34

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> cebador VN520-R

<400> 56

cgatcccggg cactaatctc ctctcttta agtc 34

<210> 57

< 211> 1191

10 < 212> ADN

< 213> Plasmodium falciparum

<400> 57

```

atgatgcgaa aattggccat actgtcagtc agcagcttct tttcgtgga ggccctgttt 60
caggaataacc agtctatgg ttccagctct aatacgcgag ttctgaacga gctgaactac 120
gataacgccg gcaccaacct ctacaatgag ctggagatga attactacgg caagcaggag 180
aattggtact cactcaagaa gaactccaga agtctcgggg agaacgacga cggaaataat 240
gaggacaacg aaaaacttag aaaacccaaa cacaagaaac tgaacaacc tgccgatggt 300
aatctgtatc ctaatgcasa cccaaatgtg gacccaatg ctaacccaa cgctgatccg 360
aacgcgaacc ctaatgtgga tctaacgcc aatccaaacg cgaatccgaa tgccaaccca 420
aacgccaacc caaacgctaa cccaacgcg aacccaacg ctaatccgaa cgccaatccc 480
aatgctaac ccaatgcgaa cctaacgct aatccaaacg caaatccgaa cgcaaacct 540
aacgcaaacc ccaatgcaa cctaacgcc aacccgaatg ccaatcctaa tglggaccgg 600
aacgccaatc cgaatgcaa ccaaatgcc aatccaaacg ctaatcctaa cgccaacccc 660
aacgccaacc ctaatgctaa tccgaatgcg aatccaaatg ctaacccgaa cgctaatcca 720
aatgcaaatc ccaatgcaa tccaatgcg aacccgaatg ctaacccctaa tgcaaatcct 780
aatgcaaacc ctaatgcgaa tccaatgca aacccaata agaataatca gggaaatggc 840
caggacata atatgcctaa tgaccctaac aggaacgttg atgagaacgc gaatgcgaac 900
tctgtgtaa agaacaacaa caatgaagag cctccgata aacatattaa ggagtatctg 960
aataagatcc agaactcctt gtctaccgaa tggccccct gttctgtgac gtgtggtaac 1020
ggaatccagg taaggatcaa acccggcagt gccacaagc caaaggacga gctcgattac 1080
gctaataata ttgaaaagaa aatttgtaag atggagaagt gcagctccgt attcaatgtg 1140
gtcaacagct caattggcct catcatggtt ctttccttct tgttctctaa t 1191

```

<210> 58

< 211> 34

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> cebador PfCSP_opt-f

<400> 58

gactctgcag atgatgcgaa aattggccat actg 34

<210> 59

< 211> 39

10 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP_opt-r(397)

<400> 59

15 cgatcccgagg cattgaggaa cagaaaggaa agaaccatg 39

<210> 60

< 211> 36

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

20 <220>

< 223> cebador PfCSP_opt-f(19)

<400> 60

gactctgcag ctgttcagg aataccagt ctatgg 36

<210> 61

25 < 211> 50

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP_opt-r(373)

<400> 61

cgatcccggg ccttctccat cttacaaaatt ttctttcaa tatcattagc 50

<210> 62

5 < 211> 35

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP_opt-f(76)

10 <400> 62

gactctgcag gacgacggaa ataatgagga caacg 35

<210> 63

< 211> 39

< 212> ADN

15 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> cebador PfCSP_opt-f(205)

<400> 63

gactctgcag aatgcaaacc caaatgccaa tccaaacgc 39

20 <210> 64

< 211> 40

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

25 < 223> cebador gp64-p-f

<400> 64

gactcggacc ggccagataa aaataatctt atcaattaag 40

<210> 65

	< 211> 35	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	< 223> cebador gp64-p-r	
	<400> 65	
	cgatactagt agcactgagg cttcttatat acccg	35
	<210> 66	
	< 211> 38	
10	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	< 223> cebador vp39-p-f	
	<400> 66	
15	gactcggacc gcgtcgtaca aatcgaaata ttgttg	38
	<210> 67	
	< 211> 36	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	< 223> cebador gp64-p-r	
	<400> 67	
	cgatactagt gtgattgaga aagaaatctc ttattc	36
	<210> 68	
25	< 211> 35	
	< 212> ADN	
	< 213> Secuencia Artificial	
	<220>	

< 223> cebador VSV-G-f
 <400> 68
 gactccccgg gcgttcgaac atcctcacat tcaag 35
 <210> 69
 5 < 211> 34
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> cebador VSV-G-r
 10 <400> 69
 gactcactta gtgctttcca agtcggttca tctc 34
 <210> 70
 < 211> 397
 < 212> PRT
 15 < 213> Proteína del XP_001351122 PfCSP
 <400> 70

ES 2 575 679 T3

Met Met Arg Lys Leu Ala Ile Leu Ser Val Ser Ser Phe Leu Phe Val
1 5 10 15

Glu Ala Leu Phe Gln Glu Tyr Gln Cys Tyr Gly Ser Ser Ser Asn Thr
20 25 30

Arg Val Leu Asn Glu Leu Asn Tyr Asp Asn Ala Gly Thr Asn Leu Tyr
35 40 45

Asn Glu Leu Glu Met Asn Tyr Tyr Gly Lys Gln Glu Asn Trp Tyr Ser
50 55 60

Leu Lys Lys Asn Ser Arg Ser Leu Gly Glu Asn Asp Asp Gly Asn Asn
65 70 75 80

Glu Asp Asn Glu Lys Leu Arg Lys Pro Lys His Lys Lys Leu Lys Gln
85 90 95

Pro Ala Asp Gly Asn Pro Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro
100 105 110

Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro
115 120 125

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
130 135 140

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro
145 150 155 160

Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro

ES 2 575 679 T3

165	170	175
Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro		
180	185	190
Asn Ala Asn Pro Asn Val Asp Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro		
195	200	205
Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro		
210	215	220
Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro		
225	230	235
240		
Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro		
245	250	255
Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro Asn Ala Asn Pro		
260	265	270
Asn Lys Asn Asn Gln Gly Asn Gly Gln Gly His Asn Met Pro Asn Asp		
275	280	285
Pro Asn Arg Asn Val Asp Glu Asn Ala Asn Ala Asn Ser Ala Val Lys		
290	295	300
Asn Asn Asn Asn Glu Glu Pro Ser Asp Lys His Ile Lys Glu Tyr Leu		
305	310	315
320		
Asn Lys Ile Gln Asn Ser Leu Ser Thr Glu Trp Ser Pro Cys Ser Val		
325	330	335
Thr Cys Gly Asn Gly Ile Gln Val Arg Ile Lys Pro Gly Ser Ala Asn		
340	345	350
Lys Pro Lys Asp Glu Leu Asp Tyr Ala Asn Asp Ile Glu Lys Lys Ile		
355	360	365
Cys Lys Met Glu Lys Cys Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn Ser Ser		
370	375	380
Ile Gly Leu Ile Met Val Leu Ser Phe Leu Phe Leu Asn		
385	390	395

