(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 578 979**

(51) Int. CI.:

C12N 7/01 (2006.01)
C12N 15/33 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2010 E 10841780 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2519627**

(54) Título: **Plásmidos y métodos de expresión de péptidos y selección por afinidad en partículas tipo virus de bacteriófagos de ARN**

(30) Prioridad:

31.12.2009 US 335120 P
31.12.2009 US 335122 P
31.12.2009 US 335121 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.08.2016

(73) Titular/es:

STC.UNM (100.0%)
801 University Blvd. SE, Suite 101
Albuquerque, NM 87106, US

(72) Inventor/es:

PEABODY, DAVID, S. y
CHACKERIAN, BRYCE

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

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).

Plásmidos y métodos de expresión de péptidos y selección por afinidad en partículas tipo virus de bacteriófagos de ARN

Descripción

Campo de la invención

[0001] Se describen un sistema y un método para la expresión de péptidos en partículas tipo virus (también llamadas partículas como virus, VLPs o 'virus-like particles', en inglés) de bacteriófagos de ARN, especialmente MS2 y PP7. Se describen métodos y vectores plásmidos que facilitan la elaboración de secuencias aleatorias altamente complejas y bibliotecas de fragmentos de antígenos, de las cuales se pueden aislar mediante selección por afinidad los péptidos con las funciones de unión deseadas. Puesto que la densidad de la expresión ('display', en inglés) de péptidos es un factor determinante importante para la exactitud de la selección por afinidad, también se describen un método y plásmidos para controlar la valencia de la expresión de péptidos en las VLPs. El método permite un ajuste sencillo de los niveles de valencia de la expresión en las VLPs, especialmente VLPs de MS2, en un amplio intervalo (es decir, desde menos de uno de media, hasta noventa por partícula), facilitando así la identificación y la producción de inmunógenos y vacunas, incluyendo VLPs que muestran niveles de valencia bajos. A pesar de que este sistema se ha desarrollado sobre todo con vistas al descubrimiento de vacunas, puede usarse en muchas otras aplicaciones, incluyendo la identificación de VLPs peptídicas usadas para la distribución específica de sustancias y agentes de imagen (o marcadores de imagen; 'imaging agents', en inglés) para células o tejidos, y en la síntesis con plantilla de nuevos materiales.

[0002] Esta aplicación describe métodos y vectores plásmidos que facilitan la implementación del sistema de expresión de VLPs. La invención proporciona construcciones de ácido nucleico útiles para la expresión de partículas tipo virus compuestas de polipéptidos de MS2 o de PP7 recubiertos, ambos modificados mediante la inserción de un péptido heterólogo, de manera que el péptido heterólogo se expresa en la particula tipo virus y encapsida el ARN específico (tanto MS2 como PP7) que dirige la síntesis de VLP y del péptido que se expresa en ella. También se proporcionan partículas tipo virus relacionadas.

Antecedentes de la invención

[0003] VLPs como vacunas. El crecimiento en los últimos años de la tecnología relacionada con el ADN recombinante ha conducido a la introducción de vacunas en las que una proteína inmunogénica se identifica, se clona y se expresa en un huésped o portador adecuado para obtener las suficientes cantidades de proteínas que permitan una inmunización de protección efectiva tanto en humanos como en animales. Muchas de las vacunas más efectivas se basan en la potente capacidad que tiene la superficie de los viriones para estimular los anticuerpos neutralizantes. Estas incluyen vacunas autorizadas de virus muertos o atenuados, como la polio, la gripe o la rabia, que inducen efectivamente la respuesta de anticuerpos defensivos. Más recientemente, la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos ha aprobado las vacunas de subunidades que se basan en el autoensamblaje de las proteínas estructurales del virus del papiloma humano (VPH) y del virus de la hepatitis B (VHB). Las subunidades se expresan en un portador adecuado y después se autoensamblan en particulas que se parecen estructuralmente a virus auténticos, pero no son infecciosas porque carecen de génoma vírico. Estas partículas denominadas partículas tipo virus (VLPs) son, por lo general, altamente inmunogénicas, ya que las proteínas estructurales de las que están compuestas están presentes en múltiples copias en cada partícula individual. Esta alta densidad de expresión de antígenos hace que estas partículas sean especialmente eficaces para provocar una sólida respuesta de los anticuerpos. Las vacunas de VPH y VHB se basan en VLPs ensambladas a partir de las proteínas estructurales de los propios virus respectivos, pero las VLPs también pueden utilizarse como andamiaje para la expresión de alta densidad de epítopos heterólogos. Puesto que, en general, las VLPs representan estructuras altamente repetitivas y, por tanto, altamente inmunogénicas, pueden derivarse de cualquier número de diferentes tipos de virus. El presente método se orienta hacia la utilización de VLPs de bacteriófagos de ARN (especialmente MS2 y PP7) tanto para la expresión inmunogénica como para el descubrimiento de epítopos mediante un método análogo a la técnica 'phage display' ('expresión de fagos') [1, 2].

[0004] Bacteriófagos de ARN. Los bacteriófagos de ARN de un solo filamento son un grupo de virus que cuenta con una amplia distribución en la naturaleza. Varios han sido descritos con gran detalle en lo referente a la secuencia genómica, la biología molecular y la estructura y organización de la cápsida. MS2 es, quizás, el miembro mejor estudiado del grupo y ha sido objeto de la mayoría de los trabajos desarrollados en los laboratorios de los inventores, aunque los trabajos más recientes también han estudiado un fago relacionado llamado PP7. MS2 tiene un genoma de ARN con 3569 nucleótidos, y una sola cadena o filamento, que codifica solo cuatro proteínas: maturasa, de recubrimiento, de lisis y replicasa. La partícula viral está compuesta de 180 péptidos de recubrimiento (o péptidos escudo), una molécula de maturasa y una copia del genoma de ARN. Puesto que la propia proteína de recubrimiento (o proteína de la cubierta) es completamente responsable de la formación de una carcasa icosaédrica, la VLP de MS2 puede producirse a partir de plásmidos como el producto de un solo gen. Así, en comparación con los otros fagos utilizados para la expresión de péptidos, las VLPs de ARN son sorprendentemente simples. La ingeniería relacionada con VLPs de MS2 y PP7 para la expresión de péptidos y la selección por afinidad ha sido presentada recientemente por estos inventores [1, 2] y también se describe más adelante en este documento.

Además, la ingeniería relacionada con VLPs de MS2 se describe en US2009/0054246A1.

[0005] Identificación de epítopos mediante expresión de fagos convencional ('conventional phage display', en inglés). La expresión o presentación de fagos es una de las múltiples tecnologías que hace posible la expresión de grandes bibliotecas de secuencias de aminoácidos aleatorias con el objetivo de seleccionar de entre ellas péptidos con algunas funciones específicas (por ejemplo, la capacidad de unirse a un anticuerpo). El método de expresión de fagos más usado se basa en fagos filamentosos (por ejemplo, M13). La idea básica es crear genomas de bacteriófagos recombinantes que contengan una biblioteca de secuencias aleatorias geneticamente fusionadas a una de las proteínas estructurales virales en el genoma de ADN del fago. Cuando estos recombinantes se transfectan a bacterias, cada una produce una partícula viral que expresa un péptido particular en su superficie y empaqueta el mismo genoma recombinante que codifica el péptido. Esto determina el enlace o ligamiento ('linkage', en inglés) del genotipo y el fenotipo que es esencial para el método. Las funciones arbitrarias (por ejemplo, la unión de un receptor, la inmunogenicidad) pueden seleccionarse de entre complejas bibliotecas de fagos para la expresión de péptidos usando la selección por afinidad, seguida de la amplificación de selectantes mediante crecimiento en E. coli. En una vasta biblioteca de fagos para la expresión de péptidos, la minúscula minoría que es capaz de unirse a un receptor particular (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) puede purificarse por afinidad y amplificarse después mediante propagación en E. coli. Normalmente, varias rondas iterativas de selección y amplificación son suficientes para producir una población relativamente simple de la que se pueden clonar -y, posteriormente, caracterizar- fagos individuales que expresan péptidos con la actividad deseada. Cuando la molécula de selección es un anticuerpo, los péptidos así identificados representan epítopos reconocidos por el anticuerpo, y, en condiciones adecuadas, pueden ser capaces de evocar en un paciente o animal inmunizado una respuesta de anticuerpos que es específica para el epítopo en su antígeno nativo.

[0006] Sin embargo, existen desventajas relacionadas con la expresión de fagos filamentosos. Lo más importante es que una peculiaridad de la biología molecular del fago filamentoso a menudo hace muy difícil o imposible expresar péptidos con las altas densidades necesarias para obtener una inmunogenicidad realmente potente. Esto significa que, a pesar de que los epítopos de péptidos pueden identificarse mediante selección por afinidad, para que sean útiles como inmunógenos (esto es, vacunas), normalmente tienen que sintetizarse químicamente y conjugarse después con un portador más inmunogénico. Desafortunadamente, el péptido pierde actividad frecuentemente cuando se separa de esta manera del contexto estructural en el que se encontraba durante el proceso de selección por afinidad y optimización. Por otra parte, el sistema de expresión de VLPs de fagos de ARN que se describe aquí ofrece la capacidad de realizar la selección por afinidad y la presentación de epítopos inmunogénicos en una sola plataforma. Esto es el resultado de combinar la expresión de epítopos de péptidos de alta densidad con la capacidad de seleccionar por afinidad, e implica que las limitaciones estructurales presentes durante la selección por afinidad del epítopo pueden mantenerse durante el proceso de inmunización, aumentando las probabilidades de que el epítopo conserve la estructura necesaria para desencadenar la respuesta de anticuerpos deseada.

[0007] Resumen del método de expresión de VLPs de fagos de ARN ('RNA phage VLP display method', en inglés). Los autores de la invención describieron anteriormente una tecnología relacionada con la expresión de péptidos y la selección por afinidad basada en las VLPs de bacteriófagos de ARN, incluyendo MS2 y PP7 [1, 2], y la explican aquí brevemente. El desarrollo del método de expresión de VLPs requería que se satisficieran dos condiciones previas: en primer lugar, era necesario identificar una forma de la proteína de recubrimiento del fago de ARN, y un espacio en ella que permitiera la inserción de péptidos ajenos sin que se interrumpiera su capacidad para envolver y juntarse con una VLP. Se escogió el bucle AB ('AB loop', en inglés) de la superficie de la proteína de recubrimiento para la inserción de los péptidos. Los péptidos que se introdujeron aquí se expresan preponderantemente en la superficie de la VLP. Desafortunadamente, la forma de tipo natural ('wild-type', en inglés) de la proteína de recubrimiento es altamente intolerante a la inserción de péptidos en el bucle AB, de manera que la gran mayoría (normalmente, >98%) acaba en fracaso. Las proteínas de recubrimiento se pliegan como un dímero, y noventa de ellas se juntan con la VLP icosaédrica. Los inventores diseñaron una forma novedosa de proteína de recubrimiento para hacerla estable y para hacerla más tolerante a las inserciones en el bucle AB. Para ello, aprovecharon la cercanía de los extremos N- y C-terminales de las dos cadenas idénticas de polipéptidos en el dímero (figura 1). Duplicando la secuencia de codificación de la proteína de recubrimiento y fusionando después las dos copias en un único marco de lectura, los inventores produjeron un -así llamado- dímero de una sola cadena (o dímero monocatenario). Esta forma de proteína es significativamente más estable termodinámicamente y su proceso de plegado tolera mucho mejor la inserción de péptidos en el bucle AB de la copia del dímero de una sola cadena [1, 2]. Las VLPs así obtenidas expresan un péptido por cada dímero, o noventa péptidos por cada VLP. La segunda condición previa para tener la capacidad de expresión de péptidos/selección por afinidad es el enlace o ligamiento del fenotipo al genotipo, puesto que resulta esencial proporcionar un medio para amplificar las secuencias seleccionadas por afinidad. Este requisito se satisfizo cuando los inventores demostraron que las VLPs de fagos de ARN encapsidan al ARN mensajero que dirige su síntesis [1, 2]. Esto significa que las secuencias de péptidos de VLP seleccionadas por afinidad pueden amplificarse mediante transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cuando el objetivo de selección es un anticuerpo monoclonal, las VLPs resultantes seleccionadas por afinidad son candidatas para vacunas que provoquen en animales o pacientes la respuesta de anticuerpos cuyas actividades imitan las del anticuerpo de selección.

[0008] Consideraciones relacionadas con la valencia de expresión de péptidos y su control. Esta aplicación describe

vectores de plásmidos que facilitan la construcción de secuencias complejas aleatorias y bibliotecas de fragmentos de antígenos en VLPs de fagos de ARN y la selección por afinidad de entre estas bibliotecas de péptidos que unen anticuerpos monoclonales específicos (u otros receptores arbitrarios). Entiéndase que, tal y como se describió originalmente, la tecnología de expresión de VLPs de fagos de ARN presenta 90 péptidos en cada VLP, puesto que el péptido se inserta en un bucle AB de un dímero de una sola cadena, y que 90 dímeros componen la VLP [1, 2]. La multivalencia de estas partículas resulta deseable para la mayoría de aplicaciones de la VLP de MS2. Por ejemplo, la alta inmunogenicidad de la partícula está relacionada con la alta densidad de los péptidos expresados y es, por tanto, una propiedad valiosa para una vacuna. Sin embargo, durante el proceso de selección por afinidad, la multivalencia hace difícil distinguir las partículas que expresan péptidos con una alta afinidad de unión con el objetivo de selección, de aquellas que se unen con firmeza debido únicamente a múltiples y simultáneas interacciones débiles. Este dilema 'avidez vs. afinidad' es un problema bien documentado en la selección de ligandos de péptidos de alta afinidad mediante el uso de la técnica de expresión de fagos filamentosos ('filamentous phage display') [3-5]. La presente invención aborda el asunto del sistema de expresión de VLPs introduciendo un medio para ajustar los niveles medios de la valencia de la expresión de péptidos en un amplio intervalo, es decir, desde menos de una hasta 90 por partícula. Esto hace posible alterar la densidad de la expresión de péptidos durante el proceso de selección por afinidad. La selección se realiza en diversas rondas, de manera que, habitualmente, en la primera ronda se usa una expresión multivalente, obteniendo así una población relativamente compleja en la que todos los péptidos tienen aunque sea una afinidad mínima con el blanco u objetivo ('target', en inglés). En las rondas subsiguientes, se puede reducir la valencia de la expresión de péptidos, aumentando así la exactitud de la selección, y pudiendo aislar los péptidos con mayor afinidad con el anticuerpo objetivo y con mejor capacidad de imitación del epítopo preferido.

[0009] La base de datos WPI, Número de Resumen 2004-262643, un resumen de JP 2004 089069, describe un supresor de traducción utilizado junto con una proteína de recubrimiento de un fago que tiene una fusión terminal. El fago comprende un conjunto de monómeros de recubrimiento de fagos de ADN que expresan un péptido heterólogo.

Objetivos de la invención

[0010] Es un objetivo de la presente invención proporcionar VLPs que expresan péptidos heterólogos con valencias bajas.

[0011] Es un objetivo adicional de la presente invención proporcionar construcciones de ácido nucleico para producir VLPs, incluyendo VLPs que expresan péptidos heterólogos con valencias bajas o altas.

[0012] También es un objetivo de la presente invención proporcionar construcciones de ácido nucleico para producir VLPs, incluyendo VLPs que pueden controlar la expresión de péptidos heterólogos con valencias bajas o altas.

[0013] Cualquiera de estos u otros objetivos de la presente invención se deducirán con facilidad gracias a la siguiente descripción de la invención.

Resumen de la invención

[0014] La presente invención está relacionada con compuestos, estructuras (incluyendo plásmidos) y sistemas que facilitan la construcción de secuencias aleatorias altamente complejas y de bibliotecas de péptidos de fragmentos de antígenos, y que permiten controlar la valencia (es decir, la densidad) de la expresión de péptidos en VLPs de MS2 con el objetivo de proporcionar un medio más eficaz para identificar y proporcionar VLPs que incorporan péptidos selectivamente inmunogénicos.

[0015] La presente invención garantiza que la selección de péptidos que tienen la mayor afinidad con un anticuerpo monoclonal dado proporcionará los mejores miméticos moleculares del antígeno nativo, y que estos péptidos son los que más probabilidades tienen de proporcionar o provocar una respuesta relevante de los anticuerpos. Dichos péptidos son particularmente apropiados para inducir inmunogenicidad en un paciente y producir una respuesta protectora. Las vacunas que están preparadas para y/o incorporan estos péptidos son más eficaces y tienen efectos secundarios limitados; especialmente, las vacunas que se describen a continuación, que se administran sin ningún adyuvante.

[0016] Se describen vectores plásmidos que facilitan la construcción de secuencias aleatorias o bibliotecas de péptidos de fragmentos de antígenos en VLPs de fagos de ARN MS2 (pDSP1 y pDSP62) y en VLPs derivadas del fago de ARN PP7 (pET2P7K32 y pDSP7). Estos vectores hacen posible la creación de bibliotecas que tienen más de 10^{11} a 10^{12} miembros individuales. Sin embargo, estos vectores producen VLPs que expresan de manera uniforme péptidos extraños o ajenos ('foreign peptides', en inglés) a altas densidades (es decir, 90 por cada VLP). Tal y como se explicado previamente, esta es una ventaja significativa para las aplicaciones de las vacunas, ya que confiere un alto nivel de inmunogenicidad al péptido, pero a menudo presenta problemas durante la selección por afinidad porque la multivalencia reduce la exactitud o rigor de la selección y hace difícil seleccionar preferentemente los miembros con la mayor capacidad de unión dentro de una población.