<210> 71

< 211> 567

< 212> PRT

5 < 213> proteína ABD28180 de HA/A/Anhui/1/2005

<400> 71

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Leu Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Ala Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asn Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Asp His Glu Ala Ser
130 135 140

Ser Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Thr Pro Ser Phe Phe
145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn Thr Tyr Pro Thr Ile
165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Ile Leu Trp
180 185 190

Gly Ile His His Ser Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
210 215 220

Leu Val Pro Lys Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
225 230 235 240

Arg Met Asp Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
245 250 255

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
260 265 270

Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Val Lys Ser Glu Val Glu Tyr Gly
275 280 285

Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly Ala Ile Asn Ser Ser
290 295 300

Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
305 310 315 320

Tyr Val Lys Ser Asn Lys Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
325 330 335

Pro Leu Arg Glu Arg Arg Arg Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala
340 345 350

Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr Gly
355 360 365

Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys Glu
370 375 380

Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser Ile
385 390 395 400

Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe Asn
405 410 415

Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp Gly
420 425 430

Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met Glu
435 440 445

Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu Tyr
450 455 460

Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly Asn
465 470 475 480

Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu Ser
485 490 495

Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala Arg
500 505 510

Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly Thr
515 520 525

Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala Leu
530 535 540

Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly Ser
545 550 555 560

Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 72

< 211> 568

< 212> PRT

5 < 213> proteína AAW80717 de HA/A/Vietnam/1203/2004

<400> 72

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
35 40 45

Leu Glu Lys Lys His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
130 135 140

ES 2 575 679 T3

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160
 Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175
 Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190
 Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205
 Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220
 Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240
 Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255
 Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400

Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
405 410 415

Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
420 425 430

Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
435 440 445

Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
450 455 460

Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
465 470 475 480

Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
485 490 495

Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
500 505 510

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565

<210> 73

< 211> 1720

< 212> PRT

5 < 213> proteína XP_001352170 de PfMSP1

<400> 73

Met Lys Ile Ile Phe Phe Leu Cys Ser Phe Leu Phe Phe Ile Ile Asn
1 5 10 15

Thr Gln Cys Val Thr His Glu Ser Tyr Gln Glu Leu Val Lys Lys Leu
20 25 30

Glu Ala Leu Glu Asp Ala Val Leu Thr Gly Tyr Ser Leu Phe Gln Lys
35 40 45

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

ES 2 575 679 T3

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

ES 2 575 679 T3

Gln Arg Tyr Asn Asn Lys Phe Ser Ser Ser Asn Asn Ser Val Tyr Asn
545 550 555 560

Val Gln Lys Leu Lys Lys Ala Leu Ser Tyr Leu Glu Asp Tyr Ser Leu
565 570 575

Arg Lys Gly Ile Ser Glu Lys Asp Phe Asn His Tyr Tyr Thr Leu Lys
580 585 590

Thr Gly Leu Glu Ala Asp Ile Lys Lys Leu Thr Glu Glu Ile Lys Ser
595 600 605

Ser Glu Asn Lys Ile Leu Glu Lys Asn Phe Lys Gly Leu Thr His Ser
610 615 620

Ala Asn Gly Ser Leu Glu Val Ser Asp Ile Val Lys Leu Gln Val Gln
625 630 635 640

Lys Val Leu Leu Ile Lys Lys Ile Glu Asp Leu Arg Lys Ile Glu Leu
645 650 655

Phe Leu Lys Asn Ala Gln Leu Lys Asp Ser Ile His Val Pro Asn Ile
660 665 670

Tyr Lys Pro Gln Asn Lys Pro Glu Pro Tyr Tyr Leu Ile Val Leu Lys
675 680 685

Lys Glu Val Asp Lys Leu Lys Glu Phe Ile Pro Lys Val Lys Asp Met
690 695 700

Leu Lys Lys Glu Gln Ala Val Leu Ser Ser Ile Thr Gln Pro Leu Val
705 710 715 720

Ala Ala Ser Glu Thr Thr Glu Asp Gly Gly His Ser Thr His Thr Leu
725 730 735

Ser Gln Ser Gly Glu Thr Glu Val Thr Glu Glu Thr Glu Glu Thr Glu
740 745 750

Glu Thr Val Gly His Thr Thr Thr Val Thr Ile Thr Leu Pro Pro Thr
755 760 765

Gln Pro Ser Pro Pro Lys Glu Val Lys Val Val Glu Asn Ser Ile Glu
770 775 780

His Lys Ser Asn Asp Asn Ser Gln Ala Leu Thr Lys Thr Val Tyr Leu
785 790 795 800

ES 2 575 679 T3

Lys Lys Leu Asp Glu Phe Leu Thr Lys Ser Tyr Ile Cys His Lys Tyr
 805 810 815
 Ile Leu Val Ser Asn Ser Ser Met Asp Gln Lys Leu Leu Glu Val Tyr
 820 825 830
 Asn Leu Thr Pro Glu Glu Glu Asn Glu Leu Lys Ser Cys Asp Pro Leu
 835 840 845
 Asp Leu Leu Phe Asn Ile Gln Asn Asn Ile Pro Ala Met Tyr Ser Leu
 850 855 860
 Tyr Asp Ser Met Asn Asn Asp Leu Gln His Leu Phe Phe Glu Leu Tyr
 865 870 875 880
 Gln Lys Glu Met Ile Tyr Tyr Leu His Lys Leu Lys Glu Glu Asn His
 885 890 895
 Ile Lys Lys Leu Leu Glu Glu Gln Lys Gln Ile Thr Gly Thr Ser Ser
 900 905 910
 Thr Ser Ser Pro Gly Asn Thr Thr Val Asn Thr Ala Gln Ser Ala Thr
 915 920 925
 His Ser Asn Ser Gln Asn Gln Gln Ser Asn Ala Ser Ser Thr Asn Thr
 930 935 940
 Gln Asn Gly Val Ala Val Ser Ser Gly Pro Ala Val Val Glu Glu Ser
 945 950 955 960
 His Asp Pro Leu Thr Val Leu Ser Ile Ser Asn Asp Leu Lys Gly Ile
 965 970 975
 Val Ser Leu Leu Asn Leu Gly Asn Lys Thr Lys Val Pro Asn Pro Leu
 980 985 990
 Thr Ile Ser Thr Thr Glu Met Glu Lys Phe Tyr Glu Asn Ile Leu Lys
 995 1000 1005
 Asn Asn Asp Thr Tyr Phe Asn Asp Asp Ile Lys Gln Phe Val Lys
 1010 1015 1020
 Ser Asn Ser Lys Val Ile Thr Gly Leu Thr Glu Thr Gln Lys Asn
 1025 1030 1035
 Ala Leu Asn Asp Glu Ile Lys Lys Leu Lys Asp Thr Leu Gln Leu
 1040 1045 1050