[0017] La presente invención supone una solución simple para el problema del control de la valencia de la presentación de péptidos, un sistema que permite la producción de grandes cantidades de tipos naturales ('wild-type') y pequeñas cantidades de proteínas de recubrimiento monocatenarias (perferiblemente, dímeros) que contienen un péptido heterólogo de al menos cuatro (4) aminoácidos en línea de un único ARN. Este enfoque implica construir plásmidos como pDSP1(am), pDSP62(am), pET2P7K32(am) y pDSP7(am). Estas son variaciones simples de los plásmidos descritos previamente, que se modificaron para contener un codón de terminación o codón de parada (preferiblemente, un codón de terminación ámbar) en lugar del codón (alanina) que, normalmente, codifica el primer aminoácido de la copia 'aguas abajo' ('downstream', en inglés) de la proteína de recubrimiento en el dímero monocatenario. Puesto que estos plásmidos tienen un codón de parada en la unión de las dos mitades del dímero monocatenario (por ejemplo, pDSP1), normalmente solo producen la proteína de recubrimiento de tipo natural de una unidad de longitud, que, por supuesto, se junta con una VLP. Sin embargo, en el presente enfoque, el plásmido o un segundo plásmido (por ejemplo, pNMsupA) se modifica para que se inserte un gen de ARNt [8, 9], como un gen de ARNt supresor y que inserta alanina, que se expresa bajo el control de un promotor (por ejemplo, un promotor lac en un plásmido resistente al cloranfenicol de un grupo de incompatibilidad diferente), de manera que el ARNt supresor se produce en cantidades que provocan que un pequeño porcentaje de ribosomas que traducen la secuencia de recubrimiento lean el codón de parada y produzcan el dímero monocatenario, que incluye el péptido heterólogo. La proteína resultante, preferiblemente con un péptido huésped heterólogo insertado, por ejemplo, en su segundo bucle AB o en el terminal carboxi o en otra posición dentro de la subunidad 'aguas abajo', se coensambla con una proteína de tipo natural expresada a partir del mismo ARNm para formar VLPs en mosaico, que exhiben una valencia baja.

[0018] De acuerdo con el presente método, las VLPs pueden producirse de manera controlada para presentar desde menos de uno hasta noventa (90) péptidos heterólogos por cada VLC, preferiblemente desde uno hasta alrededor de diez (10) péptidos heterólogos por cada VLC, más preferiblemente desde 1 hasta alrededor de 5 péptidos heterólogos por cada VLC, más preferiblemente desde 1 hasta alrededor de 3 péptidos heterólogos por cada VLC, y más preferiblemente entre alrededor de 2 y 4 péptidos heterólogos por cada VLC. La reducción de la densidad de péptidos de acuerdo con la presente invención da como resultado unas VLPs con una mayor exactitud para la selección por afinidad, permitiendo la pronta identificación de péptidos con alta afinidad, que se hacen fuertemente inmunogénicos cuando regresan después a un formato que muestra una elevada densidad. La electroforesis con gel de agarosa y la técnica de hibridación 'northern' ('northern blots') verifican que las partículas producidas de acuerdo con la presente invención encapsidan el ARN relevante. Además, el método permite que la valencia (número de péptidos producidos por cada VLP) pueda ajustarse en un amplio intervalo controlando el nivel de expresión del ARNt supresor, por ejemplo, ajustando el nivel de síntesis del ARNt supresor, lo cual puede conseguirse, por ejemplo, expresando el ARNt a partir de un promotor (por ejemplo, proB u otro promotor adecuado) cuya actividad puede modularse como una función de concentración del inductor. Los niveles de valencia también se pueden controlar mediante la utilización de diferentes ARNt supresores, o mutantes de estos, con mayor o menor eficacia intrínseca de supresión.

[0019] Uno puede preguntarse si el control de la valencia puede obtenerse más simplemente coexpresando la proteína recombinante junto con el excedente de la proteína de recubrimiento de tipo natural, produciendo así cápsidas en mosaico en las que se reduce el contenido de péptidos extraños. Desafortunadamente, este enfoque no es práctico, puesto que reducir la valencia a un nivel apropiado (por ejemplo, a entre menos de uno y unos pocos péptidos por cada VLP, de media) requiere que la proteína de tipo natural se exprese en mucha mayor medida que el péptido recombinante. Esta estrategia de coexpresión produciría un exceso de ARN irrelevante (esto es, que codifica péptidos no extraños), el cual, debido a su gran abundancia, sería empaquetado en las VLPs con preferencia frente al ARN que codifica péptidos. Puesto que la encapsidación específica parece ser independiente de la presencia de cualquier señal simple de empaquetamiento en el ARN (1), parece que no hay ninguna manera sencilla de marcar la minoría de compuestos que codifican péptidos para una encapsidación selectiva. A pesar de que se pueden imaginar variaciones factibles para este enfoque de coexpresión, estas variaciones suelen ser excesivamente complicadas. Nuestro sistema resuelve este problema produciendo ambas formas de la proteína a partir de un solo ARNm.

[0020] A modo de ejemplo, las siguientes realizaciones pueden usarse para ejemplificar aún más la presente invención. Entiéndase que en cada una de las realizaciones siguientes, el polipéptido de recubrimiento de MS2 o el polipéptido de recubrimiento de PP7 pueden usarse en las construcciones individuales de ácido nucleico y no deben limitarse a polipéptidos de recubrimiento de MS2 o PP7 a menos que dicha limitación sea adecuada en el contexto de la explicación.

[0021] Una realización no inventiva proporciona una construcción de ácido nucleico (ver pDSP1, por ejemplo) que comprende:

(a) un promotor bacteriano o bacteriófago (por ejemplo, como se describe más adelante en la sección Descripción Detallada de la Invención) que está operativamente asociado con una secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2, de manera que la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento es modificada para que delimite un primer sitio de restricción (por ejemplo, Sall o Kpnl) situado en 5' hacia la región de la secuencia que delimita el bucle AB del dímero de

polipéptidos de recubrimiento;
(b) un segundo sitio de restricción (por ejemplo, BamHI) situado en 3' hacia la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento;
(c) Partidores PCR situados en 5' hacia el primer sitio de restricción y en 3' hacia el segundo sitio de restricción (en la Descripción Detallada de la Invención se ofrece una definición y un listado de los partidores PCR relevantes).
(d) un gen de resistencia a los antibióticos (por ejemplo, a la kanamicina), y
(e) un origen de replicación para la replicación en una célula procariota (por ejemplo, el origin de replicación a partir del plásmido ColE1).

[0022] Otra realización no inventiva proporciona una construcción de ácido nucleico (por ejemplo, ver pDSP62), que comprende:

(a) un promotor bacteriano o bacteriófago que está operativamente asociado con una secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2, de manera que una de las dos mitades de de la secuencia del dímero monocatenario es modificada o variada ('codon juggled', en inglés) mediante múltiples sustituciones de nucleótidos silenciosas para producir un dímero modificado, de manera que los partidores de oligonucleótidos mutagénicos pueden alinearse específicamente con la mencionada mitad modificada o no modificada del mencionado dímero (preferiblemente, debe haber un número suficiente de mutaciones en 20 unidades de nucleótidos en ambos lados del bucle AB que permita que las dos secuencias se diferencien mediante la hibridación de un partidor);
(b) un primer sitio de restricción (por ejemplo, SalI) situado en 5' hacia la región de la secuencia que delimita el bucle AB;
(c) un segundo sitio de restricción (por ejemplo, BamHI) situado en 3' hacia la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento, y
(d) partidores PCR situados en 5' hacia el primer sitio de restricción y en 3' hacia el segundo sitio de restricción (en la Descripción Detallada de la Invención se ofrece una definición y un listado de los partidores PCR relevantes).
(e) un gen para resistir a un primer antibiótico;
(f) un origen de replicación para la replicación en una célula procariota;
(g) un segundo origen de replicación a partir de un bacteriófago de ADN monocatenario (por ejemplo, M13 o fd); y
(h) un bacteriófago ayudante de ADN monocatenario (por ejemplo, M13 o fd) modificado para contener un gen que confiere resistencia frente a un segundo antibiótico.

[0023] En otra realización, relacionada con las construcciones de ácido nucleico de la invención, la secuencia de codificación del dímero monocatenario de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2 (o PP7) comprende, además, una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido heterólogo y la construcción comprende, de manera opcional, un terminador de la transcripción situado en 3' hacia el segundo sitio de restricción. Estas construcciones de ácido nucleico son útiles para la expresión de partículas tipo virus compuestas de un polipéptido de recubrimiento de MS2 (o PP7) modificado mediante la inserción de un péptido heterólogo, de manera que el péptido heterólogo se expresa o manifiesta ('to display', en inglés) en la partícula tipo virus y encapsida ARNm de MS2 (o PP7).

[0024] En otra realización no inventiva (por ejemplo, pET2P7K32), la construcción de ácido nucleico comprende:

(a) un promotor bacteriano o bacteriófago que está operativamente asociado con una secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2, de manera que la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento es modificada para que delimite un primer sitio de restricción que se encuentra en la región 'aguas abajo' de la secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento, y que está situado en 5' hacia la secuencia que define el bucle AB del dímero de polipéptidos de recubrimiento -o bien está situado dentro de la secuencia-.
(b) un segundo sitio de restricción situado en 3' hacia la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento;
(c) partidores PCR situados en 5' hacia el primer sitio de restricción y en 3' hacia el segundo sitio de restricción (en la Descripción Detallada de la Invención se ofrece una definición y un listado de los partidores PCR relevantes).
(d) un gen de resistencia a los antibióticos, y
(e) un origen de replicación para la replicación en una célula procariota.

[0025] En una realización no inventiva alternativa (por ejemplo, pDSP7), la construcción de ácido nucleico comprende:

(a) un promotor bacteriano o bacteriófago que está operativamente asociado con una secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2, de manera que una de las dos mitades de la secuencia del dímero monocatenario es modificada ('codon juggled', en inglés) mediante múltiples sustituciones de nucleótidos silenciosas, de manera que los partidores de oligonucleótidos mutagénicos pueden alinearse específicamente con una u otra mitad (preferiblemente, debe haber un número suficiente de mutaciones en 20 unidades de nucleótidos en ambos lados del bucle AB que permita que las dos secuencias se diferencien mediante la hibridación de un partidor);

(b) un primer sitio de restricción situado en la región 'aguas abajo' de la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento y que está situado en 5' hacia la región de la secuencia -o dentro de ella- que delimita el bucle AB del dímero de polipéptidos de recubrimiento;
(c) un sitio de restricción situado en 3' hacia la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento,
(d) partidores PCR situados en 5' hacia el primer sitio de restricción y en 3' hacia el segundo sitio de restricción (en la Descripción Detallada de la Invención se ofrece una definición y un listado de los partidores PCR relevantes).
(e) un gen para resistir a un primer antibiótico;
(f) un origen de replicación para la replicación en una célula procariota;
(g) un segundo origen de replicación a partir de un bacteriófago de ADN monocatenario (por ejemplo, M13 o fd); y
(h) un bacteriófago ayudante de ADN monocatenario (por ejemplo, M13 o fd) modificado para contener un gen que confiere resistencia frente a un segundo antibiótico.

[0026] En otra realización no inventiva, una construcción de ácido nucleico comprende:

(a) un promotor bacteriano o bacteriófago que está operativamente asociado con una secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2 o PP7, de manera que la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento es modificada (1) para que defina un primer sitio de restricción que se encuentra en la región 'aguas abajo' de la secuencia de codificación de dímeros monocatenarios de polipéptidos de recubrimiento, y que está situado en 5' hacia la secuencia que define el bucle AB del dímero de polipéptidos de recubrimiento -o bien está situado dentro de la secuencia-, y (2) para que contenga una secuencia de nucleótidos $(NNS)_x$, donde N es cualquier nucleótido, S es un nucleótido de guanosina (G) o un nucleótido de citidina (C), y x es un número entero entre 1 y 500.
(b) un segundo sitio de restricción situado en 3' hacia la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento;
(c) partidores PCR situados en 5' hacia el primer sitio de restricción y en 3' hacia el segundo sitio de restricción;
(d) un gen de resistencia a los antibióticos, y
(e) un origen de replicación para la replicación en una célula procariota.

[0027] En algunas realizaciones de la presente invención que se describen aquí, algunos de los elementos que se han expuesto previamente pueden ser opcionales, pero han de incluirse preferiblemente en las construcciones.

[0028] En otras realizaciones (por ejemplo, los derivados de los plásmidos descritos previamente, denominados DSP1(am), pDSP62(am), pET2P7K32(am) y pDSP7(am)) el control de la valencia expresada se obtiene mediante la inclusión de las siguientes características adicionales:

(a) un codón sin sentido -'nonsense codon', en inglés- (por ejemplo, un codón ámbar tal y como se ha descrito aquí con otras palabras) en la unión entre las mitades 'aguas arriba' y 'aguas abajo' del dímero monocatenario;
(b) un plásmido (por ejemplo, pNMsupA) que produce un ARNt supresor (por ejemplo, un supresor de ámbar que inserta alanina) capaz de suprimir parcialmente la terminación de traducción en el codón sin sentido descrito previamente en (a). El origen de replicación de este plásmido es de un segundo grupo de incompatibilidad y confiere resistencia a un segundo antibiótico, permitiendo así su mantenimiento estable en bacterias que también contienen uno de los plásmidos productores de proteínas de revestimientos previamente descritos.

Una visión general de la construcción de bibliotecas y de la selección por afinidad de candidatos para vacunas.

[0029] El sistema de VLPs de MS2 se usa aquí como ejemplo, **pero debe entenderse que métodos similares se aplican al sistema de PP7 también presentado en esta aplicación**.

1. Construcción de bibliotecas. Las bibliotecas de secuencias aleatorias pueden producirse mediante dos métodos. Estos métodos se describirán con más detalle más adelante y se ilustran en las figuras 9b y 15. (A.) Se clona un producto de PCR en pDSP1 entre SalI y BamHI con secuencias aleatorias agregadas de tal manera que se introduzcan en el bucle AB. Este método es adecuado para la construcción conveniente de bibliotecas relativamente poco complejas (habitualmente, entre 10^7 y 10^8 elementos o miembros), pero no resulta conveniente para subir a niveles superiores. (B.) Para bibliotecas con una mayor complejidad (por ejemplo, de 10^9 a 10^{11} o más), un partidor de oligonucleótidos sintéticos se alinea con una versión monocatenaria de pDSP62 y se extiende con ADN polimerasa para producir una molécula circular bicatenaria o de doble cadena, que después se cierra covalentemente por la acción de la ADN ligasa (ver figura 12). Las moléculas de ADN recombinante producidas mediante cualquiera de estos dos métodos se introducen en una cepa de expresión adecuada de E. coli (por ejemplo, BL21(DE3)), donde sintetizan VLPs. Las partículas producidas a partir de pDSP1 o pDSP62 expresan péptidos extraños a una densidad de 90 por partícula (alta densidad).
2. La selección por afinidad se realiza, por ejemplo, sometiendo la biblioteca de VLPs a un procedimiento (por ejemplo, la técnica 'biopanning' o cualquier otro enfoque para identificar rápidamente y separar los péptidos que muestren alta afinidad con un anticuerpo) en el que un anticuerpo monoclonal es adsorbido en la superficie de uno o más pozos de una placa multipocillos. La solución de la biblioteca de VLPs se incuba con el anticuerpo inmovilizado,

después se lavan y desechan las VLPs no ligadas, y las VLPs ligadas se eluyen, normalmente rebajando el pH de la solución. Posteriormente, las VLPs eluidas se desnaturalizan térmicamente y el ARN que contienen se copia en ADN mediante transcripción inversa utilizando un partidor de oligonucleótidos que se alinea con el ARN cerca de su extremo 3' (muy 'aguas abajo' del sitio BamHI). El ADNc resultante se amplifica mediante PCR utilizando partidores que se alinean específicamente 'aguas arriba' ('upstream', en inglés) del primer sitio de restricción (por ejemplo, SalI) y 'aguas abajo' ('downstream', en inglés) del segundo sitio de restricción (por ejemplo, BamHI).

3. Reclonación. El producto de PCR arriba obtenido se digiere con las enzimas de restricción primarias y secundarias (por ejemplo, BamHI y SalI) y después se reclona en el vector de expresión adecuado. Si la segunda ronda de selección se va a realizar con péptidos de valencia baja, el producto de PCR se clonará en pDSP1(am) o pDSP62(am) y toda la población seleccionada se introducirá en una cepa de expresión de E. coli que contiene pNMsupA (ver figura 7). Las VLPs así producidas expresarán, de media, solo unas pocas copias de sus péptidos extraños (esto es, valencia baja) y, puesto que han sido seleccionadas por afinidad una vez, presentarán una población de péptidos mucho más simple que la que estaba presente en la biblioteca inicial.