ES 2 575 679 T3

Ser Phe Asp Leu Tyr Asn Lys Tyr Lys Leu Lys Leu Asp Arg Leu
 1055 1060 1065
 Phe Asn Lys Lys Lys Glu Leu Gly Gln Asp Lys Met Gln Ile Lys
 1070 1075 1080
 Lys Leu Thr Leu Leu Lys Glu Gln Leu Glu Ser Lys Leu Asn Ser
 1085 1090 1095
 Leu Asn Asn Pro His Asn Val Leu Gln Asn Phe Ser Val Phe Phe
 1100 1105 1110
 Asn Lys Lys Lys Glu Ala Glu Ile Ala Glu Thr Glu Asn Thr Leu
 1115 1120 1125
 Glu Asn Thr Lys Ile Leu Leu Lys His Tyr Lys Gly Leu Val Lys
 1130 1135 1140
 Tyr Tyr Asn Gly Glu Ser Ser Pro Leu Lys Thr Leu Ser Glu Val
 1145 1150 1155
 Ser Ile Gln Thr Glu Asp Asn Tyr Ala Asn Leu Glu Lys Phe Arg
 1160 1165 1170
 Val Leu Ser Lys Ile Asp Gly Lys Leu Asn Asp Asn Leu His Leu
 1175 1180 1185
 Gly Lys Lys Lys Leu Ser Phe Leu Ser Ser Gly Leu His His Leu
 1190 1195 1200
 Ile Thr Glu Leu Lys Glu Val Ile Lys Asn Lys Asn Tyr Thr Gly
 1205 1210 1215
 Asn Ser Pro Ser Glu Asn Asn Lys Lys Val Asn Glu Ala Leu Lys
 1220 1225 1230
 Ser Tyr Glu Asn Phe Leu Pro Glu Ala Lys Val Thr Thr Val Val
 1235 1240 1245
 Thr Pro Pro Gln Pro Asp Val Thr Pro Ser Pro Leu Ser Val Arg
 1250 1255 1260
 Val Ser Gly Ser Ser Gly Ser Thr Lys Glu Glu Thr Gln Ile Pro
 1265 1270 1275
 Thr Ser Gly Ser Leu Leu Thr Glu Leu Gln Gln Val Val Gln Leu

ES 2 575 679 T3

1280	1285	1290
Gln Asn Tyr Asp Glu Glu Asp	Asp Ser Leu Val Val	Leu Pro Ile
1295	1300	1305
Phe Gly Glu Ser Glu Asp Asn	Asp Glu Tyr Leu Asp	Gln Val Val
1310	1315	1320
Thr Gly Glu Ala Ile Ser Val	Thr Met Asp Asn Ile	Leu Ser Gly
1325	1330	1335
Phe Glu Asn Glu Tyr Asp Val	Ile Tyr Leu Lys Pro	Leu Ala Gly
1340	1345	1350
Val Tyr Arg Ser Leu Lys Lys	Gln Ile Glu Lys Asn	Ile Phe Thr
1355	1360	1365
Phe Asn Leu Asn Leu Asn Asp	Ile Leu Asn Ser Arg	Leu Lys Lys
1370	1375	1380
Arg Lys Tyr Phe Leu Asp Val	Leu Glu Ser Asp Leu	Met Gln Phe
1385	1390	1395
Lys His Ile Ser Ser Asn Glu	Tyr Ile Ile Glu Asp	Ser Phe Lys
1400	1405	1410
Leu Leu Asn Ser Glu Gln Lys	Asn Thr Leu Leu Lys	Ser Tyr Lys
1415	1420	1425
Tyr Ile Lys Glu Ser Val Glu	Asn Asp Ile Lys Phe	Ala Gln Glu
1430	1435	1440
Gly Ile Ser Tyr Tyr Glu Lys	Val Leu Ala Lys Tyr	Lys Asp Asp
1445	1450	1455
Leu Glu Ser Ile Lys Lys Val	Ile Lys Glu Glu Lys	Glu Lys Phe
1460	1465	1470
Pro Ser Ser Pro Pro Thr Thr	Pro Pro Ser Pro Ala	Lys Thr Asp
1475	1480	1485
Glu Gln Lys Lys Glu Ser Lys	Phe Leu Pro Phe Leu	Thr Asn Ile
1490	1495	1500
Glu Thr Leu Tyr Asn Asn Leu	Val Asn Lys Ile Asp	Asp Tyr Leu
1505	1510	1515

Ile Asn Leu Lys Ala Lys Ile Asn Asp Cys Asn Val Glu Lys Asp
1520 1525 1530

Glu Ala His Val Lys Ile Thr Lys Leu Ser Asp Leu Lys Ala Ile
1535 1540 1545

Asp Asp Lys Ile Asp Leu Phe Lys Asn Pro Tyr Asp Phe Glu Ala
1550 1555 1560

Ile Lys Lys Leu Ile Asn Asp Asp Thr Lys Lys Asp Met Leu Gly
1565 1570 1575

Lys Leu Leu Ser Thr Gly Leu Val Gln Asn Phe Pro Asn Thr Ile
1580 1585 1590

Ile Ser Lys Leu Ile Glu Gly Lys Phe Gln Asp Met Leu Asn Ile
1595 1600 1605

Ser Gln His Gln Cys Val Lys Lys Gln Cys Pro Glu Asn Ser Gly
1610 1615 1620

Cys Phe Arg His Leu Asp Glu Arg Glu Glu Cys Lys Cys Leu Leu
1625 1630 1635

Asn Tyr Lys Gln Glu Gly Asp Lys Cys Val Glu Asn Pro Asn Pro
1640 1645 1650

Thr Cys Asn Glu Asn Asn Gly Gly Cys Asp Ala Asp Ala Thr Cys
1655 1660 1665

Thr Glu Glu Asp Ser Gly Ser Ser Arg Lys Lys Ile Thr Cys Glu
1670 1675 1680

Cys Thr Lys Pro Asp Ser Tyr Pro Leu Phe Asp Gly Ile Phe Cys
1685 1690 1695

Ser Ser Ser Asn Phe Leu Gly Ile Ser Phe Leu Leu Ile Leu Met
1700 1705 1710

Leu Ile Leu Tyr Ser Phe Ile
1715 1720

<210> 74

< 211> 217

< 212> PRT

5 < 213> proteína XP_001347587 de Pfs25

<400> 74

Met Asn Lys Leu Tyr Ser Leu Phe Leu Phe Leu Phe Ile Gln Leu Ser
1 5 10 15

Ile Lys Tyr Asn Asn Ala Lys Val Thr Val Asp Thr Val Cys Lys Arg
20 25 30

Gly Phe Leu Ile Gln Met Ser Gly His Leu Glu Cys Lys Cys Glu Asn
35 40 45

Asp Leu Val Leu Val Asn Glu Glu Thr Cys Glu Glu Lys Val Leu Lys
50 55 60

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

Ile Lys Ile Asp Gly Asn Pro Val Ser Tyr Ala Cys Lys Cys Asn Leu
85 90 95

Gly Tyr Asp Met Val Asn Asn Val Cys Ile Pro Asn Glu Cys Lys Asn
100 105 110

Val Thr Cys Gly Asn Gly Lys Cys Ile Leu Asp Thr Ser Asn Pro Val
115 120 125

Lys Thr Gly Val Cys Ser Cys Asn Ile Gly Lys Val Pro Asn Val Gln
130 135 140

Asp Gln Asn Lys Cys Ser Lys Asp Gly Glu Thr Lys Cys Ser Leu Lys
145 150 155 160

Cys Leu Lys Glu Asn Glu Thr Cys Lys Ala Val Asp Gly Ile Tyr Lys
165 170 175

Cys Asp Cys Lys Asp Gly Phe Ile Ile Asp Asn Glu Ser Ser Ile Cys
180 185 190

Thr Ala Phe Ser Ala Tyr Asn Ile Leu Asn Leu Ser Ile Met Phe Ile
195 200 205

Leu Phe Ser Val Cys Phe Phe Ile Met
210 215

<210> 75

< 211> 1194

< 212> ADN

5 < 213> gen XM_001351086 de PfCSP

<400> 75

atgatgagaa aattagctat ttatctgtt tcttcctttt tattttgtga ggccttattc 60

caggaatacc agtgctatgg aagttcgtca aacacaaggg ttctaatga attaaattat 120
gataatgcag gcaactaattt atataatgaa ttagaaatga attattatgg gaaacaggaa 180
aattggtata gtcttaaaaa aaatagtaga tcacttggag aaaatgatga tggaataac 240
gaagacaacg agaaattaag gaaacaaaa cataaaaaat taaagcaacc agcggatggt 300
aatcctgata caaatgcaaa cccaaatgta gatcccaatg ccaacccaaa ttagatcca 360
aatgcaaac caaatgtaga tccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccca 420
aatgcaaac caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccca 480
aatgcaaac caaatgcaaa cccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa tgcaaaccca 540
aatgcaaac ccaatgcaaa tccaaatgca aacccaaatg caaacccaaa cgtatgctct 600
aatgcaatc caaatgcaaa cccaaacgca aaccccaatg caaatccaa tgcaaacccc 660
aatgcaatc ctaatgcaaa tccaaatgcc aatccaaatg caaatccaa tgcaaaccca 720
aacgcaaac ccaatgcaaa tccaaatgcc aatccaaatg caaatccaa tgcaaaccca 780
aatgcaaac caaatgcaaa cccaaatgca aatccaaatg caaatccaa aggtaatgga 840
caaggtcaca atatgccaaa tgacccaaac cgaatgtag atgaaatgc taatgccaac 900
agtgctgtaa aaaataataa taacgaagaa ccaagtata agcacataaa agaatttta 960
aacaataac aaaattctct ttcaactgaa tggccccat gtagtgtaac ttgtggaat 1020
ggtattcaag ttagaataaa gcttggtctt gctaataac ctaaagacga attagattat 1080
gcaaatgata ttgaaaaaaa aatttgtaa atggaaaaat gttccagtgt gtttaatgtc 1140
gtaaatagtt caataggatt aataatgta ttatcctctt tttccttaa ttag 1194

<210> 76

< 211> 1704

< 212> ADN

5 < 213> gen DQ371928 de HA/A/Anhui/1/2005

<400> 76

atggagaaaa tagtgcttct tottgcaata gtcagccttg ttaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaaaaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagacacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctgat tttaagagat ttagtgtag ctggatggct cctcggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtgccg gaatgtctt acatagtga gaaggccaac 300
ccagccaatg acctctgta cccagggaa ttcaacgact atgaagaact gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagtgc ttgtccgat 420
catgaagcct catcaggggt gagctcagca tgcataacc agggaaacgc ctctttttc 480
agaaatgttg tatggcttat caaaaagaac aatacatacc caacaataaa gagaagctac 540

aataatacca accaggaaga tcttttgata ctgtggggga ttcatcattc taatgatgcg 600
gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata ttccgttg gacatcaaca 660
ctaaaccaga gattgtgacc aaaaatagct actagatcca aagtaacgg gcaaagtga 720
aggatggatt tottctggac aattttaaaa ccgaatgat caatcaactt cgagagtaat 780
ggaaatttca ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcagcaatt 840
gttaaaagt aagtgggaata tggtaactgc aacacaaagt gtcaaaactc aataggggcg 900
ataaactcta gtatgccatt ccaacaata caccctctca ccatcgggga atgccccaaa 960
tatgtgaaat caaacaatt agtccttgcg actgggctca gaaatagtcc tctaagagaa 1020
agaagaagaa aaagaggact atttgagct atagcagggt ttatagaggg aggatggcag 1080
ggaatgtag atggttgga tgggtaccac catagcaatg agcaggggag tgggtacgct 1140
gcagacaaag aatccactca aaaggcaata gatggagtca ccaataaggt caactcgtc 1200
attgacaaaa tgaacactca gtttgaggcc gttggaagg aatttaataa cttagaaagg 1260
agaatagaga atttaacaa gaaaatggaa gacggattcc tagatgtctg gacttataat 1320
gctgaacttc tggttctcat ggaaaatgag agaactctag acttccatga ttcaaatgtc 1380
aagaaccttt acgacaaggt ccgactacag cttagggata atgcaaagga gctgggtaac 1440
ggttgttctg agttctatca caaatgtgat aatgaatga tggaaagtgt aagaacgga 1500
acgtatgact acccgagta ttcaagaagaa gcaagattaa aaagagagga aataagtga 1560
gtaaaattgg aatcaatagg aacttaccaa atactgtcaa ttattcaac agttgcgagt 1620
tctctagcac tggcaatcat ggtggctggt ctatctttgt ggatgtgctc caatgggtcg 1680
ttacaatgca gaatttgcatt ttaa 1704

<210> 77

< 211> 1707

< 212> ADN

5 < 213> gen AY818135 de HA/A/Vietnam/1203/2004

<400> 77

atggagaaaa tagtgottct ttttgcaata gtcagtcttg ttaaagtga tcagatttgc 60
attggttacc atgcaaacaa ctgcacagag caggttgaca caataatgga aaagaacgtt 120
actgttacac atgccaaga catactggaa aagaacaca acgggaagct ctgcgatcta 180
gatggagtga agcctctaatt ttgagagat ttagcgtag ctggatggct cctcggaac 240
ccaatgtgtg acgaattcat caatgtccg gaatggtctt acatagtga gaaggccaat 300
ccagtcaatg acctctgtta ccaggggat ttcaatgact atgaagaatt gaaacaccta 360
ttgagcagaa taaaccattt tgagaaaatt cagatcatcc ccaaaagttc ttggtccagt 420
catgaagcct cattaggggt gagctcagca tctccatacc agggaaagtc ctccttttc 480