4. Las rondas adicionales iterativas de selección por afinidad y reclonación se realizan como se ha descrito previamente. De dos a cuatro rondas o, preferiblemente, tres o cuatro rondas (una o dos con una valencia alta, seguidas de una o dos con una valencia baja) normalmente son suficientes para producir una población simple de VLPs que expresan péptidos que se unen firmemente con el anticuerpo monoclonal de selección. Cuando se considere que la selección está completa, las secuencias se clonan otra vez en pDSP1 o pDSP62, donde los péptidos se expresan otra vez a alta densidad (hasta 90 péptidos por cápsida) para obtener la máxima inmunogenicidad. Se obtienen clones individuales y se someten a caracterización mediante el análisis de la secuencia de ADN. Se evalúa su afinidad 'in vitro' con el anticuerpo de selección y se determina su capacidad para provocar la respuesta de anticuerpos deseada. En experimentos de demostración que utilizan objetivos de anticuerpos monoclonales bien caracterizados, los inventores han recuperado péptidos cuyas secuencias imitan las de los epítopos previamente identificados. Los animales inmunizados con las VLPs resultantes producen anticuerpos que reconocen el epítopo del antígeno original.

[0030] Los detalles de los plásmidos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle más adelante en la Descripción Detallada de la Invención.

[0031] Cualquiera de estas u otras realizaciones previas y/u otras realizaciones de acuerdo con la presente invención se deducirán con facilidad gracias a la siguiente descripción.

Breve descripción de las figuras

[0032]

La figura 1 ilustra la estructura del dímero de proteínas de revestimiento de MS2. El panel superior izquierdo hace hincapié en la proximidad de los extremos N-terminal y C-terminal de las dos cadenas de subunidades. Esta característica facilitó la construcción del dímero monocatenario, el cual tiene una alta tolerancia a la inserción de péptidos extraños. También se ilustra (inferior izquierda) la alta accesibilidad del bucle AB, tanto en el dímero como en la VLP intacta. A la derecha se muestra la estructura de la propia VLP. Las proteínas de recubrimiento de las que está compuesta la VLP adoptan tres configuraciones ligeramente diferentes dependiendo de los principios de cuasiequivalencia y se muestran en rojo, azul y verde. Los bucles AB se muestran en amarillo. Nótese su naturaleza repetitiva y su orientación en la superficie de la VLP.

La figura 2 muestra los aspectos básicos de la expresión de bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias en VLPs. Se crea una biblioteca de inserciones de péptidos de secuencias aleatorias mediante métodos con ADN recombinante; la población de plásmidos resultante se introduce en E. coli mediante transformación y se produce una biblioteca de VLPs. Cada VLP individual de la población expresa un péptido diferente en su superficie y contiene en su interior (en forma de ARNm) la información genética para su síntesis.

La figura 3 ilustra el proceso de selección por afinidad. Una población de VLPs que representa una biblioteca de péptidos de secuencia aleatoria es incubada con un anticuerpo monoclonal inmovilizado en una superficie. Normalmente, la gran mayoría de VLPs fracasan a la hora de unirse al anticuerpo, de manera que se lavan y se desechan. Cualquier VLP cuyos péptidos muestren una unión con el anticuerpo es específicamente eluida, el ARN que contienen se copia en ADN mediante transcripción inversa, se amplifica mediante PCR y después se reclona en un plásmido de expresión (por ejemplo, pDSP62 or pDSP62(am)) para producir la VLP seleccionada por afinidad. Normalmente, la selección se realiza iterativamente (esto es, más de dos veces), preferiblemente entre 3 y 5 rondas.

La figura 4 muestra la importancia de la valencia de la expresión de péptidos. Una expresión multivalente puede hacer difícil diferenciar los aglutinantes o ligantes ('binders', en inglés) intrínsecamente fuertes de los ligantes débiles que interactúan simultáneamente con múltiples receptores. Normalmente, se realiza una primera ronda de selección por afinidad a alta valencia, pero en las posteriores se reduce la valencia a bajos niveles, aumentando así la exactitud de la selección y asegurando el aislamiento de péptidos con la mayor afinidad con el anticuerpo de selección.

La figura 5 muestra el plásmido pDSP1 con sitios de clonación convenientes para la inserción en el bucle AB. pDSP1 expresa la secuencia de codificación del dímero monocatenario, modificada para contener, por ejemplo, sitios de restricción de SalI y KpnI únicos. Este dímero facilita la clonación simple de secuencias extrañas en el bucle AB. Para hacer estos sitios únicos, fue necesario destruir varios sitios de SalI y KpnI en el vector y en la secuencia de recubrimiento 'aguas arriba'.

La figura 6 muestra el plásmido pDSP62. Para facilitar la producción de ADN monocatenario, se introdujo un origen de replicación M13 en el plásmido y se identificó como pDSP61 y pDSP62, dependiendo de la orientación del origen de M13. Este plásmido también contiene una secuencia de recubrimiento con codón variado en la mitad 'aguas arriba' del dímero monocatenario. Esta mitad codifica la misma secuencia de aminoácidos que la mitad 'aguas abajo', pero se diferencia de ella porque contiene el máximo número posible de sustituciones silenciosas, lo que hace que las dos mitades se puedan diferenciar cuando se desee alinear oligonucleótidos.

La figura 7 muestra un sistema ejemplar para producir grandes cantidades de proteínas de tipo natural y pequeñas cantidades de proteínas recombinantes de un bucle AB a partir de un único ARN. Se construyó una variante de pDSP1 (pDSP1(am)) que contiene un codón de parada ámbar en lugar del codón de alanina que codifica normalmente el primer aminoácido de la copia 'aguas abajo' de la proteína de recubrimiento en el dímero monocatenario. Además, se sintetizó y se clonó un gen de ARNt supresor que inserta alanina, el cual se produce en cantidades que provocan que un pequeño porcentaje de ribosomas que traducen la secuencia de recubrimiento 'ultralean' ('readthrough', en inglés) el codón de parada ámbar y produzcan el dímero monocatenario. La proteína resultante (con su péptido huésped) se coensambla con la proteína de tipo natural expresada a partir del mismo ARN para formar cápsidas en mosaico y una valencia reducida, tal y como se ha descrito en otros apartados de la presente invención.

La figura 8 es una representación de una electroforesis en gel de SDS de VLPs purificadas producidas por los plásmidos que se enumeran más abajo. El objetivo del experimento es mostrar el contenido del producto monocatenario 'ultraleído', tal y como se ha explicado más arriba en el caso de la figura 7 y en la sección de ejemplos de la presente aplicación, en VLPs purificadas. Las VLPs purificadas se produjeron a partir de los siguientes plásmidos (de izquierda a derecha):

pDSP1 produce VLPs que contienen solo el dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento.
pDSP1-Flag produce VLPs que contienen solo un dímero monocatenario con el epítopo Flag insertado insertado en su segundo bucle AB.
pDSP1(am) tiene una mutación sin sentido ('nonsense mutation', en inglés) en la unión de secuencias de recubrimiento en el dímero monocatenario, lo cual provoca que produzca grandes cantidades de proteína de recubrimiento de tipo natural y, en presencia del ARNt supresor (obtenido de pNMsupA), pequeñas cantidades de dímeros monocatenarios. Puesto que la supresión sin sentido tiene una baja eficiencia en este caso, solo una pequeña fracción de los ribosomas 'ultralee' el codón de parada para producir el dímero monocatenario. Las dos formas de proteína de recubrimiento se coensamblan en una VLP híbrida o en mosaico que está compuesta, principalmente, de proteínas de recubrimiento de tipo natural y de pequeñas cantidades de dímero monocatenario (estimadas en alrededor del 3% del nivel de las proteínas de recubrimiento de tipo natural).
pDSP1(am)-Flag es, simplemente, como pDSP1(am), pero con el epítopo flag insertado en el segundo bucle AB del dímero monocatenario. Produce sobre todo proteína de recubrimiento de tipo natural, y también una pequeña cantidad del dímero monocatenario con el péptido flag insertado en su bucle AB.
Las dos flechas a la derecha de la imagen indican las posiciones de las dos proteínas producidas por la supresión de los codones de parada de pDSP1(am) y pDSP1(am)-Flag.

Las figuras 9a y 9b representan el plásmido pDSP1 (9a) y una técnica (9b) para insertar una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido heterólogo en ese plásmido.

La figura 10 representa el plásmido pDSP62 y muestra de manera esquemática cómo un partidor sintético de oligonucleótidos puede ser diseñado para insertar secuencias específicamente en el bucle AB de la 'copia aguas' abajo del dímero monocatenario. El oligonucleótido está diseñado para alinearse perfectamente con las secuencias de recubrimiento que flanquean el bucle AB, e inserta una secuencia extraña entre ellas.

La figura 11a contiene la secuencia de ácido nucleico para el plásmido pDSP1; **la figura 11b** muestra la secuencia de ácido nucleico de pDSP1(am); **la figura 11c** muestra la secuencia de ácido nucleico para el plásmido pDSP62; y **la figura 11d** muestra la secuencia de ácido nucleico de pDSP62(am). Nótese que las secuencias de los plásmidos pDSP1(am) y pDSP62(am) difieren de pDSP1 y pDSP62 solo por las sustituciones de nucleótidos que introducen un codón ámbar. **La figura 11e** es la secuencia de ácido nucleico de M13CM1, un derivado de M13KO7 resistente al cloranfenicol.

La figura 12 representa un método para usar pDSP62 y M13CM1 para producir bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias. M13CM1 es un virus ayudante (o virus auxiliar) que permite que pDSP62 se replique a partir de su origen M13. Por lo tanto, si M13CM1 infecta células de E. coli que contienen pDSP62 hace posible la producción de pDSP62 circular monocatenario. Cuando se cultiva en una cepa bacteriana de dut- o ung- el ADN se

sustituye por dUTP en lugar del dTTP normalmente presente en el ADN. La inserción de secuencias de codificación de péptidos se consigue mediante la extensión de un oligonucleótido sintético con ADN polimerasa, y el círculo se cierra con la acción de la ADN ligasa. El ADN circular covalentemente cerrado se introduce por electroporación en una cepa dut+, ung+ de E. coli, donde la cadena sustituida con dUTP se degrada, lo que da como resultado una una alta frecuencia (habitualmente, 85-90%) en la incorporación de las inserciones [10].

Las figuras 13a y 13b representan los plásmidos pP7K (13a) y p2P7K32 (13b). Estos plásmidos se utilizaron durante el desarrollo de la plataforma de VLPs de PP7 simplemente para analizar la tolerancia de inserción del bucle AB de proteínas de recubrimiento de PP7 mediante represión traslacional y ensayos de conjuntos de VLPs (ver la Sección de Ejemplos). No deben confundirse con pET2P7K32 o pDSP7, que se describirán más adelante y se utilizan para la construcción de bibliotecas de VLPs para la selección por afinidad.

La figura 14 proporciona las secuencias de nucleótidos y aminoácidos cerca del bucle AB de proteínas de recubrimiento PP7 y también proporciona las secuencias de partidores que se utilizaron para la inserción de algunas inserciones específicas de péptidos. Se insertaron diversas secuencias de péptidos específicas y aleatorias para analizar la tolerancia general del dímero monocatenario de PP7 hacia las inserciones en los bucles AB, y para determinar la inmunogenicidad de péptidos insertados específicos.

La figura 15 ilustra el esquema utilizado para la construcción de bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias en p2P7K32 con el propósito de demostrar la tolerancia de inserción del bucle AB de la proteína de recubrimiento monocatenaria de PP7. Este método es similar al representado en la figura 5b, que explica la inserción de pDSP1 en el dímero monocatenario de MS2.

La figura 16 proporciona la electroforesis con gel de agarosa practicada a lisados de células completas de 24 clones de cada una de las diversas bibliotecas aquí descritas. Cerca del 100% de los clones obtenidos tenían la capacidad de la represión traslacional, lo cual indicaba la probabilidad de que cada proteína estuviera debidamente plegada. Para verificar que las proteínas se habían plegado correctamente, se evaluó la capacidad de cada una para formar una VLP sometiendo a una selección aleatoria de clones a electroforesis y también a una electrotransferencia ('western blot', en inglés), tal y como se muestra en esta figura. La mitad superior de cada conjunto o colección es el gel teñido con bromuro de etidio, y la mitad inferior es un 'western blot' de un gel de duplicado. La línea más a la izquierda de cada colección es el control de p2P7K32. Cada clon contiene una secuencia de péptidos diferente generada aleatoriamente. El hecho de que casi todas produzcan una VLP demuestra el alto nivel de tolerancia de inserción que tiene el dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento de PP7.

La figura 17a representa el plásmido pETP7K; **la figura 17b** representa el plásmido pET2P7K32; y **la figura 17c** representa el plásmido pDSP7. Estos plásmidos se generaron para la sobreexpresión de alto nivel de la proteína de recubrimiento de PP7. El plásmido pDSP7 contiene un dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento de PP7 en el que una mitad de la secuencia contiene el suficiente número de sustituciones de nucleótidos en las cercanías de las secuencias de codificación de bucles AB como para hacer que las dos mitades sean distinguibles cuando se desee alinear un oligonucleótido mutagénico. En el ejemplo que aquí se muestra, la secuencia 'aguas arriba' completa es modificada para que contenga el mayor número posible de mutaciones silenciosas. PET2P7K32 y pDSP7 deben considerarse análogos de PP7 de los productores de proteínas de recubrimiento de MS2: pDSP1 y pDSP62.

Figura 18 – La electroforesis con gel de agarosa/formaldehído practicada a los ARN extraídos de VLPs producidas en bacterias que contienen pETP7K o PET2P7K32 muestra que las VLPs que producen encapsidan los ARNm que dirigen su síntesis. Esto proporciona un medio para recuperar las secuencias seleccionadas por afinidad mediante transcripción inversa y PCR. Los carriles o líneas alternativos contienen ARN producidos mediante transcripción 'in vitro' de los mismos plásmidos. El panel de la izquierda muestra el gel teñido con etidio. A la derecha hay una mancha o 'blot' de un gel de duplicado sondado con un oligonucleótido específico para la cadena codificante (o cadena homosentido) de proteínas de recubrimiento de PP7. Esta sonda no reacciona con cantidades similares de ARN derivado de una transcripción 'in vitro' de secuencias de proteínas de recubrimiento de MS2 o Qß (no se muestra).

La figura 19 proporciona una lista de varias secuencias de péptidos específicas clonadas en la proteína de recubrimiento de PP7.

La figura 20 ilustra cómo un anti-L2 mAb (RG-1) se une con VLPs de PP7 que expresan péptidos L2 (también llamadas L2-VLPs), pero no con VLPs de PP7 que expresan péptidos V3 (también llamadas V3-VLPs). Se hizo reaccionar disoluciones de mAb RG-1 con 500 ng/pozo de L2-VLPs y V3-VLPs. El enlace o unión se detectó utilizando un anticuerpo secundario de cabra contra IgG (inmunoglobulinas) de ratón marcado con peroxidasa de rábano, seguido de un desarrollo con ABTS. La reactividad se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm (OD 405).

La figura 21 ilustra que las VLPs de PP7 que expresan péptidos V3 inducen respuestas de anti-V3 IgG tras la inmunización. Se muestran las respuestas de anticuerpos anti-V3 IgG en ratones inmunizados con V3-VLPs de PP7

o, como control, con L2-VLPs. Se inmunizó a los ratones tres veces utilizando 10 µg de VLPs con adyuvante de Freund incompleto y los sueros se recogieron dos semanas después de la última estimulación. Se analizaron sueros diluidos de siete ratones individuales (seis inmunizados con V3-VLPs y uno inmunizado con L2-VLPs) para comprobar la reactividad con un péptido que represente una parte del bucle V3 de HIV_{LAI} tratado con ELISA. El enlace o unión se detectó utilizando un anticuerpo secundario de cabra contra IgG (inmunoglobulinas) de ratón marcado con peroxidasa de rábano, seguido de un desarrollo con ABTS. La reactividad se determinó midiendo la absorbancia a 405 nm (OD 405).

La figura 22 muestra los resultados de la selección por afinidad utilizando una expresión de VLPs de MS2 con el anticuerpo anti-Flag M2; la secuencia del epítopo de este anticuerpo ha sido completamente descrita previamente por otros. Se muestran las secuencias de unos pocos péptidos de cada una de las cuatro rondas para ilustrar el progreso de la selección. Los péptidos de las rondas 1 y 2 contienen elementos reconocibles del epítopo nativo, pero para las rondas 3 y 4 la similitud es evidente, de manera que las secuencias coinciden estrechamente con la del epítopo de tipo natural. De hecho, la secuencia de la ronda 4 se corresponde con el epítopo nativo más estrechamente que las secuencias previamente obtenidas con el conocido método de expresión de fagos filamentosos ('filamentous phage display method') (ver 'NEB Transcript, Summer, 1006' – disponible en la página web de New England Biolabs: www.neb.com).