agaaatgtgg tatggcttat caaaaagaac agtacatacc caacaataaa gaggagctac 540
 aataatacca accaagaaga tcttttggta ctgtggggga ttaccatcc taatgatgcg 600
 gcagagcaga caaagctcta tcaaaaccca accacctata ttccgttgg gacatcaaca 660
 ctaaaccaga gatttgtacc aagaatagct actagatcca aagtaaaccg gcaaagtgga 720
 aggatggagt tcttctggac aattttaag ccgaatgatg caatcaactt cgagagtaat 780
 ggaaattica ttgctccaga atatgcatac aaaattgtca agaaagggga ctcaacaatt 840
 atgaaaagtg aattggaata tggtaactgc aacaccaagt gtcaaaactcc aatgggggcg 900
 ataaactota gcatgccatt ccacaatata caccctctca ccattgggga atgccccaaa 960
 tatgtgaaat caaacagatt agtccttgcg actgggctca gaaatagccc tcaagagag 1020
 agaagaagaa aaaagagagg attatttga gctatagcag gttttataga gggaggatgg 1080
 cagggaatgg tagatgggtg gtatgggtac caccatagca atgagcaggg gagtgggtac 1140
 gctgcagaca aagaatccac tcaaaaggca atagatggag tcaccaataa ggtcaactcg 1200
 atcattgaca aatgaacac tcagtttgag gccgttggaa ggggaattta caacttagaa 1260
 aggagaatag agaatttaaa caagaagatg gaagacgggt tccatagatgt ctggacttat 1320
 aatgctgaac ttctgttct catggaaaat gagagaactc tagacttica tgactcaaat 1380
 gtcaagaacc ttacgacaa ggtccgacta cagcttaggg ataatgcaa ggagctgggt 1440
 aacggttgtt tcgagttcta tcataaatgt gataatgaat gtatggaaag tgtaagaaat 1500
 ggaacgatg actaccgca gtattcagaa gaagcgagac taaaagaga ggaaataagt 1560
 ggagtaaaat tggaaatcaat aggaatttac caaatactgt caatttattc tacagtggcg 1620
 agttccctag cactggcaat catggtagct ggtctatcct tatggatgtg ctccaatgga 1680
 tctttacaat gcagaatttg catttaa 1707

<210> 78

< 211> 5163

< 212> ADN

5 < 213> gen XM_001352134 de PfMSP1

<400> 78

atgaagatca tattottttt atgttcattt cttttttta ttataaatac acaatgtgta 60
 acacatgaaa gttatcaaga acttgcataa aaactagaag ctttagaaga tgcaagtattg 120
 acagggtata gtttatttca aaaggaaaaa atggtattaa atgaagaaga aattactaca 180
 aaaggtgcaa gtgctcaaag tgggtcaagt gctcaaagtg gtgcaagtgc tcaaagtgg 240
 gcaagtgtc aaagtgggtc aagtgtcaca agtgggtcaa gtgctcaaag tggtaacaagt 300
 ggtccaagt gtccaagtgg tacaagtcca tcatctcgtt caaacacttt acctcgttca 360
 aatacttcat ctgggtcaag cctccagct gatgcaagcg attcagatgc taaatcttac 420

gotgatttaa aacacagagt acgaaattac ttgttacta ttaaagaact caaatatccc 480
 gaactctttg atttaaccaa tcatagtta actttgtgtg ataattatca tggtttcaaa 540
 tatttaattg atggatatga agaaattaat gaattattat ataaattaaa cttttatttt 600
 gatttattaa gagcaaaatt aaatgatgta tgtgctaag attattgtca aataccttcc 660
 aatcttaaaa ttctgtcaaa tgaattagac gtacttaaaa aacttgtgtt cggatataga 720
 aaaccattag acaatattaa agataatgta gaaaaaatgg aagattacat taaaaaaaat 780
 aaaacaacca tagcaaatat aaatgaatta attgaaggaa gtaagaaaac aattgatcaa 840
 aataagaatg cagataatga agaagggaaa aaaaaattat accaagctca atatgatctt 900
 tctatttaca ataaacaatt agaagaagca cataatttaa taagcgtttt agaaaaacgt 960
 attgacactt taaaaaaaaa tgaaaacata aagaaattac ttgataagat aaatgaatt 1020
 aaaaatcccc caccggccaa ttctggaaat acaccaaata ctctccttga taagaacaaa 1080
 aaaatcgagg aacacgaaga aaaaataaaa gaaattgcc aactattaa atttaacatt 1140
 gatagtttat ttactgatcc acttgaatta gaattattat taagagaaaa aaataaaaaa 1200
 gttgatgtaa cacctaaatc acaagatcct acgaaatctg ttcaaatacc aaaagtctct 1260
 tatccaaatg gtattgtata tctttacca ctactgata ttcataatc attagctgca 1320
 gataatgata aaaattcata tggtgattta atgaatcctc atactaaaga aaaaattaat 1380
 gaaaaaatta ttacagataa taaggaaaga aaaatattca ttaataacat taaaaaaaaa 1440
 attgatttag aagaaaaaaa catlaatcac acaaaagaac aaaataaaaa attacttgaa 1500
 gattatgaaa agtcaaaaaa ggattatgaa gaattacttg aaaaatttta tgaaatgaaa 1560
 ttttaataa attttaacaa agatgtcgta gataaaatat tcagtgcag atatacatat 1620
 aatgttgaaa aacaaagata taataataaa ttttctcct ctaataatc tgtatataat 1680
 gttcaaaaat taaaaaagcg tctttcatat ctgaagatt attctttaag aaaaggaatt 1740
 tctgaaaaag attttaatca ttattatact ttgaaaactg gcctcgaagc tgatataaaa 1800
 aaattaacag aagaaataaa gagtagtgaa aacaaaatc tagaaaaaaa ttttaaagga 1860
 ctaacacatt cagcaaatgg ttctttagaa gtatctgata ttgtaaaatt acaagtacaa 1920
 aaagttttat taattaaaaa aatagaagac ttaagaaaga tagaattatt tttaaaaaat 1980
 gcacaactaa aagatagtat tcatgtacca aatatttata aaccacaaa taaaccagaa 2040
 ccatattatt taattgtatt aaaaaagaa gtagataaat taaaagaatt tataccaaaa 2100
 gtaaaagaca tgttaaagaa agaacaagct gtcttatcaa gtattacaca accttagtt 2160
 gcagcaagcg aaacaactga agatgggggt cactccacac acacattatc ccaatcagga 2220
 gaaacagaag taacagaaga aacagaagaa acagaagaaa cagtaggaca cacaacaag 2280