Las figuras 23a-23d muestran las secuencias de nucleótidos de los plásmidos pET2P7K32, pET2P7K32(am), pDSP7 y pDSP7(am). Estos son los análogos productores de proteínas de recubrimiento de PP7 de los correspondientes productores de VLPs de MS2 mostrados en las figuras 11a-11d.

Descripción detallada de la invención

[0033] De acuerdo con la presente invención, se emplearán técnicas convencionales de biología molecular, microbiología y ADN recombinante relacionadas con estos ámbitos. Estas técnicas se explican con detalle en la literatura relacionada. Ver, por ejemplo, Sambrook et al, 2001, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, ed., 1994, "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III; Celis, ed., 1994, "Cell Biology: A Laboratory Handbook" Volumes I-III; Coligan, ed., 1994, "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III; Gait ed., 1984, "Oligonucleotide Synthesis"; Hames & Higgins eds., 1985, "Nucleic Acid Hybridization"; Hames & Higgins, eds., 1984,"Transcription And Translation"; Freshney, ed., 1986, "Animal Cell Culture"; IRL Press, 1986, "Immobilized Cells And Enzymes"; Perbal, 1984, "A Practical Guide To Molecular Cloning".

[0034] Cuando se ofrezca un rango o intervalo de valores, debe entenderse que cada valor intermedio (hasta la décima parte de la unidad del límite inferior -a menos que el contexto indique claramente lo contrario-, entre el límite superior e inferior de este intervalo y cualquier otro valor intermedio o establecido dentro del intervalo establecido) está incluido en la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también se incluyen dentro de la invención, estando sujetos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen ambos o uno de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

[0035] A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado que el que entiende normalmente alguien con conocimientos y capacidades comunes en la materia a la que pertenece esta invención. A pesar de que cualquier método y material similar o equivalente a los aquí descritos también puede utilizarse en la práctica o en el estudio de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describirán a continuación.

[0036] Debe entenderse que, tal y como se utilizan en el presente texto y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares 'un', 'uno', 'una' y 'el', 'la' pueden hacer referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

[0037] Además, los términos siguientes tendrán las definiciones precisadas más abajo.

[0038] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'polinucleótido' hace referencia a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, tanto ribonucleótidos como desoxinucleótidos, e incluye ADN y ARN monocatenarios (o de una sola cadena) o bicatenarios (de dos cadenas). Un polinucleótido puede incluir secuencias de nucleótidos con diferentes funciones, como las regiones codificantes, y regiones no codificantes como las secuencias reguladoras (por ejemplo, promotores o terminadores transcripcionales). Un polinucleótido se puede obtener directamente de una fuente natural, o puede prepararse con la ayuda de técnicas recombinantes, enzimáticas o químicas. Un polinucleótido puede tener una topología lineal o circular. Un polinucleótido puede ser, por ejemplo, una parte de un plásmido o vector fágico, como un vector de expresión o un vector de clonación, o un fragmento.

[0039] Las endonucleasas de restricción son enzimas que escinden el ADN en secuencias bien definidas. Se usan en la tecnología de ADN recombinante, por ejemplo, para generar fragmentos específicos de ADN que se unen

fácilmente -gracias a la acción de la ADN ligasa- a otros fragmentos de ADN generados mediante digestión con la misma endonucleasa de restricción. En esta aplicación, se hace referencia a diversas endonucleasas de restricción específicas, incluyendo SalI, KpnI y BamHI, cuyas secuencias de reconocimiento son, respectivamente, GTCGAC, GGTACC y GGATCC.

[0040] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'polipéptido' hace referencia, en líneas generales, a un polímero de dos o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El término 'polipéptido' también incluye moléculas que contienen más de un polipéptido unidos mediante enlaces disulfuros, o complejos de polipéptidos que están unidos, covalentemente o no covalentemente, como multímeros (por ejemplo, dímeros, tetrámeros). Así, los términos, 'péptido', 'oligopéptido' y 'proteína' están todos incluidos dentro de la definición de polipéptido y estos términos se usan indistintamente. Debe entenderse que estos términos no connotan una longitud específica de un polímero de aminoácidos, y tampoco se pretende que impliquen y distingan si el polipéptido se produce utilizando técnicas recombinantes, o síntesis químicas o enzimáticas, o se da de manera natural.

[0041] El término 'dímero monocatenario' hace referencia a una proteína normalmente dimérica cuyas dos subunidades se han fusionado genéticamente (químicamente, mediante enlaces covalentes) en una única cadena de polipéptidos. Específicamente, en la presente invención se construyeron versiones de dímeros monocatenarios de proteínas de recubrimiento de MS2 y PP7. Cada una de estas proteínas es de manera natural un dímero de cadenas de polipéptidos idénticas. En ambos dímeros de proteínas de recubrimiento de MS2 y PP7 el extremo N-terminal de una de las subunidades se encuentra físicamente cerca del extremo C-terminal de la subunidad acompañante (ver figura 1). Los dímeros monocatenarios de proteínas de recubrimiento se produjeron con métodos de ADN recombinante que duplicaban la secuencia de codificación de ADN de las proteínas de recubrimiento y después las fusionaban unas con otras con el 'método de cola a punta' ('in tail to head fashion', en inglés). El resultado es una única cadena de polipéptidos en la que el aminoácido de la proteína de recubrimiento aparece dos veces, de manera que el extremo C-terminal de la copia 'aguas arriba' está fusionado covalentemente con el extremo N-terminal de la copia 'aguas abajo'. Normalmente ('wild-type' o de tipo natural) las dos subunidades están asociadas solamente mediante interacciones no covalentes entre las dos cadenas. En el dímero monocatenario, estas interacciones se mantienen, pero, adicionalmente, las dos subunidades se han unido covalentemente una a la otra. Esto estabiliza enormemente la estructura plegada de la proteína y le confiere su alta tolerancia a las inserciones de péptidos, tal y como se ha descrito previamente.

[0042] La presente aplicación hace referencia frecuentemente al 'bucle AB' ('AB-loop', en inglés) de las proteínas de recubrimiento. Las proteínas de recubrimiento de fagos de ARN tienen una estructura terciaria protegida. Las proteínas de recubrimiento de MS2 y PP7, por ejemplo, tienen ambas una estructura ilustrada mediante la proteína de recubrimiento de MS2 mostrada en la figura 1. Cada una de las cadenas de polipéptidos se pliega en diversas cadenas ß (o láminas ß) señaladas mediante letras de la A a la G. Las cadenas ß A y B forman una horquilla con un bucle de tres aminoácidos que conecta las dos cadenas en la parte superior de la horquilla, donde se expone en la superficie de la VLP. Tal y como se muestra en esta aplicación, los péptidos que se insertan en el bucle AB se exponen en la superficie de la VLP y son fuertemente inmunogénicos.

[0043] Se prefiere que los residuos de aminoácidos aquí descritos tengan una forma 'L' isómera. Sin embargo, los residuos con forma 'D' isómera pueden sustituirse con cualquier residuo de L-aminoácido, siempre y cuando el polipéptido conserve la función deseada. NH_2 hace referencia al grupo amino libre presente en el extremo amino de un polipéptido. COOH hace referencia al grupo carboxilo libre presente en el extremo carboxilo de un polipéptido.

[0044] El término 'secuencia de codificación' (o 'secuencia codificante') se define en el presente texto como una parte de una secuencia de ácido nucleico que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Generalmente, los límites de la secuencia de codificación vienen determinados por un sitio de unión de ribosomas (Shine-Dalgarno) y un codón de iniciación de traducción (normalmente AUG) en las procariotas, o por el codón de inicio AUG en las eucariotas localizadas en el inicio del marco abierto de lectura, normalmente cerca del extremo 5' del ARNm, y una secuencia de la terminación de la traducción (uno de los codones sin sentido: UAG, UGA, or UAA) que se localiza en el extremo del marco abierto de lectura y lo especifica, normalmente cerca del extremo 3' del ARNm. Una secuencia de codificación puede incluir -pero no se limita a- ADN, ADNc y secuencias de ácido nucleico recombinantes.

[0045] Tal y como se ha explicado brevemente más arriba, un 'codón de parada' o 'codón de terminación' es un triplete de nucleótidos que se encuentra dentro del ARN mensajero y señala la terminación de la traducción. Las proteínas son secuencias únicas de aminoácidos, y la mayoría de codones en el ARN mensajero corresponden a la adición de un aminoácido a una cadena de proteínas en crecimiento -los codones de parada señalan la terminación de este proceso, liberando la cadena de aminoácidos-. En el código genético estándar, existen tres codones de parada: UAG (en ARN) / TAG (en ADN) (también conocido como codón de parada 'ámbar'), UAA / TAA (también conocido como codón de parada 'ocre') y UGA / TGA (también conocido como codón de parada 'ópalo'). Se conocen diferentes variaciones de este grupo predominante. Normalmente, el uso de un codón de parada en la presente invención detendrá o terminará la síntesis de proteínas. Sin embargo, hay mutaciones en los ARNt que les permiten reconocer los codones de parada, haciendo que los ribosomas 'ultralean' ('read through', en inglés) el codón de parada y permitiendo la síntesis de péptidos codificados 'aguas abajo' del codón de parada [11-13]. Por ejemplo, una

mutación en el ARNt que reconoce el codón de parada ámbar permite que la traducción 'ultralea' el codón y produzca una proteína de longitud completa, recuperando así la forma normal de la proteína y 'suprimiendo' el codón de parada. Más a menudo, la supresión de los codones de parada solo es parcialmente eficiente -a menudo, solo un pequeño porcentaje de ribosomas puede 'ultraleer' el codón de parada-. Sin embargo, en algunas ocasiones la supresión puede ser mucho más eficiente. Unos pocos ARNt supresores simplemente tienen una eficiencia intrínseca más elevada. En otros casos, un supresor débil puede hacerse más eficiente simplemente expresándolo a niveles más altos. En realizaciones de la presente invención, se incorpora un codón de parada a las unidades transcripcionales para controlar la síntesis de péptidos codificados en la unidad transcripcional 'aguas abajo' del codón de parada. Al mantener la síntesis controlada del ARNt que reconoce el codón de parada y permite la síntesis de péptidos 'aguas abajo' del codón de parada, se puede producir una proteína de recubrimiento que comprende un péptido heterólogo dentro de una población de proteínas de recubrimiento, la mayoría de las cuales no contienen un péptido heterólogo. Las VLPs resultantes que se juntan o ensamblan a partir de esta mezcla de péptidos heterólogos que contienen proteínas de recubrimiento de tipo natural (ausencia de péptidos heterólogos) conllevan una presentación heteróloga con una valencia mucho más baja.

[0046] Una región 'heteróloga' de una célula recombinante es un segmento identificable de ácido nucleico dentro de una molécula más grande de ácido nucleico que por naturaleza no se encuentra asociado con la molécula más grande.

[0047] La 'valencia' de una VLP hace referencia al número de copias de un péptido heterólogo expresado en las partículas. Una partícula vírica que muestra una 'valencia baja' de un péptido heterólogo, preferiblemente un péptido inmunogénico de al menos 4 unidades peptídicas, es una partícula que expresa desde menos de uno hasta alrededor de diez o más péptidos heterólogos en los dímeros de polipéptidos de recubrimiento que comprenden la mencionada partícula vírica. Las partículas víricas que muestran una valencia baja están formadas a partir de numerosos dímeros de polipéptidos de recubrimiento que están libres de péptidos heterólogos (preferiblemente, polipéptidos de recubrimiento de tipo natural) y a partir de una minoría de dímeros de polipéptidos de recubrimiento que comprenden péptidos heterólogos, preferiblemente en el bucle AB de la subunidad 'aguas abajo' del polipéptido de recubrimiento o en el extremo carboxilo del polipéptido de dímeros de recubrimiento monocatenarios, formando así una VLP en mosaico.

[0048] Usado en este contexto, un 'origen de replicación' hace referencia normalmente a aquellas secuencias de ADN que participan en la síntesis de ADN especificando una región para la iniciación de la replicación de ADN. En presencia de los factores necesarios (ADN polimerasas y similares) un origen de replicación provoca que el ADN asociado con él se replique. Por ejemplo, el origen de replicación de ColE1 (usado en plásmidos como pDSP1, etc.) dota a muchos vectores para la clonación de plásmidos usados habitualmente con la capacidad de replicarse independientemente del cromosoma bacteriano. Otro ejemplo es el origen de replicación p15A, que se usa en el plásmido pNMsupA, descrito en otra parte del presente texto (ver figura 7). La presencia, en un plásmido, de un origen de replicación adicional del fago M13 (por ejemplo, como con pDSP62) confiere la capacidad adicional de replicar utilizando ese origen cuando las células de E. coli se infectan con un -así llamado- fago ayudante (por ejemplo, M13CM1, descrito en la presente aplicación), que proporciona los factores proteicos necesarios. M13 se replica o reproduce intracelularmente como ADN circular bicatenario, pero también produce un forma circular monocatenaria, que empaqueta en la partícula fágica. Esta partículas proporcionan una fuente adecuada de ADN circular monocatenario para plásmidos como pDSP62 y pDSP7 (descritos en otra parte de la presente aplicación), lo cual es útil para la construcción de bibliotecas usando el método ilustrado en la figura 12.

[0049] Una 'secuencia promotora' es una región de regulación de ADN que puede unir ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia de codificación 'aguas abajo' (en dirección a 3'). Con el objeto de definir la presente invención, la secuencia promotora incluye el número mínimo de bases o elementos necesarios para iniciar la transcripción en los niveles detectables anteriormente mencionados. En el promotor se encontrarán secuencias de ADN responsables de la unión de ARN polimerasa y cualquiera de los factores asociados necesarios para la iniciación de la transcripción. En las bacterias, los promotores constan normalmente de secuencias consenso -35 y -10 y un sitio de iniciación transcripcional más o menos específico. A menudo, pero no siempre, los promotores eucariotas contienen cajas 'TATA' y cajas 'CAT'. Los vectores de expresión bacteriana (normalmente plásmidos o fagos) utilizan habitualmente promotores derivados de fuentes naturales, incluyendo aquéllos derivados de la lactosa, la arabinosa y el triptófano de E. coli y de los operones ProB, así como otros a partir de fuentes bacteriofágicas. Los ejemplos incluyen promotores de bacteriófagos lambda, T7, T3 y SP6.

[0050] En las bacterias, la transcripción termina normalmente en secuencias de terminación transcripcional específicas, que normalmente se clasifican como terminadores rho-dependientes y rho-independientes (o intrínsecos), dependiendo de si necesitan de la acción de un rho-factor bacteriano para su actividad. Estos terminadores especifican los sitios en los que se obliga a la ARN polimerasa a cesar su actividad transcripcional, y, de este modo, definen en gran medida los extremos 3' de los ARN, a pesar de que, a veces, la acción posterior de las ribonucleasas también recorta el ADN.

[0051] Un 'gen resistente a los antibióticos' hace referencia a un gen que codifica una proteína que hace que una bacteria sea resistente a un antibiótico determinado. Por ejemplo, el gen resistente a la kanamicina dirige la síntesis

de una fosfotransferasa que modifica y desactiva el fármaco. La presencia de plásmidos (por ejemplo, pDSP1) de un gen resistente a la kanamicina proporciona un mecanismo para seleccionar la presencia del plásmido en la bacteria transformada. De manera similar, el gen resistente al cloranfenicol permite que las bacterias crezcan en presencia del fármaco produciendo una enzima acetiltransferasa que desactiva el antibiótico mediante acetilación. La resistencia al cloranfenicol se utiliza para asegurar el mantenimiento de pNMsupA y M13CM1 en las bacterias.

[0052] 'Transcripción inversa' y 'PCR' se presentan como un medio de amplificar o aumentar las secuencias de ácido nucleico de VLPs seleccionadas por afinidad. 'Transcripción inversa' hace referencia al proceso mediante el cual una copia de ADN de una molécula de ARN (o ADNc) es producida por la acción de la enzima transcriptasa inversa. En la presente aplicación, la transcripción inversa se usa para producir una copia de ADN de secuencias de ARN encapsidadas con VLPs seleccionadas por afinidad. La enzima transcriptasa inversa requiere que un partidor se alinee con el ARN (ver más abajo).

[0053] El término 'PCR' hace referencia a la reacción en cadena de la polimerasa, una técnica utilizada para la amplificación de secuencias específicas de ADN 'in vitro'. El término 'partidor (de) PCR' hace referencia a secuencias de ADN (normalmente, oligonucleotidos sintéticos) que pueden alinearse con un ADN objetivo, permitiendo así que la ADN polimerasa (por ejemplo, TAQ ADN polimerasa) comience la síntesis de ADN. Pares de partidores PCR se utilizan en la reacción en cadena de polimerasa para comenzar la síntesis de ADN en cada una de las dos cadenas de un ADN y para amplificar así el segmento de ADN que hay entre dos partidores, tal y como se ilustra, por ejemplo, en las figuras 9b y 15.