gtaacaataa cattaccacc aacacaacca tcaccacca aagaagtaaa agttgtttaa 2340
 aattcaatag aacataagag taatgacaat tcacaagcct tgacaaaaac agtttatcta 2400
 aagaalttag atgaattttt aactaaatca tatatatgtc ataatatata tttagtatca 2460
 aactctagta tggacaaaaa attattagag gtatataatc ttactccaga agaagaaaat 2520
 gaattaaaat catgtgatcc attagattta ttatttaata ttcaaaataa catacctgct 2580
 atgtattcat tatatgatag taigaacaat gatttacaac atctcttttt tgaattatat 2640
 caaaaggaaa tgatttatta ttacataaa ctaaaagagg aaaatcacat caaaaaatta 2700
 ttagaggagc aaaaacaaat aactggaaca tcactacat ccagtcctgg aaatacaacc 2760
 gtaaatactg ctcaatccgc aactcacagt aattccaaaa accaacaatc aaatgcaccc 2820
 tctaccaata cccaaaatgg ttagctgta tcactgggc ctgctgtagt tgaagaaagt 2880
 catgatccct taacagtatt gtctattagt aacgatttga aaggtattgt tagtctctta 2940
 aatcttgaa ataaaactaa agtacctaatt ccattaacca ttctacaac agagatggaa 3000
 aaattttat agaatttttt aaaaaataat gatacctatt ttaatgatga tatcaacaa 3060
 ttctgtaaat ctattcaaa agtaattaca ggttgaccg aaacacaaaa aaatgcatta 3120
 aatgatgaaa ttaaaaaatt aaaagatact ttacagttat catttgattt atataataa 3180
 tataaattaa aattagatag attatttaat aagaaaaag aacttggcca agacaaaatg 3240
 caaattaaaa aacttacttt attaaaagaa caattagaat caaattgaa ttacttaat 3300
 aaccacata atgtattaca aaactttct gtttcttta aaaaaaaaaa agaagcigaa 3360
 atagcagaaa ctgaaaacac attagaaaac acaaaaatat tattgaaaca ttataagga 3420
 cttgttaaat attataatgg tgaatcatct ccattaaaaa ctttaagtga agtatcaatt 3480
 caaacagaag ataattatgc caatttagaa aaatttagag tattaagtaa aatagatgga 3540
 aaactcaatg ataatttaca tttaggaaag aaaaaattat ctttcttato aagtggatta 3600
 catcatttaa ttactgaatt aaaagaagta ataaaaata aaaattatc aggttaattct 3660
 ccaagtgaat ataataagaa agttaacgaa gctttaaat ctacgaaaa tttctccca 3720
 gaagcaaaa ttacaacagt tgtaactcca cctcaaccag atgtaactcc atctccatta 3780
 tctgtaaggg taagtggtag tttaggatcc acaaaagaag aaacacaaat accaacttca 3840
 ggtctttat taacagaatt acaacaagta gtacaattac aaaattatga cgaagaagat 3900
 gattccttag ttgtattacc catttttgga gaatccgaag ataagacga atatitagat 3960
 caagtagtaa ctggagaagc aatatctgtc acaatggata atactctctc aggtttgaa 4020
 aatgaatatg atgttatata tttaaacct tttagctgag tatatagaag cttaaaaaaa 4080
 caaattgaaa aaacatttt tacatttaatt ttaaatttga acgatactct aaattcacgt 4140
 cttagaagaa gaaaataatt cttagatgta ttgaactg atttaagca atttaaacat 4200

atatacctcaa atgaatacat tattgaagat tcatttaaatt tattgaattc agaacaaaaa 4260
aacacacttt taaaaagtta caaatatata aaagaatcag tagaaatga tattaaattt 4320
gcacaggaag gtataagttt ttatgaaaag gttttagcga aatataagga tgatttagaa 4380
tcaattaaaa aagttatcaa agaagaaaag gagaagttcc catcatcacc accaacaaca 4440
cctccgtcac cagcaaaaac agacgaacaa aagaaggaaa gtaagttcct tccattttta 4500
acaaacattg agaccctata caataactta gttataaaaa ttgacgatta cttaattaac 4560
ttaaggcaa agattaacga ttgtaattgt gaaaaagatg aagcacatgt taaaataact 4620
aaacttagtg atttaaaagc aattgatgac aaaatagatc ttttaaaaa ccottacgac 4680
ttcgaagcaa ttaaaaaatt gataaatgat gatacgaaaa aagatatgct lggcaaatta 4740
cttagtacag gattagttca aaattttcct aatacaataa tatcaaaatt aattgaagga 4800
aaattccaag atatgttaa catttcacaa caccaatgcg taaaaaaca atgtccagaa 4860
aattctggat gtttcagaca tttagatgaa agagaagaat gtaaatgttt attaaattac 4920
aaacaagaag gtgataaatg tgttgaanaa ccaaatccta ctgttaacga aaataatggt 4980
ggatgtgatg cagatgccac atgtaccgaa gaagattcag gtacgagcag aaagaaaatc 5040
acatgtgaat gtactaaacc tgattcttat ccacttttcg atggtatttt ctgcagttcc 5100
tctaacttct taggaatatc attcttatta atactcatgt taatattata cagtttcatt 5160
taa 5163

<210> 79

< 211> 654

< 212> ADN

5 < 213> gen XM_001347551 de Pfs25

<400> 79

atgaataaac ttacagttt gtttttttc cttttcattc aacttagcat aaaatataat 60
aatgcgaaag ttaccgtgga tactgtatgc aaaagaggat ttttaattca gatgagtgtt 120
catttggaat gtaaatgtga aaatgatttg gtgttagtaa atgaagaaac atgtgaagaa 180
aaagttctga aatgtgacga aaagactgta aataaaccat gtggagattt ttccaaatgt 240
attaaaatag atggaatcc cgtttcatac gottgtaaat gtaattcttg atatgatatg 300
gtaataatg tttgtatacc aaatgaatgt aagaatgtaa ctgttggtaa cggtaatgt 360
atattagata caagcaatcc tgttaaaact ggagtttgc catgtaatat aggcgaagtt 420
cccaatgtac aagatcaaaa taaatgttca aaagatggag aaaccaaatg ctcattaaaa 480
tgcttaaaag aaaatgaaac ctgtaaagct gttgatggaa tttataaatg tgattgtaaa 540
gatggattta taatagataa tgaaagctct atatgtactg cttttcagc atataatatt 600
ttaaactcaa gcattatgtt tatactattt tcagtatgct ttttataat gtaa 654

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un virus de nucleopoliedrosis de *Autographa californica* (AcNPV) recombinante como un agente activo y, opcionalmente, un vehículo farmacéuticamente aceptable,

5 en donde el AcNPV recombinante contiene una estructura génica que tiene un gen de fusión de

(A) un gen que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 19-373 de SEQ ID NO:70 (proteína de circumesporozoítos de *Plasmodium falciparum*; PfCSP) y

10 (B) un gen que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 21-512 de la proteína de partículas virales gp64 (gp64) codificada en el genoma de AcNPV (Nº Registro del GenBank L22858)

bajo el control de un promotor doble que comprende promotor de poliedrina y promotor de CAG conectados entre sí (CAP).

2. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, que es una vacuna para la malaria.