[0054] A continuación se ofrecen ejemplos de partidores utilizados para la transcripción inversa y la PCR.
E2: 5' TCA GCG GTG GCA GCA GCC AA 3' - se alinea cerca de los extremos 3' de los ARN encapsidados por las VLPs descritas en la presente aplicación. Se usa para la transcripción inversa.
E3.2: 5' CGG GCT TTG TTA GCA GCC GG 3' - se alinea cerca de los extremos 3' de los ADNc generados mediante la transcripción inversa arriba descrita en un sitio justo 'aguas arriba' del primer sitio E2; sirve como partidor de 3' en las reacciones PCR para amplificar secuencias seleccionadas por afinidad.
Los partidores de E2 y E3 contienen secuencias comunes a pDSP1, pDSP1(am), pDSP62, pDSP62(am), pET2P7K32, pET2P7K32(am), pDSP7 y pDSP7(am) y, por lo tanto, son útiles para la transcripción inversa y la PCR de ARN encapsidado por VLPs de estas fuentes. La PCR depende de que E3.2 se empareje con uno de los partidores de 5' específicos para plásmidos que se han descrito previamente. Por simplificar, solo se muestran los partidores para pDSP1 y pDSP1(am), pero debe entenderse que, si son necesarios, se utilizan partidores similares específicos para las secuencias encontradas en las otras VLPs.
J2: 5' ACT CCG GCC TCT ACG GCA AC 3' - un partidor que se alinea específicamente con las secuencias que hay en la unión entre las secuencias del dímero monocatenario de pDSP1. En una reacción PCR con E3.2, se amplifica un segmento de ADN que contiene la mitad 'aguas abajo' del dímero monocatenario (incluyendo la secuencia del péptido insertado en el bucle AB). La digestión del producto de la PCR realizada con SalI y BamHI produce un fragmento que puede insertarse entre SalI y BamHI del plásmido relevante (ver figura 9a, por ejemplo).
J2 (ámbar): 5' AC TCC GGC ATC TAC TAG AAC TTT AC 3' - Este partidor funciona exactamente como J2 de más arriba, pero es específico para las secuencias generadas a partir de pDSP1(am).

[0055] Una 'secuencia de control de expresión' es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y la traducción de otra secuencia de ADN. Una secuencia de codificación está 'bajo el control' de las secuencias transcripcionales y de traducción en una célula cuando la ARN polimerasa transcribe la secuencia de codificación a un ARNm, que después se traduce a la proteína codificada por secuencia de codificación. Las secuencias de control transcripcional son secuencias reguladoras de ADN, como promotores, potenciadores (o 'enhancers'), señales de poliadenilación, terminadores y similares, que mantienen la expresión de una secuencia de codificación en una célula huésped. Las secuencias de control traslacional determinan la eficiencia de traducción de un ARN mensajero, normalmente controlando la eficiencia de unirse con ribosomas y la iniciación de la traducción. Por ejemplo, tal y como se ha explicado en otras partes de esta aplicación, las proteínas de recubrimiento de los fagos de ARN son represores de traducción bien conocidos de la replicasa de fagos. A medida que la proteína de recubrimiento se acumula en la célula infectada hasta una concentración lo suficientemente alta, se une con una horquilla de ARN que contiene la región de iniciación de traducción (Shine-Dalgarno e iniciador AUG) del gen de la replicasa del fago. Esto evita que el ribosoma se una y corta la síntesis de replicasa en un momento en el ciclo vital del virus en el que sucede la transición de la replicación a la unión o ensamblaje del virus.

[0056] Una célula ha sido 'transformada' por un ADN exógeno o heterólogo cuando dicho ADN ha sido introducido en la célula. El ADN transformador puede estar -o no- integrado (vinculado covalentemente) en el ADN cromosómico que constituye el genoma de la célula. En las procariotas, las células de la levadura y las células de los mamíferos, por ejemplo, el ADN transformador puede mantenerse en un elemento episomal como un plásmido, que normalmente se reproduce independientemente del cromosoma bacteriano debido a la presencia de un origen de replicación en el plásmido. Con respecto a las células eucariotas, una célula transformada de manera estable es aquella en la que el ADN transformador se ha integrado en el un cromosoma de manera que es heredado por las células hijas mediante la reproducción cromosómica. Esta estabilidad se demuestra por la capacidad de la célula eucariota para establecer líneas celulares o clones compuestos de una población de células hijas que contienen ADN transformador.

[0057] Debe entenderse que también están dentro del alcance de la presente invención las secuencias de ácido nucleico que codifican los polipéptidos de la presente invención, que codifican un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que las secuencias aquí desveladas, pero que degeneran en los ácidos nucleicos aquí desvelados. Por 'degenerar en' se entiende que un codón de tres letras diferentes se utiliza para especificar un aminoácido particular.

[0058] Tal y como se utiliza en el presente texto, 'epítopo' hace referencia a un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítopo podría comprender 3 aminoácidos en una configuración o conformación espacial que es exclusiva de dicho epítopo. Normalmente, un epítopo consta de al menos 5 aminoácidos de este tipo, y, más habitualmente, consta de al menos 8-10 aminoácidos. Se conocen en este campo los métodos para determinar la conformación espacial de los aminoácidos, e incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos x y la resonancia magnética nuclear en dos dimensiones.

[0059] Tal y como se utiliza en el presente texto, un mimótopo es un péptido que imita a un epítopo antigénico verdadero. En algunos casos, la secuencia de aminoácidos puede mostrar algunas similitudes con el epítopo del antígeno original, pero, en otros casos, existen pocas o ninguna similitud en la secuencia. En estos casos, el mimótopo imita la estructura tridimensional del epítopo utilizando una secuencia de aminoácidos diferente. Los mimótopos pueden identificarse porque imitan incluso a los epítopos que no son peptídicos, como los de los antígenos de los carbohidratos.

[0060] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'proteína(s) de recubrimiento' hace referencia a la(s) proteína(s) de un bacteriófago o un fago de ARN (ARN-fago) que puede(n) incorporarse al ensamblaje de cápsidas del bacteriófago o del fago de ARN.

[0061] Tal y como se utiliza en el presente texto, un 'polipéptido de recubrimiento' se define como un fragmento polipéptidico de la proteína de recubrimiento que posee las funciones de la proteína de recubrimiento y, de manera adicional, también abarca toda la longitud de la proteína de recubrimiento o variantes monocatenarias de esta.

[0062] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'respuesta inmune' (o respuesta inmunitaria) hace referencia a una respuesta inmune humoral y/o a una respuesta inmune celular que conlleva la activación o proliferación de los linfocitos B y/o T y/o de las células que presentan antígenos. Sin embargo, en ciertas ocasiones las respuestas inmunes pueden ser de baja intensidad y ser detectables solo cuando se utiliza al menos una sustancia de acuerdo con la presente invención. 'Inmunogénico' hace referencia a un agente utilizado para estimular el sistema inmune de un organismo vivo, de manera que una o más funciones del sistema inmune se incrementan y se orientan hacia el agente inmunogénico. Un 'polipéptido inmunogénico' es un polipéptido que provoca una respuesta inmune celular y/o humoral, ya sea por su cuenta o vinculado a un portador en presencia o ausencia de un adyuvante. Preferiblemente, se activarán las células que presentan antígenos.

[0063] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'autoantígeno' hace referencia a las proteínas codificadas por el ADN del huésped y a los productos generados por las proteínas o al ARN codificado por el ADN del huésped. Además, las proteínas que se obtienen de una combinación de dos o más automoléculas o que representan una fracción de una automolécula y las proteínas que tienen una alta homología de dos automoléculas tal y como se han definido previamente (>95%, preferiblemente >97%, más preferiblemente >99%) también pueden considerarse 'auto'. Los ejemplos de un autoantígeno incluyen, pero no se limitan a, ErbB-2, amiloide-beta, immunoglobulina E (IgE), gastrina, grelina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina (IL)-17, IL-23, IL-13, CCR5, CXCR4, factor de crecimiento nervioso (FCN o NGF), angiotensina II, TRANCE/RANKL y MUC-1.

[0064] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'vacuna' hace referencia a una formulación que presenta una forma en la que puede ser administrada a un animal.

[0065] Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'partícula tipo-virus de un bacteriófago' hace referencia a una 'partícula tipo-virus' (o 'partícula como-virus'; también llamada VLP, por su nombre en inglés: 'virus-like particle') que se se parece a la estructura de un bacteriófago, y que es no replicativa y no infecciosa, y que normalmente carece de uno o más genes víricos necesarios para la propagación del bacteriófago como virus infeccioso. Habitualmente, las VLPs de bacteriófagos de ARN también carecen del gen o genes que codifican la proteína o las proteínas responsables de la unión vírica al huésped o de la entrada en este.

[0066] Esta definición también incluye las partículas tipo-virus de bacteriófagos, en las que el gen o genes previamente mencionados todavía están presentes pero inactivos, y, por lo tanto, también conllevan partículas tipo-virus de bacteriófagos no replicativas y no infecciosas.

[0067] Una 'VLP de proteínas de recubrimiento de bacteriófagos de ARN' se define como la estructura con forma de cápsida formada a partir del autoensamblaje de una o más subunidades de proteínas de recubrimiento de bacteriófago de ARN y contiene habitualmente ARNm para la propia proteína de recubrimiento y, opcionalmente, ARN huésped. Para los objetivos de la presente aplicación, las VLPs de fagos de ARN están formadas, normalmente, a partir de 180 copias de un dímero de proteínas de recubrimiento de tipo natural, o a partir de 90

copias de proteína de recubrimiento de dímero monocatenario, o como VLPs en mosaico que contienen un número variable de dímeros de tipo natural y proteínas de recubrimiento de dímeros monocatenarios, haciendo un total de 90 por partícula.

[0068] Una molécula de ácido nucleico está 'operativamente vinculada' con u 'operativamente asociada' con una secuencia de control de expresión cuando la secuencia de control de expresión controla y regula la transcripción y la traducción de la secuencia de ácido nucleico. El término 'operativamente vinculado' incluye tener una señal de inicio adecuada (por ejemplo, ATG) delante de la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar y mantener el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de ácido nucleico bajo el control de la secuencia de control de expresión y la producción del producto deseado codificado por la secuencia de ácido nucleico. Si un gen que se desea insertar en una molécula de ADN recombinante no contiene una señal de inicio apropiada, dicha señal de inicio puede insertarse delante del gen.

[0069] El término 'condiciones de hibridación rigurosas' es conocido para aquellos versados en la materia y puede encontrarse en 'Current Protocols in Molecular Biology', John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido -y no limitativo- de condiciones de hibridación rigurosas es la hibridación en 6x cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45ºC, seguida de uno o más lavados en 0.2.X SSC, 0.1% SDS a 50ªC, preferiblemente a 55ºC, y más preferiblemente a 60ºC o 65ºC.

Producción de partículas tipo-virus

[0070] Se describen las partículas de fagos tipo-virus y también los métodos para producir estas partículas 'in vivo' e 'in vitro'. Normalmente, estas partículas se producen 'in vivo'; sin embargo, el uso de estas partículas también se puede aplicar en un escenario 'in vitro'. La presente invención hace posible aumentar la complejidad del laboratorio y reduce el tiempo necesario para una selección iterativa. Normalmente, los métodos incluyen la producción de viriones 'in vitro' y la recuperación de los viriones. Tal y como se utiliza en el presente texto, producir viriones 'in vitro' hace referencia a la producción de viriones fuera de una célula, por ejemplo, en un sistema libre de células, mientras que producir viriones 'in vivo' hace referencia a la producción de viriones dentro de una célula, por ejemplo, una célula de 'Eschericia coli' or 'Pseudomonas aeruginosa'.

Bacteriófagos

[0071] El sistema que aquí se concibe se basa en las propiedades de los bacteriófagos de ARN monocatenarios (ver Bacteriófagos de ARN en 'The Bacteriophages'. Calendar, RL, ed. Oxford University Press. 2005). Los virus conocidos de este grupo atacan a bacterias tan diversas como 'E.coli', 'Pseudomonas' y 'Acinetobacter'. Cada uno posee una organización genómica, una estrategia de reproducción y una estructura viriónica muy similares. En particular, los bacteriófagos contienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo (+), contienen genes de replicasa, recubrimiento y maturasa, y tienen cápsidas icosaédricas pequeñas (<300 angstrom). Estos incluyen, pero no se limitan a, bacteriófagos de ARN MS2, Qβ, R17, SP, PP7, GA, M11, MX1, f4, Cb5, Cb12r, Cb23r, 7s y f2.

[0072] PP7 es un bacteriófago de ARN monocatenario de 'Pseudomonas aeroginosa' y un pariente lejano de colífagos como MS2 y Qβ. A pesar de que el bacteriófago PP7 infecta normalmente a 'Pseudomonas aeroginosa', las partículas tipo-virus se producen fácilmente cuando la proteína de recubrimiento de PP7 es expresada en E. coli a partir de plásmidos como los descritos en las figuras 9 y 13. Se determinó que la proteína de recubrimiento de PP7 es una proteína de unión con ARN específica, capaz de reprimir la traducción de secuencias fusionadas a la región de iniciación de traducción de la replicasa de PP7, y con una actividad de unión con ARN específica, puesto que reprime el operador de traducción de PP7, pero no reprime los operadores de los fagos MS2 o Qβ. Se han establecido las condiciones para la purificación de proteínas de recubrimiento y para la reconstitución o rehidratación de su actividad de unión con ARN a partir de partículas tipo-virus desagregadas. Se determinó que la disociación constante del ARN 'in vitro' del operador de PP7 era de alrededor de 1 nM. Utilizando un sistema genético en el que la proteína de recubrimiento reprime la traducción de una proteína de fusión de replicasa-β-galactosidasa, se identificaron residuos de aminoácidos importantes para la unión de ARN de PP7. (Peabody, et al., 'Translational repression and specific RNA binding by the coat protein of the Pseudomonas phage PP72001', J. Biol. Chem., 22 de Junio; 276(25):22507-13. Epub 2001, 16 de Abril).

[0073] Las proteínas de recubrimiento de diversos bacteriófagos de ARN monocatenarios son represores de traducción bien conocidos que cortan la síntesis de replicasa vírica uniéndose a una horquilla de ARN que contiene el sitio de unión de la replicasa de ribosomas. La determinación de la estructura de los fagos de ARN mediante rayos X muestra que las homologías evidentes obtenidas mediante la comparación de secuencias de aminoácidos de proteínas de recubrimiento se reflejan en las estructuras terciarias. El dímero de proteínas de recubrimiento, que es tanto el represor como el bloque de construcción básico de la partícula vírica, consta de dos monómeros entrelazados que juntos forman una gran superficie de láminas beta u hojas plegadas β a la que se agarra el ARN. Cada proteína de recubrimiento utiliza una estructura común para unirse a diferentes ARN, lo cual representa una oportunidad para investigar los fundamentos del reconocimiento específico que las proteínas hacen del ARN. Se describen aquí las propiedades de unión con el ARN de las proteínas de recubrimiento de PP7, un bacteriófago de ARN de 'Pseudomonas aeroginosa' cuya proteína de recubrimiento muestra solo un 13% de aminoácidos en su

identidad de secuencia comparada con la de MS2. También se presentan los siguientes hallazgos: (1) la proteína de recubrimiento de PP7 es un represor de traducción; (2) una horquilla de ARN que contiene el sitio de iniciación de la traducción de la replicasa de PP7 es sujetada específicamente por la proteína de recubrimiento de PP7 tanto 'in vivo' como 'in vitro', lo cual indica que esta estructura representa el operador de traducción, y (3) el sitio de unión del ARN se encuentra en la lámina β de proteínas de recubrimiento. Se ha presentado un mapa de este sitio. *Id.*

[0074] Con la intención de ilustrar, se utiliza el genoma de un miembro del grupo particulamente bien descrito, MS2, que es un ARN monocatenario de sentido positivo (+) con una longitud de 3569 nucleótidos, y que codifica solamente cuatro proteínas, dos de las cuales son componentes estructurales del virión. La partícula vírica está compuesta de una cápsida icosaédrica formada por 180 copias de proteína de recubrimiento y una molécula de proteína de maturasa junto con una molécula de genoma de ARN. La proteína de recubrimiento también es una proteína específica de unión con ARN. El ensamblaje o unión puede iniciarse cuando la proteína de recubrimiento se asocia con su objetivo de reconocimiento específico, una horquilla de ARN cercana al extremo 5' del cistrón de replicasa (ver figura 1B y SEQ ID NO:1 de US20090054246, publicado el 26 de febrero de 2009 e incorporado aquí por completo mediante su referencia). Después, se libera la partícula vírica en el medio cuando la célula estalla bajo la influencia de la proteína de lisis vírica. La formación de un virus infeccioso requiere al menos tres componentes, a saber, proteína de recubrimiento, maturasa y ARN de genoma vírico, pero los experimentos demuestran que la información requerida para el ensamblaje de la cápsida icosaédrica está contenida por completo en la propia proteína de recubrimiento. Por ejemplo, las proteínas de recubrimiento purificadas puden formar cápsidas 'in vitro' en un proceso estimulado por la presencia de ARN (Beckett et al., 1988, J. Mol Biol 204: 939-47). Además, la proteína de recubrimiento expresada en células a partir de un plásmido se ensambla 'in vivo' en una partícula tipo-virus (Peabody, D.S., 1990, J Biol Chem 265: 5684-5689).

Polipéptido de recubrimiento

[0075] Normalmente, el polipéptido de recubrimiento codificado por la región de codificación tiene al menos 120 aminoácidos de largo y, preferiblemente, al menos 125 aminoácidos de largo, y no más de alrededor de 135 aminoácidos de largo y, preferiblemente, no más de 130 aminoácidos de largo. Se espera que se pueda usar un polipéptido de recubrimiento básicamente a partir de cualquier bacteriófago de ARN monocatenario. Los ejemplos de polipéptidos de recubrimiento incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de recubrimiento de MS2 (ver, por ejemplo, SEQ ID N0:2 de US20090054246), polipéptidos de recubrimiento R17 (ver, por ejemplo, Genbank Accession No. P03612), polipéptidos de recubrimiento PRR1 (ver, por ejemplo, Genbank Accesssion No. ABH03627), polipéptido de recubrimiento del fago fr (ver, por ejemplo, Genbank Accession No. NP_039624), polipéptido de recubrimiento GA (ver, por ejemplo, Genbank Accession No. P07234), polipéptido de recubrimiento Qβ (ver, por ejemplo, Genbank Accession No. P03615), polipéptido de recubrimiento SP (ver, por ejemplo, Genbank Accession No P09673), polipéptido de recubrimiento f4 (ver, por ejemplo, Genbank accession No. M37979.1) y polipéptido de recubrimiento PP7 (ver, por ejemplo, Genbank Accession No. PO363 0).

[0076] Los ejemplos de polipéptidos de recubrimiento PP7 incluyen, pero no se limitan a, varias cadenas de dímero de proteína de recubrimiento de PP7 unido a una horquilla de ARN (por ejemplo, Genbank Accession Nos. 2QUXR; 2QUXO; 2QUX_L; 2QUX_I; 2QUX_F y 2QUX_C). *Ver también* el ejemplo 1 del presente texto y Peabody, et al., 'RNA recognition site of PP7 coat protein, Nucleic Acids Research', 2002, Vol. 30, No. 19 4138-4144. [14, 15]

[0077] Los polipéptidos de recubrimiento útiles para la presente invención también incluyen aquellos que tienen similitudes con una o más de las secuencias de polipéptidos de recubrimiento previamente desveladas. Las similitudes hacen referencia a las similitudes estructurales. Las similitudes estructurales pueden determinarse alineando los residuos de las dos secuencias de aminoácidos (es decir, la secuencia de aminoácidos candidata y la secuencia de aminoácidos) para optimizar el número de aminoácidos idénticos a lo largo de las longitudes de sus secuencias; los huecos ('gaps', en inglés) en cualquiera o en ambas secuencias se permiten al realizar el alineamiento con el objetivo de optimizar el número de aminoácidos idénticos, pero los aminoácidos de cada secuencia deben permanecer en el orden correcto. Una secuencia de aminoácidos candidata es la secuencia de aminoácidos que se compara con una secuencia de aminoácidos que está presente, por ejemplo, en SEQ ID NO: 2 de la Solicitud de Patente publicada en EEUU No. US2009/0054246. Una secuencia de aminoácidos candidata puede aislarse a partir de un virus de ARN monocatenario, o puede producirse utilizando técnicas de recombinación, o puede sintetizarse química o enzimáticamente. Preferiblemente, se comparan dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo de mejor ajuste (o 'Best fit') en el paquete CGC (version 10.2, Madison, WI), o el programa Blastp del algoritmo de búsqueda BLAST 2, tal y como describen Tatusova, et al. (FEMS Microbial Lett 1999, 174:247-250), y que está disponible en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html. Preferiblemente, se utilizan los valores predeterminados para todos los parámetros de búsqueda de BLAST 2, incluyendo matrix =BLOSUM62; open gap penalty = 11, extension gap penalty = 1, gap xdropoff = 50, expect = 10, wordsize = 3, y, opcionalmente, 'filter on'. Al comparar dos secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST, se hace referencia a la similitud estructural como 'identidades' ('identities').

[0078] Preferiblemente, un polipéptido de recubrimiento también incluye polipéptidos con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de aminoácidos (o identidad aminoacídica) de al menos un 80%, de al menos un 85%, de al menos un 90% o de al menos un 95% con respecto a una o más de las secuencias de aminoácidos

previamente desveladas. Preferiblemente, un polipéptido de recubrimiento es activo. Se puede determinar si un polipéptido de recubrimiento es activo analizando la capacidad que tiene el polipéptido para formar una cápsida y empaquetar una molécula de ARN monocatenario. Este análisis puede realizarse utilizando un sistema 'in vivo' o 'in vitro', y estos métodos son conocidos en la práctica y en el ámbito relacionados con la presente invención. De manera alternativa, un polipéptido puede considerarse estructuralmente similar si tiene una estructura tridimensional similar y/o una actividad funcional similar a la del citado polipéptido de recubrimiento.

[0079] Las secuencias de péptidos heterólogos insertadas en el polipéptido o en el polipéptido de recubrimiento pueden ser secuencias de péptidos aleatorias. En una realización particular, la secuencia aleatoria tiene la secuencia Xaa_n, en la que n es al menos 4, al menos 6 o al menos 8, y no es más grande que 20, más grande que 18 o más grande que 16, y cada Xaa es un aminoácido aleatorio de manera independiente. De manera alternativa, el fragmento peptídico puede tener una secuencia definida y poseer una funcionalidad conocida (por ejemplo, antigenicidad, inmunogenicidad). La secuencia heteróloga puede estar presente en el extremo amino terminal de un polipéptido de recubrimiento, en el extremo carboxilo terminal de un polipéptido de recubrimiento o estar presente en cualquier otro lugar del polipéptido de recubrimiento. Preferiblemente, la secuencia heteróloga está presente en una localización del polipéptido de recubrimiento de manera que la secuencia insertada se expresa en la superficie exterior de la cápsida. En una realización particular, tal y como se describe en los ejemplos que se ofrecen de aquí en adelante, la secuencia peptídica puede insertarse en las regiones del bucle AB de los polipéptidos de recubrimiento previamente mencionados. Los ejemplos de estas localizaciones incluyen, por ejemplo, la inserción de la secuencia insertada en un polipéptido de recubrimiento que va inmediatamente después de los aminoácidos 11-17, o de los aminoácidos 13-17 del polipéptido de recubrimiento. En una realización aún más particular, el péptido heterólogo se inserta en un sitio que corresponde a los aminoácidos 11-17 o, particularmente, 13-17 de MS-2.

[0080] En algunas realizaciones de acuerdo con la presente invención, el péptido heterólogo se inserta en un sitio que corresponde a:

(a) los aminoácidos 11-17 o, particularmente, 13-17 de los polipéptidos de recubrimiento MS-2, R17 y fr;
(b) los aminoácidos 10-16 del polipéptido de recubrimiento GA;
(c) los aminoácidos 10-17 de los polipéptidos de recubrimiento Qβ y SP;
(d) los aminoácidos 8-11 del polipéptido de recubrimiento PP7 y
(e) los aminoácidos 9-17 del polipéptido de recubrimiento PRR1.

[0081] De manera alternativa, el péptido heterólogo puede insertarse en el extremo N-terminal o C-terminal del polipéptido de recubrimiento.

[0082] El péptido heterólogo puede seleccionarse de un grupo que comprende un péptido VIH, un autoantígeno, un péptido Flag, secuencias de aminoácidos derivadas de la proteína capsídica menor L2 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16), el bucle V3 de HIV-1 gp120, un antígeno protector de 'Bacillus anthracis', un receptor, un ligando que se une a un receptor de la superficie celular, un péptido con afinidad con cualquier extremo de un péptido específico de partículas de fagos filamentosos, un péptido que se une con metales o un péptido con afinidad con la superficie de MS2.

[0083] El péptido heterólogo incluye -pero no se limita a- un péptido seleccionado de un grupo que comprende un péptido VIH, un autoantígeno, un péptido Flag, secuencias de aminoácidos derivadas de la proteína capsídica menor L2 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16), el bucle V3 de HIV-1 gp120, un antígeno protector de 'Bacillus anthracis', un receptor, un ligando que se une a un receptor de la superficie celular, un péptido con afinidad con cualquier extremo de un péptido específico de partículas de fagos filamentosos, un péptido que se une con metales o un péptido con afinidad con la superficie de PP7.

[0084] Con el objeto de determinar la posición correspondiente en un polipéptido de recubrimiento estructuralmente similar, la secuencia de aminoácidos de este polipéptido de recubrimiento estructuralmente similar se alinea con la secuencia del citado polipéptido de recubrimiento tal y como se ha especificado previamente. Por ejemplo, la posición correspondiente de un polipéptido estructuralmente similar al polipéptido de recubrimiento de MS-2 se alinea con SEQ ID NO:2 (de la Solicitud de Patente publicada, US2009/005424). A partir de esta alineación, se puede determinar la posición en el otro polipéptido de recubrimiento que se corresponde con una posición dada de SEQ ID NO: 1 (también de la Solicitud de Patente publicada, US2009/0054246).

[0085] En una realización particular, el polipéptido de recubrimiento es un dímero monocatenario que contiene una subunidad 'aguas arriba' y una subunidad 'aguas abajo'. Cada subunidad contiene una secuencia funcional de polipéptido de recubrimiento. El péptido heterólogo puede insertarse en la subunidad 'aguas arriba' y/o en la subunidad 'aguas abajo' en los sitios mencionados previamente, por ejemplo, preferiblemente la región del bucle A-B de la subunidad 'aguas abajo'. En una realización particular, el polipéptido de recubrimiento es un dímero monocatenario de un polipéptido de recubrimiento de MS2 que puede tener una secuencia descrita en SEQ ID NO: 12 de la Solicitud de Patente US2009/0054246.

[0086] En una realización particular, el polipéptido de recubrimiento es un dímero monocatenario que contiene una

subunidad 'aguas arriba' y una subunidad 'aguas abajo'. Cada subunidad contiene una secuencia funcional de polipéptido de recubrimiento. El péptido heterólogo puede insertarse en la subunidad 'aguas arriba' y/o en la subunidad 'aguas abajo' en los sitios mencionados previamente, por ejemplo, la región del bucle A-B de la subunidad 'aguas abajo'. En una realización particular, el polipéptido de recubrimiento es un dímero monocatenario de un polipéptido de recubrimiento de PP7.

Preparación de la Unidad de Transcripción

[0087] La unidad de transcripción (también llamada unidad transcripcional) de la presente invención comprende una región para la regulación de la expresión (por ejemplo, un promotor), una secuencia que codifica un polipéptido de recubrimiento y un terminador transcripcional. Opcionalmente, el polinucleótido de ARN puede incluir un sitio de reconocimiento de recubrimiento (también llamado 'señal empaquetadora' o 'secuencia del operador de traducción'). De manera alternativa, la unidad de transcripción puede no tener una secuencia del operador de traducción. El promotor, la región de codificación, el terminador transcripcional y, cuando esté presente, el sitio de reconocimiento de recubrimiento generalmente están operativamente vinculados. 'Operativamente vinculado(s)' u 'operativamente asociado(s) con' hacen referencia a una yuxtaposición en la que los componentes descritos tienen una relación que les permite funcionar de la manera pretendida. Una secuencia de regulación está 'operativamente vinculada' u 'operativamente asociada con' una secuencia de codificación cuando se une de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue bajo ciertas condiciones que son compatibles con la secuencia de regulación. El sitio de reconocimiento de recubrimiento, cuando está presente, puede encontrarse en cualquier localización dentro del polinucleótido de ARN siempre y cuando funcione del modo adecuado.

[0088] La invención no está limitada por el uso de un promotor particular, y se conocen una gran variedad de promotores. El promotor utilizado en la presente invención puede ser un promotor constitutivo o un promotor inducible. Los promotores preferidos pueden manejar altos niveles de ARN codificado por la región de codificación que codifica el péptido de recubrimiento. Los ejemplos de estos promotores son conocidos en este ámbito e incluyen, por ejemplo, el promotor lac de T7, T3 y SP6.

[0089] Las secuencias de nucleótidos de las regiones de codificación que codifican los polipéptidos de recubrimiento aquí descritos se determinan fácilmente. Un ejemplo de la clase de secuencias de nucleótidos que codifican uno de los polipéptidos de recubrimiento aquí descritos son los nucleótidos 4080-4470 de SEQ ID NO:3 (de la Solicitud de Patente de EEUU, US2009/0054246). Estas clases de secuencias de nucleótidos son grandes pero finitas, y alguien versado en la materia puede determinar fácilmente la secuencia de nucleótidos de cada miembro de su clase refiriéndose al código genético estándar.

[0090] Además, la secuencia de codificación de un polipéptido de recubrimiento monocatenario de bacteriófago de ARN comprende un sitio para insertar un polipéptido heterólogo, así como una secuencia de codificación para el propio péptido heterólogo. En una realización particular, el sitio para la inserción del péptido heterólogo es un sitio de enzimas de restricción.

[0091] En una realización particular, la región de codificación codifica un dímero monocatenario del polipéptido de recubrimiento. En una realización más particular, la región de codificación codifica un dímero de polipéptido de recubrimiento monocatenario modificado, de manera que la modificación comprende la inserción de una secuencia de codificación de al menos cuatro aminoácidos en el sitio de inserción. Un diágrama esquemático de una realización particular de una unidad de transcripción así se muestra en la figura 3 de la Solicitud de Patente publicada en EEUU US2009/0054246. La unidad de transcipción puede contener un promotor bacteriano, como un promotor lac, o puede contener un promotor bacteriofágico, como un promotor T7 y, opcionalmente, un terminador transcripcional T7.

[0092] Además de contener un promotor y una región de codificación que codifica un polipéptido de fusión, el polinucleótido de ARN incluye normalmente un terminador transcripcional y, opcionalmente, un sitio de reconocimiento de recubrimiento. Un sitio de reconocimiento de recubrimiento es una secuencia de nucleótidos que forma una horquilla cuando está presente como ARN. En este ámbito también se hace referencia a esto como un operador de traducción, una señal empaquetadora y un sitio de unión de ARN. Sin intención de limitar, se cree que esta estructura funciona como el sitio de unión que es reconocido por el represor de traducción (por ejemplo, el polipéptido de recubrimiento), e inicia el empaquetamiento de ARN. Las secuencias de nucleótidos de los sitios de reconocimiento de recubrimiento son conocidas en este campo e incluyen, por ejemplo, nucleótidos en SEQ ID NO: (ver figura 1B de la Solicitud de Patente, US2009/0054246). Se han descrito otras secuencias de reconocimiento de recubrimiento en los bacteriófagos de ARN monocatenario R17, GA, Qβ, SP y PP7, y están disponibles fácilmente para las personas versadas en la materia. Básicamente, puede usarse cualquier terminador transcripcional en el polinucleótido de ARN, siempre y cuando funcione con el promotor. Aquellos versados en la materia conocen los terminadores transcripcionales, pueden disponer de ellos fácilmente y los utilizan habitualmente.

Síntesis

[0093] Tal y como se describirá con más detalle a continuación, las VLPs de la presente invención pueden

sintetizarse 'in vivo' introduciendo unidades de transcripción en bacterias, especialmente si las unidades de transcripción contienen un promotor bacteriano. De manera alternativa, las VLPs podrían producirse 'in vitro' en un sistema conjunto transcripción/traducción sin células.

Ensamblaje de VLPs que encapsidan sustancias heterólogas

[0094] Durante su síntesis, las VLPs se asocian normalmente con el ARN mensajero a partir del cual son producidas mediante traducción. Esto es importante para la capacidad de selección por afinidad del sistema descrito en la presente aplicación. Sin embargo, en otras aplicaciones (por ejemplo, liberación selectiva de fármacos o agentes de imagen) puede ser deseable introducir otras sustancias en la VLP. Estas VLPs pueden unirse o ensamblarse realizando una reacción de ensamblaje de VLPs 'in vitro' en presencia de la sustancia heteróloga. Más específicamente, las subunidades de proteínas de recubrimiento purificadas se obtienen a partir de VLPs que han sido disgregadas con un desnaturalizante (normalmente, ácido acético). Las subunidades proteicas se mezclan con la sustancia heteróloga. En una realización particular, la sustancia tiene cierta afinidad con el interior de la VLP y, preferiblemente, está cargada negativamente.

[0095] Otro método incluye juntar la sustancia heteróloga con una versión de ARN sintético del operador de traducción. Durante una reacción de ensamblaje 'in vitro', el ARN se unirá firmemente con su sitio de reconocimiento y se incorporará de manera eficiente a la VLP resultante, portando con él la sustancia extraña o ajena.

[0096] En otra realización, la sustancia se difunde pasivamente en la VLP a través de poros que existen de manera natural en la superficie de la VLP. En una realización particular, la sustancia es lo suficientemente pequeña como para atravesar estos poros (en el MS2 tienen un diámetro de alrededor de 10 angstroms) y tiene una afinidad alta con el interior de la VLP.

Poblaciones de VLPs

[0097] Tal y como se ha indicado previamente, la invención está orientada a las poblaciones o bibliotecas de VLPs. En la presente especificación, los términos 'población' y 'bibliotecas' se usan indistintamente y, por tanto, se consideran sinónimos. En una realización particular, la biblioteca puede ser una biblioteca aleatoria; en otra realización, la biblioteca es una biblioteca de fragmentos de antígenos, una biblioteca de fragmentos derivados de un polipéptido antigénico.