Fig.1

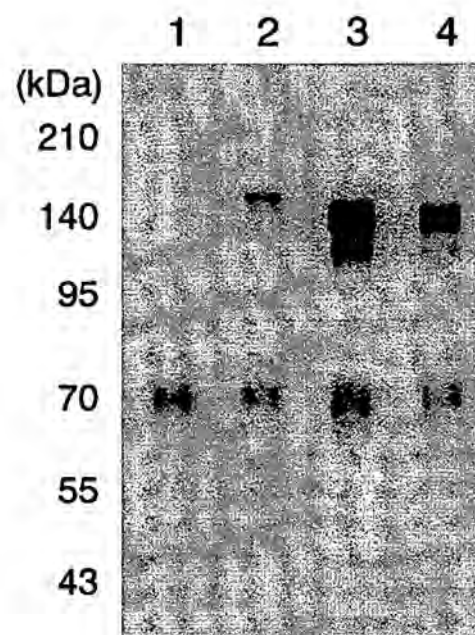


Fig.2(A)

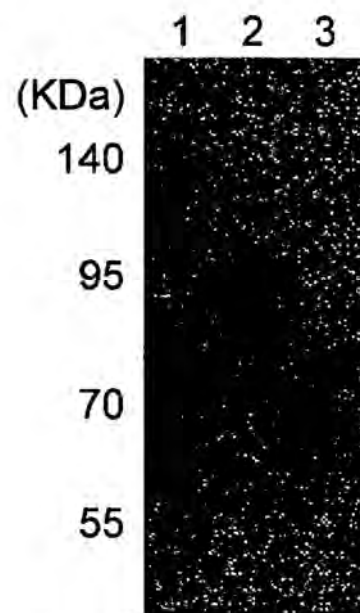


Fig.2(B)

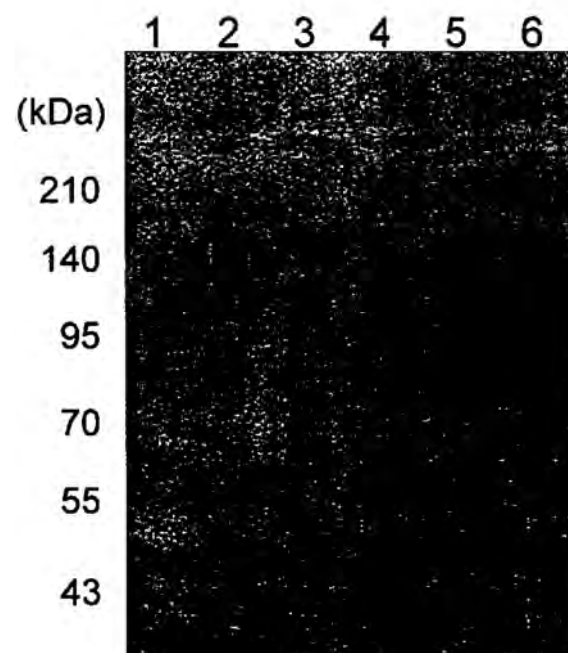
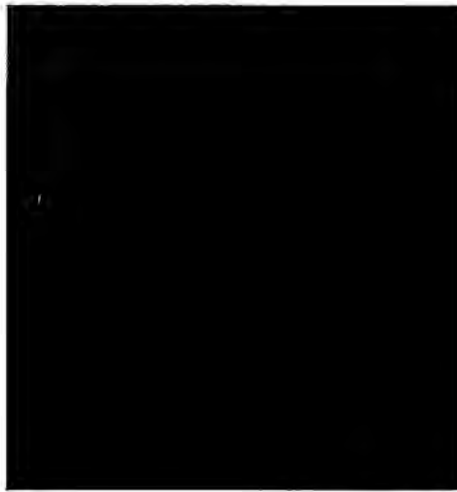


Fig.3

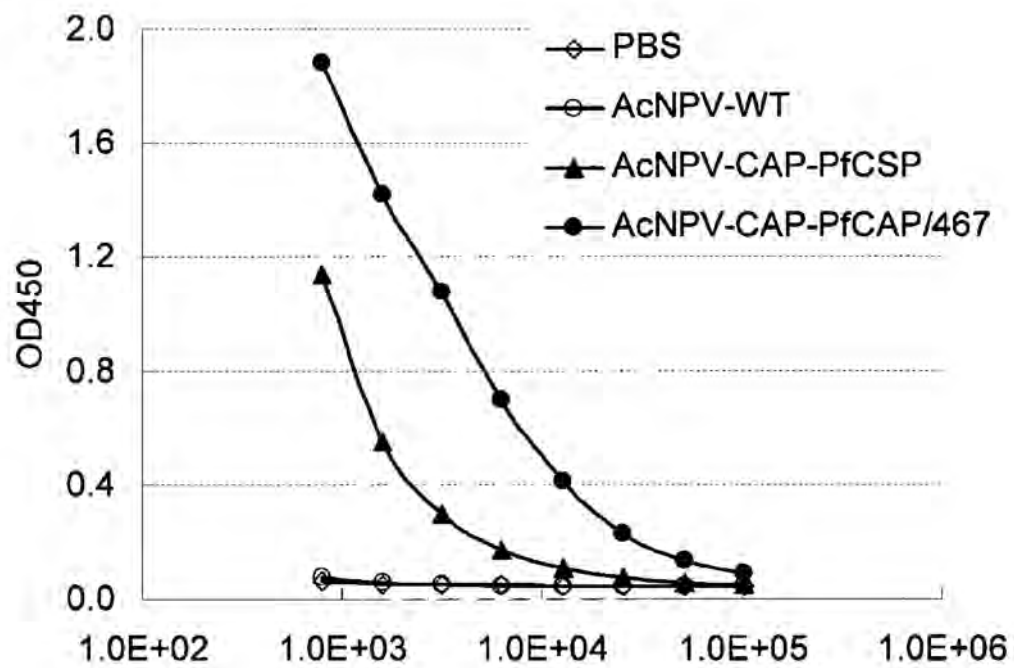
(A)



(B)



Fig.4(A)



Dilución

Fig.4(B)