Bibliotecas aleatorias (Poblaciones)

[0098] Se pueden preparar péptidos que codifican oligonucleótidos. En una realización particular, los tripletes que codifican un aminoácido particular tienen la composición NNS, donde N es A, G, C o T y S es G o T, o, alternativamente, NNY, donde N es A, G, C o T, e Y es C o T. Se insertan múltiples tripletes en el gen de la proteína de recubrimiento, lo que conlleva la inserción de los péptidos correspondientes en el producto proteico. Para minimizar la presencia de codones de parada, las bibliotecas de péptidos pueden construirse usando oligonucleótidos sintetizados a partir de mezclas específicas de trinucleótidos de fosforamidita (disponibles en Glen Research, Inc.), diseñadas para reflejar con más precisión las composiciones de aminoácidos naturales y que carecen completamente de codones de parada.

[0099] La inserción de estas secuencias aleatorias en proteínas de recubrimiento conlleva la síntesis de una población (o biblioteca) de VLPs, de manera que cada partícula expresa un péptido diferente en su superficie. Estas poblaciones pueden ser extremadamente grandes y comprender miles de millones de miembros individuales. Se observa habitualmente que los ligandos específicos para prácticamente cualquier receptor (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) están presentes en estas bibliotecas, pero normalmente representan una minúscula fracción de la población completa. La selección por afinidad, seguida de la amplificación (en el caso de la presente invención, mediante transcripción inversa y PCR de ARN encapsidado) permite la recuperación, el análisis y la explotación de estas raras especies.

Ejemplos

[0100] La presente invención se comprenderá mejor en referencia a los siguientes ejemplos -no limitativos-, que se ofrecen como modelo ilustrativo de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan en orden para ilustrar más completamente las realizaciones preferidas de la invención y no debe interpretarse de ninguna manera que limitan el amplio alcance de la presente invención.

Producción de VLPs que muestran péptidos heterólogos de valencia baja.

[0101] La presente aplicación detalla recientes avances en el desarrollo de tecnología para la expresión de péptidos en VLPs de MS2, incluyendo descripciones de nuevos vectores plásmidos para la producción sencilla de bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias y para el control de la expresión y valencia de péptidos. Esto representa un avance en las metodologías que se describen en la solicitud publicada en EEUU, US20090054246.

[0102] La presente invención está orientada al desarrollo de una plataforma de partículas tipo-virus (VLP) de MS2 con una capacidad de selección por afinidad análoga a la de la técnica de expresión de fagos filamentosos ('filamentous phage display', en inglés). La presente invención se basa parcialmente en la capacidad que tienen las proteínas de recubrimiento de bacteriófagos de ARN para expresar péptidos extraños y encapsidar los mismos ARNm que sirven como plantilla para su síntesis. El proceso implica la síntesis de fusiones de péptidos de proteínas aleatorias de recubrimiento de plásmidos en células bacterianas que forman VLPs. Las VLPs se extraen de las células y se someten a transcripción inversa y PCR para recuperar y amplificar las secuencias encapsidadas, que después se clonan y se reintroducen en las bacterias, donde sirven como plantilla para otra ronda de síntesis, ensamblaje y selección. El proceso se repite durante tantos ciclos como sea necesario y, al final, las secuencias seleccionadas se clonan para la expresión bacteriana de alto nivel de las VLPs seleccionadas.

[0103] El presente método, que está siendo desarrollado para facilitar el descubrimiento de vacunas, entre otros usos, tiene importantes características que no estaban disponibles a la vez en una única plataforma. En primer lugar, el presente método garantiza una alta inmunogenicidad expresando péptidos extraños como densas matrices de repetición en la superficie de una partícula tipo-virus (VLP). Esto provoca poderosas respuestas inmunes contra los antígenos extraños, y también puede debilitar la tolerancia inmunológica y provocar que los anticuerpos actúen contra los autoantígenos. En segundo lugar, en un proceso análogo a la exposición de fagos, las plataformas de la presente invención permiten la recuperación y la amplificación de secuencias seleccionadas por afinidad a partir de bibliotecas de secuencias aleatorias complejas. La presente invención combina así en una sola plataforma la capacidad para identificar epítopos relevantes mediante la limitación de la valencia y la selección por afinidad, y para presentar después estos epítopos como una vacuna al sistema inmunológico. Los epítopos se identifican y optimizan mediante selección por afinidad contra un anticuerpo objetivo y, posteriormente, sin cambiar de plataforma, se pueden presentar directamente como una vacuna al sistema inmunológico. Los péptidos se expresan a alta densidad sin alterar las limitaciones estructurales que están presentes durante su selección original, aumentando así las probabilidades de que se aíslen los miméticos moleculares más fieles del epítopo nativo, de que se mantengan sus estructuras óptimas durante el proceso de inmunización y de que se provoquen las respuestas de anticuerpos relevantes.

Vectores plásmidos para la construcción de bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias altamente complejas en VLPs de MS2.

[0104] Los primeros experimentos que utilizaban bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias de VLPs de MS2 se realizaron con simples derivados de pET3d, un plásmido resistente a la ampicilina con una unidad de transcripción T7. Sin embargo, este resultó ser en cierto modo un sistema menos que óptimo para la producción conveniente de bibliotecas de alta complejidad, y desde entonces los inventores han creado una serie de vectores que combinan diversas características opcionales que parecen ser importantes. Estas incluyen:

A. Un dímero monocatenario con los sitios de clonación convenientes para la inserción en el bucle AB. pDSP1 (figura 1) expresa la secuencia de codificación del dímero monocatenario, modificada para contener, por ejemplo, sitios de restricción de SalI y KpnI únicos en o cerca de las secuencias de codificación del bucle AB. Normalmente, se incluye un sitio de BamHI 'aguas abajo' de la secuencia de recubrimiento. Esta forma de dímero facilita la clonación simple de secuencias extrañas en el bucle AB. Para que estos sitios fueran únicos, fue necesario destruir diversos sitios de SalI y KpnI en el vector y en la secuencia de recubrimiento 'aguas arriba' y en las secuencias de plásmidos.

B. Resistencia a la kanamicina. pDSP1 confiere resistencia a la kanamicina. Esto facilita en gran medida la construcción de bibliotecas al permitir la selección de bacterias transformadas en un cultivo líquido frente a un fondo de células no transformadas inicialmente elevado. La resistencia a la ampicilina que confiere la primera generación de vectores plásmidos no era adecuada para este propósito, ya que la rápida degradación del antibiótico que realiza la E. coli transformada conlleva una pérdida en la selección tras un espacio de tiempo sorprendentemente corto en el cultivo. Esto habría permitido el crecimiento excesivo de las células no transformadas, las cuales, por supuesto, representan normalmente la gran mayoría de la población incluso cuando se utilizan métodos de transformación eficaces.

C. Un origen de replicación M13. Hasta ahora, los inventores han construido bibliotecas de secuencias aleatorias mediante un procedimiento en el que se utiliza un partidor de PCR para generar un fragmento que tiene la secuencia aleatoria unida a un extremo. El fragmento se digiere después con las endonucleasas de restricción adecuadas y se clona en pDSP1 en los sitios únicos previamente descritos (normalmente entre SalI y BamHI, ver figura 1). Usando estos métodos los inventores han creado bibliotecas que comprenden hasta 10^9 recombinantes individuales. Sin embargo, las bibliotecas de este tamaño no son convenientes para contruir utilizando estos métodos; la construcción de bibliotecas mucho más grandes se ve facilitada por métodos que producen de manera eficaz cosechas más grandes de ADN recombinante de las que se encuentran en una reacción de ligación normal. Más específicamente, los inventores hacen uso de una variación de un método de mutagénesis de sitio dirigido (2), que ya han usado otros para producir bibliotecas de fagos filamentosos con un intervalo de complejidad de 10^{11} (3). El método se basa en la extensión de un partidor desemparejado en una plantilla (o patrón) circular monocatenaria sustituida por dUTP. (La sustitución de dT con Du se consigue mediante el crecimiento de la plantilla de ADN en un huésped dut- o ung-

como CJ236 or BW313). Con el objetivo de crear bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias, el partidor contiene una secuencia de ADN aleatoria flanqueada en cada lado por secuencias complementarias a las secuencias de recubrimiento en cualquier lado del bucle AB. El partidor se extiende con ADN polimerasa, y, debido a la acción de la ADN ligasa, se produce un círculo bicatenario cerrado covalentemente. La transformación (por ejemplo, electroporación) de una cepa ung^{+} conlleva una fuerte selección para la propagación selectiva de la cadena mutante, y da como resultado una elevada cosecha de recombinantes que portan las secuencias insertadas. Estas reacciones de mutagénesis insercional pueden realizarse con cantidades relativamente grandes de ADN (por ejemplo, 20ug), suficientes para generar con facilidad unos 10^{11} recombinantes individuales o más mediante electroporación.

Para facilitar la producción de ADN monocatenario, se introdujo un origen de replicación M13 en el plásmido y se denominó pDSP61 y pDSP62 (figura 2), dependiendo de la orientación del origen M13. También se construyó un fago ayudante llamado M13CM1. Es un derivado de M13KO7 que reemplaza la resistencia a la kanamicina con cloranfenicol, haciendo posible seleccionar la presencia simultánea del ayudante M13cm1 y pDSP6, lo cual confiere resistencia a la kanamicina. La superinfección de una cepa de dut^{-}, ung^{-} (por ejemplo, CJ236) que contiene el plásmido mediante un fago ayudante de M13 conlleva una fácil producción de ADN monocatenario con sustitución de dUTP.

D. Un gen sintético de recubrimiento 'con codón variado'. El deseo de utilizar mutagénesis de extensión del partidor para construir bibliotecas introdujo una nueva complicación y requirió la introducción de una secuencia de recubrimiento con codón variado -'codon-juggled', en inglés- en el pDSP6. El método de expresión de péptidos se basa en la capacidad de introducir de manera específica péptidos extraños en sólo uno de los dos bucles AB del dímero monocatenario. En el esquema previamente descrito, el partidor mutagénico se alinearía normalmente con secuencias de las dos mitades del dímero monocatenario, lo que conlleva inserciones dobles. Pero las inserciones simultáneas en ambos bucles AB conllevan una alta frecuencia de fracasos en el pliegue de las proteínas. Por este motivo, se consiguió la síntesis de una versión con codón variado de una proteína de recubrimiento. Esta versión introduce el número máximo posible de sustituciones de nucleótidos silenciosos en la mitad 'aguas arriba' del dímero monocatenario, y, de este modo, produce un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de proteínas de recubrimiento de tipo natural. Sin embargo, la presencia de numerosas mutaciones hace que la secuencia con codón variado no sea capaz de alinearse eficazmente con el oligonucleótido mutagénico. De este modo, las inserciones se orientan a la mitad 'aguas abajo' del dímero monocatenario.

[0105] Las variantes de pDSP1 y de pDSP62, denominadas respectivamente pDSP1(am) y pDSP62(am) conservan todas las características de pDSP1 y de pDSP62, pero están modificadas mediante mutagénesis de sitio dirigido para convertir el codón de alanina (que especifica el primer aminoácido de la copia 'aguas abajo' de la proteína de recubrimiento en el dímero monocatenario) a UAG, un codón sin sentido o de parada específico conocido como codón ambar. La supresión de este codón de parada permite la síntesis de proteínas de recubrimiento de tipo silvestre y de proteínas de recubrimiento de dímero monocatenario a partir de un único ARNm. Esto conlleva la capacidad para controlar la valencia media de expresión de péptidos tal y como se explica con más detalle a continuación.

[0106] Normalmente, la ultralectura ('readthrough', en inglés) del codón sin sentido requiere la presencia de un ARNt supresor específico para el codón de parada particular que se suprime. Se han descrito los ARNt supresores activos para los tres codones de parada y resultan muy conocidos para los biólogos moleculares. El trabajo que aquí se describe utiliza un codón ámbar y, por lo tanto, requiere el uso de un ARNt supresor de ámbar, que en este caso se diseñó específicamente para insertar alanina. Sin embargo, debe entenderse que los ARNt supresores específicos para cada uno de los otros codones de parada (UAA y UGA) y que insertan diversos aminoácidos se pueden utilizar de manera similar.

[0107] Para producir un ARNt supresor en células bacterianas, se produjo un plásmido llamado pNMsupA (ver figura 3). Es un derivado de pACYC18 y contiene un origen de replicación derivado del grupo de incompatibilidad del plásmido p15A. También confiere resistencia al cloranfenicol. Esto significa que se puede mantener de manera estable en células bacterianas que ya contienen pDSP1(am) o pDSP62(am), que tienen orígenes de ColE1 y confieren resistencia a la kanamicina. El plásmido pNMsupA también contiene un promotor lac y regiones de múltiples enlaces de pUC18 en las que se insertó un gen sintético de ARNt supresor. La transcripción del gen de ARNt está bajo el control del promotor lac, lo cual significa que los inductores del operón lac (por ejemplo, IPTG) controlan la síntesis del ARNt supresor. Kleina et al. (4) describen la secuencia del gen de ARNt sintético, y esta se muestra a continuación. Está flanqueda por sitios de EcoRI y PstI que facilitaron su clonación en pNMsupA.

GAATTCGGGGCTATAGCTCAGCTGGGAGAGCGCTTGCATCTAAAGCAAGAGGTC

AGCGGTTCGATCCCGCTTAGCTCCACCACTGCAG

[0108] Alterar el nivel del ARNt supresor también se conoce como alterar el nivel de la supresión sin sentido

('nonsense suppression', en inglés). Así, alterando el nivel de síntesis del dímero monocatenario a partir de pDSP 1(am) o pDSP62(am) se creía que fuera posible controlar el número medio de péptidos expresados por cada VLP, permitiendo así el control de la valencia de expresión en un amplio intervalo. A pesar de que pNMsupA usa el promotor lac, debe quedar claro que se pueden usar diversos promotores para controlar la síntesis de ARNt supresor, y que algunos (por ejemplo, el promotor del operón de propionato (5)) están, de hecho, mejor capacitados para proporcionar respuestas graduales y bien controladas para las diferentes concentraciones de sus respectivos inductores.

III. Controlar la valencia de expresión.

[0109] Es deseable disponer de un medio para controlar el número de polipéptidos expresados en las VLP de MS2. La multivalencia de la expresión de VLPs de MS2 (90 copias del epítopo por cada partícula) debería hacer que fuera difícil distinguir las VLPs que expresan péptidos con una alta afinidad intrínseca con el anticuerpo de aquellas que tienen una afinidad intrínseca baja, pero que también se unen o enlazan firmemente debido a su capacidad para establecer múltiples interacciones débiles (es decir, avidez vs. afinidad). Esta es una complicación bien conocida de la expresión de fagos filamentosos, donde la selección de interacciones de alta afinidad requiere normalmente el uso de una valencia de expresión baja. La probabilidad de encontrar miméticos moleculares adecuados aumenta notablemente cuando se seleccionan los péptidos con mayor afinidad. Más abajo se ofrece una descripción de un método para reducir la valencia de expresión con el objetivo de mejorar la exactitud en la selección.

[0110] Control de la valencia. Se da por hecho que la selección de péptidos que tienen la afinidad más alta con un anticuerpo monoclonal dado dará como resultado los mejores miméticos moleculares del antígeno nativo, y que estos son los que mayores probabilidades tienen de provocar una respuesta relevante de anticuerpos. Idealmente, el enfoque utilizado pretende llevar a cabo la primera ronda de selección utilizando una expresión multivalente, de manera que se obtenga una población relativamente compleja que incluya todos los péptidos que tienen una mínima afinidad con el objetivo ('target', en inglés). Sería deseable entonces reducir la valencia de expresión en las rondas posteriores para aumentar la exactitud de la selección por afinidad.

[0111] En este enfoque, se proporciona un sistema que permite la producción de una gran cantidad de proteínas de tipo natural y de pequeñas cantidades de proteínas recombinantes del bucle AB a partir de un único ARN. Se construyó una variante de pDSP1 (pDSP1(am)) que contiene un codón de parada ámbar en lugar del codón de alanina que codifica normalmente el primer aminoácido de la copia 'aguas abajo' de la proteína de recubrimiento en el dímero monocatenario (ver figura 3). Por lo tanto, pDSP1(am) normalmente solo produce proteína de recubrimiento de tipo natural, que, por supuesto, se ensambla con normalidad en una VLP. Además, los inventores sintetizaron y clonaron un gen de ARNt supresor que inserta alanina. El ARNt supresor se expresa bajo el control del promotor lac en un plásmido resistente al cloranfenicol proveniente de un grupo de incompatibilidad diferente, y se produce en cantidades que provocan que un pequeño porcentaje de los ribosomas que traducen la secuencia de recubrimiento 'ultralean' el codón de parada ámbar y produzcan el dímero monocatenario. La proteína resultante (con su péptido huésped) se coensambla con proteína de tipo natural expresada a partir del mismo ARNm para formar cápsidas en mosaico. Se produjeron VLPs purificadas a partir de este vector y se estimó que expresarían alrededor de tres péptidos por VLP de media. La electroforesis en gel de SDS (ver figura 4) muestra el contenido del producto 'ultraleído' en VLPs purificadas. Estas se analizaron para confirmar el aumento de la exactitud en la selección por afinidad tal y como se había predicho. La electroforesis con gel de agarosa y la técnica de hibridación 'northern' ('northern blots') verifican que las partículas encapsidan el ARN relevante. Si es necesario, la valencia se puede reducir aún más disminuyendo el nivel de expresión del ARNt supresor. De hecho, es posible controlar la expresión del producto 'ultraleído' (y la valencia de expresión) en un amplio intervalo ajustando el nivel de la síntesis de ARNt. Esto se consigue expresando el ARNt a partir de un promotor (por ejemplo, proB) cuya actividad se puede modular con precisión como una función de la concentración de inductores.