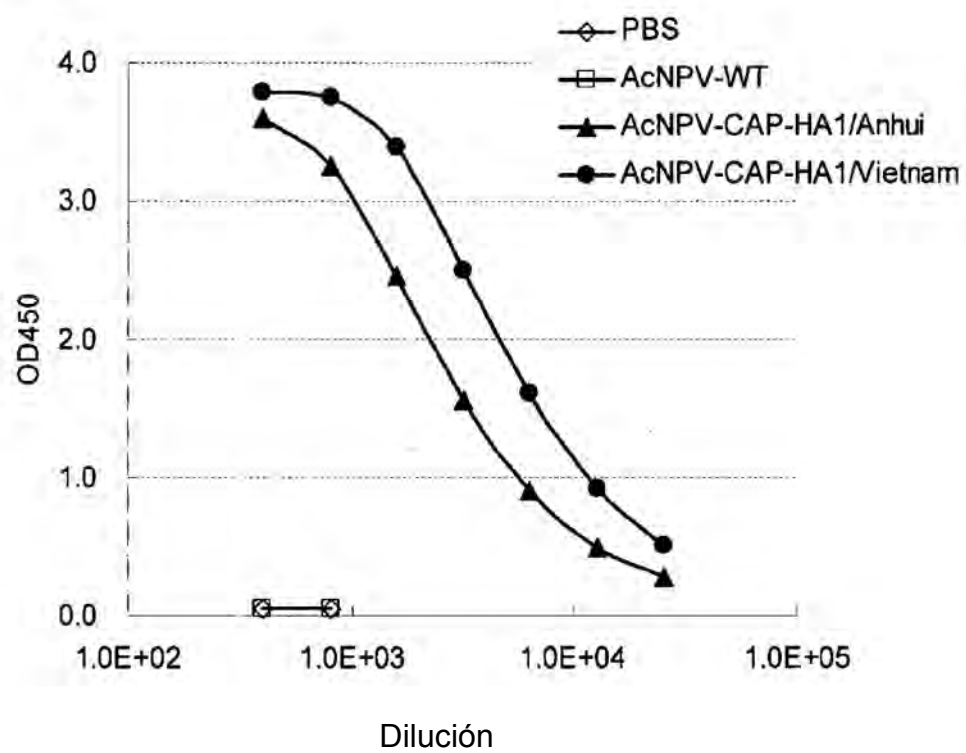


Fig.5

N°	Nombre del Virus	Promotor de Célula de Mamífero	Promotor Viral	ORF del Antígeno	Tamaño del ORF (aa)	Proteína de Fusión	Tamaño del ORF (aa)	Antígeno + Proteína Membranaria (aa)	Tamaño Total del ORF (aa)
1	CAP-HA1/Anhui	CAG	PoliEdrina	Anhui (17-345)	329	gp64 (21-512)	492	821	847
2	CAP-HA1/Anhui/272	CAG	PoliEdrina	Anhui (17-345)	329	gp64 (272-512)	241	570	596
3	CAP-HA1/Anhui/467	CAG	PoliEdrina	Anhui (17-345)	329	gp64 (467-512)	46	375	401
4	CAP-HA1/Vietnam	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (21-512)	492	822	848
5	CAP-HA1/Vietnam/51	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (51-512)	462	792	818
6	CAP-HA1/Vietnam/101	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (101-512)	412	742	768
7	CAP-HA1/Vietnam/154	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (154-512)	359	689	715
8	CAP-HA1/Vietnam/201	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (201-512)	312	642	668
9	CAP-HA1/Vietnam/272	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (272-512)	241	571	597
10	CAP-HA1/Vietnam/467	CAG	PoliEdrina	Vietnam (17-346)	330	gp64 (467-512)	46	376	402
11	CAP-AH/345	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (1-345)	345	gp64 (21-512)	492	837	863
12	CAP-AH/345/467	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (1-345)	345	gp64 (467-512)	46	391	417
13	CAP-AH/410	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (17-410)	394	gp64 (21-512)	492	886	912
14	CAP-AH/410/467	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (17-410)	394	gp64 (467-512)	46	440	466
15	CAP-AH/473	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (17-473)	457	gp64 (21-512)	492	949	975
16	CAP-AH/473/467	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (17-473)	457	gp64 (467-512)	46	503	529
17	CAP-AH/520	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (17-520)	504	gp64 (21-512)	492	996	1022
18	CAP-AH/520/467	CAG	PoliEdrina	Anhui GD (17-520)	504	gp64 (467-512)	46	550	576
19	CAP-VN/346	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-346)	330	gp64 (21-512)	492	822	848
20	CAP-VN/346/467	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-346)	330	gp64 (467-512)	46	376	402
21	CAP-VN/410	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-410)	394	gp64 (21-512)	492	886	912
22	CAP-VN/410/467	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-410)	394	gp64 (467-512)	46	440	466
23	CAP-VN/473	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-473)	457	gp64 (21-512)	492	949	975
24	CAP-VN/473/467	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-473)	457	gp64 (467-512)	46	503	529
25	CAP-VN/520	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-520)	504	gp64 (21-512)	492	996	1022
26	CAP-VN/520/467	CAG	PoliEdrina	Vietnam GD (17-520)	504	gp64 (467-512)	46	550	576
27	CAP-PCSP	CAG	PoliEdrina	PCSP (19-373)	355	gp64 (21-512)	492	847	873
28	CAP-PCSP/272	CAG	PoliEdrina	PCSP (19-373)	355	gp64 (272-512)	241	596	622
29	CAP-PCSP/467	CAG	PoliEdrina	PCSP (19-373)	355	gp64 (467-512)	46	401	427
30	CAP-PCSP/A361E	CAG	PoliEdrina	PCSP (19-373)/A361E	355	gp64 (21-512)	492	847	873
31	CAP-PCSP/A361E/272	CAG	PoliEdrina	PCSP (19-373)/A361E	355	gp64 (272-512)	241	596	622
32	CAP-PCSP/A361E/467	CAG	PoliEdrina	PCSP (19-373)/A361E	355	gp64 (467-512)	46	401	427
33	CAP-PCSP-76	CAG	PoliEdrina	PCSP (76-373)	298	gp64 (21-512)	492	790	816
34	CAP-PCSP-76/467	CAG	PoliEdrina	PCSP (76-373)	298	gp64 (467-512)	46	344	370
35	CAP-PCSP-209	CAG	PoliEdrina	PCSP (209-373)	165	gp64 (21-512)	492	657	683
36	CAP-PCSP-209/467	CAG	PoliEdrina	PCSP (209-373)	165	gp64 (467-512)	46	211	237
37	CAP-PCSP-76/209	CAG	PoliEdrina	PCSP (76-128 + 209-373)	218	gp64 (21-512)	492	710	736
38	CAP-PCSP-76/209/467	CAG	PoliEdrina	PCSP (76-128 + 209-373)	218	gp64 (467-512)	46	264	290
39	CAP-CO/Nil	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (1-397)	397	gp64 (21-512)	492	889	915
40	CAP-CO/Nil/467	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (1-397)	397	gp64 (467-512)	46	443	469
41	CAP-CO/19	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (19-373)	355	gp64 (21-512)	492	847	873
42	CAP-CO/19/467	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (19-373)	355	gp64 (467-512)	46	401	427
43	CAP-CO/76	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (76-373)	298	gp64 (21-512)	492	790	816
44	CAP-CO/76/467	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (76-373)	298	gp64 (467-512)	46	344	370
45	CAP-CO/205	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (205-373)	169	gp64 (21-512)	492	661	687
46	CAP-CO/205/467	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (205-373)	169	gp64 (467-512)	46	215	241
47	CA39-HA1/Anhui	CAG	vp39p	Vietnam (17-346)	330	gp64 (21-512)	492	822	848
48	CA84-HA1/Anhui	CAG	gp64p	Vietnam (17-346)	330	gp64 (21-512)	492	822	848
49	CA39-PCSP/A361E	CAG	vp39p	PCSP (19-373)/A361E	355	gp64 (21-512)	492	847	873
50	CA84-PCSP/A361E	CAG	gp64p	PCSP (19-373)/A361E	355	gp64 (21-512)	492	847	873
51	CAP-CO/Nil/NSV	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (1-397)	397	VS-V-G (458-549)	92	489	515
52	CAP-CO/19/NSV	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (19-373)	355	VS-V-G (458-549)	92	447	473
53	CAP-CO/76/NSV	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (76-373)	298	VS-V-G (458-549)	92	390	416
54	CAP-CO/205/NSV	CAG	PoliEdrina	PCSP GD (205-373)	169	VS-V-G (458-549)	92	261	287
55	Dual-PC25-PCSP-gp64	CMV	PoliEdrina	PC25 (23-171) + PCSP (19-373)	504	VS-V-G (458-549)	92	996	1099
56	Dual-PCNSP1-PCSP-gp64	CMV	PoliEdrina	PCNSP1 (1567-1682) + PCSP (19-373)	451	gp64 (21-512)	492	943	1024