Bibliotecas de fragmentos de antígenos

[0112] Una estrategia alternativa saca provecho de la existencia de un gen de antígenos clonado o un genoma patógeno para crear bibliotecas de fragmentos de antígenos aleatorias. Existen diversos métodos para crear estas bibliotecas. Uno conlleva la fragmentación aleatoria del gen de antígenos, por ejemplo, mediante el tratamiento con DNasel, para producir fragmentos de un tamaño medio adecuado (por ejemplo, 30 bp). Estas se ligan por un extremo romo a un sitio apropiado en el gen que codifica el polipéptido de recubrimiento (por ejemplo, en el bucle AB de un dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento). La biblioteca resultante se somete después a una selección por afinidad para recuperar las VLPs que expresan péptidos que un anticuerpo reconoce. En una realización particular, se puede insertar un sitio de restricción en el bucle AB o en el extremo N-terminal del polipéptido de recubrimiento.

Síntesis

[0113] Normalmente, las VLPs de fagos de ARN se producen a partir de plásmidos que viven en células de E. coli, que se someten a lisis para extraer de ellas las VLPs. En los experimentos que los inventores han desarrollado hasta ahora, y que se describen en otros apartados de la presente aplicación, las bibliotecas de péptidos de

secuencias aleatorias en VLPs de MS2 y PP7 se han producido exactamente de este modo. Sin embargo, la poblaciones de la presente invención pueden sintetizarse con un sistema combinado 'in vitro' de transcripción/traducción utilizando procedimientos conocidos en este campo (ver, por ejemplo, la Patente de EEUU No. 7,008,651; Krarner et al., 1999, 'Cell-free Coupled Transcription-translation Systems From E. coli, In Protein Expression. A Practical Approach', Higgins and Hames (eds.), Oxford University Press). En una realización particular, la ARN polimerasa de bacteriófago de T7 (o uno relacionado) se usa para dirigir la transcripción de alto nivel de genes clonados bajo el control de un promotor de T7 en sistemas optimizados para traducir de manera eficaz las largas cantidades de ARN así producidas (para más ejemplos, ver Kim et al., 1996, Eur J Biochem 239: 881-886; Jewett et al., 2004, Biotech and Bioeng 86: 19-26).

[0114] Cuando las VLPs se producen 'in vivo', la propia célula de E. coli proporciona la compartimentación que asegura que múltiples copias de un recombinante dado de péptidos de proteínas de recubrimiento se ensamblan específicamente con su ARNm. A menos que se provea una forma similar de compartimentación, es posible que durante la síntesis 'in vitro' a partir de una mezcla (esto es, biblioteca) de plantillas, particularmente en la población de la presente invención, diferentes polipéptidos de recubrimiento individuales, diferenciados por su fusión con péptidos diferentes, presumiblemente puedan empaquetar sus ARNm mutuamente, destruyendo así el vínculo genotipo/fenotipo que es necesario para una expresión de fagos efectiva. Además, puesto que cada VLP se ensambla a partir de múltiples subunidades, puede darse la formación de VLPs híbridas. De este modo, en una realización preferida, al preparar la poblaciones o bibliotecas de la presente invención, se realizan uno o más ciclos de de las reacciones transcripción/traducción en emulsiones de agua/aceite (Tawfik et al., 1998, Nat Biotechnol 16: 652-6). En este método ahora bien asentado, las plantillas individuales se separan en los compartimentos acuosos de una emulsión de agua/aceite. En condiciones adecuadas, se pueden formar enormes cantidades de microgotitas acuosas, de manera que cada una contiene de media una única molecula de una plantilla de ADN y el mecanismo de transcripción/traducción. Puesto que están rodeados de aceite, estos compartimentos no se comunican unos con otros. Los polipéptidos de recubrimiento sintetizados en estas gotitas deberían asociarse específicamente con los mismos ARNm que los codificaron, y deberían ensamblarse en VLPs que expresan solo un péptido. Después de la síntesis, la emulsión puede detenerse y las VLPs se pueden recuperar y someter a selección. En una realización particular, todas las reacciones de transcripción/traducción se desarrollan en la emulsión de agua/aceite. En una realización particular, solo se aíslan las gotitas que contienen solo una plantilla por gotita (VLPs que expresan solo un péptido). En otra realización, las gotitas que contienen VLPs mixtas (numerosas plantillas por gotita) se aíslan en uno o más ciclos de reacciones de transcripción/traducción y, posteriormente, se aíslan las VLPs que expresan solo un péptido (una plantilla por cada gotita).

Usos de las VLPs y de las poblaciones de VLPs

[0115] Existen diversos usos posibles para las VLPs y las poblaciones de VLPs de la presente invención. Tal y como se describirá con más detalle a continuación, las VLPs pueden usarse como compuestos o composiciones inmunogénicas, particularmente vacunas, como dispositivos para la liberación de fármacos, como marcadores o agentes de imagen ('imaging agents', en inglés) biomédicos o como nanodispositivos de autoensamblaje. Las poblaciones de VLPs de la presente invención pueden usarse para seleccionar los candidatos a vacuna adecuados.

Selección de posibles vacunas

[0116] Las poblaciones o bibliotecas de VLPs de la presente invención pueden usarse para seleccionar posibles vacunas (también llamadas candidatos a vacuna). Las bibliotecas pueden ser bibliotecas aleatorias o antigénicas. Las bibliotecas de secuencias de péptidos aleatorias o, alternativamente, de secuencias de péptidos derivados de antígenos se expresan en la superficie de las VLPs, y, después, epítopos de objetivos específicos, o tal vez mimótopos, se aíslan mediante selección por afinidad usando anticuerpos. Puesto que las VLPs encapsidan sus propios ARNm, las secuencias que las codifican (y sus péptidos huésped) pueden recuperarse mediante transcripción inversa y PCR. Posteriormente, las VLPs individuales seleccionadas por afinidad se clonan, sobreexpresan y purifican.

[0117] Las técnicas de selección por afinidad en la expresión de fagos están bien desarrolladas y se pueden aplicar directamente al sistema de expresión de VLPs de la presente invención. En pocas palabras, se permite que un anticuerpo (o un antisuero o suero inmunológico) forme complejos con los péptidos en las VLPs en una biblioteca de secuencia aleatoria o de expresión de fragmentos de antígenos. Normalmente, los anticuerpos se han marcado con biotina para que los complejos puedan ser capturados mediante la unión a una superficie recubierta con estreptavidina, perlas o microesferas magnéticas u otro medio adecuado de inmovilización. Tras un lavado, se eluyen las VLPs unidas, y se extraen los ARN de la población seleccionada por afinidad y se someten a transcripción inversa y PCR para recuperar las secuencias de codificación, que después se reclonan y se someten a más rondas de expresión y selección por afinidad hasta que se obtienen las variantes con mejor capacidad de unión. Se pueden imaginar fácilmente diversas estrategias para recuperar el ARN de las VLPs. Una posibilidad atractiva consiste, simplemente, en capturar complejos de biotina-mAb-VLP en tubos recubiertos con estreptavidina, desnaturalizar después las VLPs térmicamente y someter sus contenidos de ARN directamente a transcripción inversa y PCR. Existen muchas alternativas evidentes y puede que sea necesario realizar ajustes dependiendo de consideraciones como la capacidad de unión de los diversos medios de inmovilización. Una vez que las secuencias

seleccionadas se recuperan mediante transcripción inversa y PCR, resulta sencillo clonarlas y volverlas a introducir en E. coli, siendo cuidadosos en cada etapa para preservar la diversidad necesaria en las bibliotecas, la cual, por supuesto, disminuye con cada ronda de selección. Cuando la selección se ha completado, cada clon puede sobreexpresarse para producir una VLP candidata a vacuna.

[0118] Para establecer la eficacia de la selección por afinidad en las plataformas de VLPs de MS2, se realizaron selecciones con los métodos previamente descritos utilizando un anticuerpo objetivo monoclonal cuyo epítopo está bien descrito. El anticuerpo monoclonal anti-Flag de M2 y una biblioteca construida con pDSP1 para contener diez tripletes de NNS se insertaron entre los codones para los aminoácidos 13 y 16 (esto es, el modo de inserción 13/16). Esta biblioteca en particular contenía alrededor de 10^8 clones independientes y expresaba péptidos extraños a una valencia alta. Desde entonces se han construido bibliotecas más complejas utilizando pDSP62 (ver más arriba), pero se juzgó que la biblioteca de pDSP1 era lo suficientemente compleja como para ofrecer una probabilidad razonable de encontrar el epítopo Flag. La primera ronda de selección se realizó con 250 ng del anticuerpo inmovilizado mediante adsorción a pocitos de plástico, con un exceso estimado de diez veces más de VLPs que moléculas de anticuerpos. Después de un lavado meticuloso, las VLPs unidas se eluyeron y se sometieron a transcripción inversa y PCR. Los productos de la PCR se digirieron con SalI y BamHI y se clonaron en pDSP62 para producir VLPs para usarlas en la segunda ronda. En este ronda y en las posteriores, la clonación de los selectantes dio un rendimiento de al menos 5 x 10^6 clones independientes. La segunda selección se realizó en las mismas condiciones que la primera ronda. Los productos de la segunda y tercera rondas se clonaron en pDSP62(am) y las VLPs se produjeron en presencia del supresor ámbar (pNMsupA) previamente descrito, lo que significa que en las rondas tercera y cuarta los péptidos se expresaron a una valencia baja. En la cuarta ronda, la cantidad de anticuerpo se redujo a 50 ng, de manera que había 50 veces más de VLPs que de anticuerpos. Después de la cuarta ronda, los productos se clonaron en pDSP62 para obtener una expresión de valencia alta, esperando la sobreproducción y la purificación de las VLPs. Las secuencias de unos pocos selectantes de cada ronda se muestran en la figura 22. Las secuencias obtenidas en rondas tempranas muestran limitadas similitudes con el conocido epítopo Flag, DYKDDDDKL, pero algunos elementos clave ya resultan evidentes, incluyendo, especialmente, el dipéptido YK. Para la tercera ronda, todas las secuencias muestran el elemento DYK junto con al menos un D 'aguas abajo'. Para la cuarta ronda, solo se obtuvo una secuencia de los 7 clones que se sometieron a un análisis de secuencia. Su similitud con la secuencia del epítopo Flag de tipo natural resulta evidente. El epítopo Flag se mapeó previamente usando métodos convencionales de expresión de fagos filamentosos, y se dio cuenta de los resultados en el NEB Trancript, Verano de 1996. (El NEB Transcript es una publicación de New England Biolabs (disponible en su página web: www.neb.com), un proveedor comercial de bibliotecas de expresión de fagos y kits de selección por afinidad). La secuencia de la figura 22, de hecho, se ajusta mejor al epítopo real que la obtenida en los experimentos de NEB, lo cual demuestra que el sistema de expresión de VLPs de MS2 es al menos tan efectivo como la expresión de fagos filamentosos para identificar epítopos mediante selección por afinidad.

Composiciones inmunogénicas

[0119] Tal y como se ha indicado previamente, las VLPs identificadas mediante procedimientos de detección pueden usarse para preparar composiciones inmunogénicas, especialmente vacunas. Las vacunas deben tener una forma que sea apta para administrarse a un animal. Normalmente, la vacuna comprende un medio con una solución salina convencional o una solución tamponada acuosa en el que la composición se suspende o disuelve. En esta forma, la composición puede usarse convenientemente para prevenir, mejorar o tratar de cualquier otro modo una enfermedad o desorden. Si se introduce en un huésped, la vacuna puede provocar una respuesta inmune que incluye -pero no se limita a- la producción de anticuerpos y/o citocinas y/o la activación de células T citotóxicas, células que presentan antígenos, células T ayudantes, células dendríticas y/u otras respuestas celulares.

[0120] Opcionalmente, la vacuna incluye de manera adicional un adyuvante que puede estar presente en una mayor o menor proporción con respecto al compuesto de la presente invención. Tal y como se utiliza en el presente texto, el término 'adyuvante' hace referencia a los estimuladores de la respuesta inmunitaria no específicos o a las sustancias que permiten la generación de un depósito ('depot', en inglés) en el huésped, que, al combinarse con la vacuna, proporciona una respuesta inmune incluso más acentuada. Se pueden usar diversos adyuvantes. Los ejemplos incluyen un adyuvante de Freund completo o incompleto, hidróxido de aluminio y muramil dipéptido modificado.

[0121] Opcionalmente, la vacuna incluye de manera adicional un adyuvante que puede estar presente en una proporción mayor o menor con respecto al compuesto de la presente invención.

Administración dirigida de fármacos

[0122] La selección por afinidad puede utilizarse para identificar péptidos que se unen a receptores celulares específicos, produciendo así partículas que pueden unirse a una célula diana y penetrar en ella (por ejemplo, por endocitosis). La VLP de MS2 es una esfera hueca con un diámetro interior del orden de 20 nm. En una realización particular, la VLP comprende el fármaco, por ejemplo, una toxina proteica, que se ha de administrar y, opcionalmente, un ligando que se une a receptores de tipo celular específicos. La composición interna de esta partícula puede controlarse cargándola específicamente con una toxina proteica como la ricina, por ejemplo, o

juntándola con un mimético operador de traducción sintético. Confiriendo la capacidad de unir receptores de tipo celular específicos a la superficie exterior de estas partículas, es posible realizar la administración dirigida de la toxina (u otro fármaco) a los tipos de célula seleccionados. En un aspecto relacionado, la VLP que comprende el dímero de polipéptidos de recubrimiento puede encapsidar realmente una sustancia heteróloga como una toxina bacteriana, un adyuvante o un ácido nucleico inmunoestimulante.

Marcadores de imagen biomédicos

[0123] Del mismo modo que los fármacos pueden dirigirse a tipos de células específicos, los agentes de contraste para la imagen por resonancia magnética también se podrían dirigir a células o tejidos específicos, aumentando enormemente de manera potencial el poder de diagnóstico de una imagen por resonancia magnética (IRM). De hecho, las partículas de MS2 ya se han marcado con gadolinio para aumentar enormemente el contraste de IRM (Anderson et al., 2006, Nano Letters 6(6),1160-1164). De este modo, en una realización particular, estas partículas podrían dirigirse a sitios específicos expresando en su superficie los péptidos adecuados para receptores específicos. En un aspecto relacionado, la VLP que comprende el dímero de polipéptidos de recubrimiento puede encapsidar realmente el agente o marcador de imagen ('imaging agent', en inglés).

Nanodispositivos de autoensamblaje

[0124] Las VLPs de la presente invención pueden comprender péptidos con afinidad con una partícula de un extremo terminal o una partícula de fagos filamentosos que expresa proteínas de unión con metales. Una VLP con afinidad con una partícula de un extremo terminal o una partícula de fagos filamentosos ofrecería la posibilidad de conectar estas esferas (y lo que contengan) a los extremos de los nanohílos (o nanocables) de fagos filamentosos. Alternativamente, las VLPs pueden expresar péptidos de unión con metales (por ejemplo, oro y zinc) de manera que se obtengan formaciones o matrices con propiedades ópticas y eléctricas inusuales. Alternativamente, las VLPs con una capacidad mejorada para autoensamblarse en estas formaciones pueden producirse expresando péptidos con afinidad con una superficie particular, o que alteran las propiedades de autoasociación de las propias VLPs.

Resumen del experimento

[0125] Se describen dos vectores plásmidos que facilitan la construcción de bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias en partículas tipo virus (VLPs) de bacteriófagos de MS2. La primera, pDSP1, se construyó para la conveniente clonación de fragmentos generados por PCR -u otros ADN bicatenarios- en el bucle AB de la copia 'aguas abajo' de un dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento. La segunda se llama pDSP62 y se construyó específicamente para la introducción de secuencias peptídicas en casi cualquier posición del dímero monocatenario (normalmente, el bucle AB) mediante el método de mutagénesis de sitio dirigido de Kunkel *et al*. [16]. Las características generales de los plásmidos se ofrecen a continuación.

Ejemplo 1

pDSP1 – un plásmido que expresa un dímero monocatenario con los convenientes sitios de clonación para insertar en el bucle AB.

[0126] El plásmido pDSP1 (ver figuras 5a y 7a) contiene las señales de transcripción del T7 de pET3d y la resistencia a la kanamicina y el origen de replicación de pET9d. (La información relacionada con pET3d y pET9d puede encontrarse en la base de datos vectoriales de New England Biolabs, https://www.lablife.org/ct?=v&a=listvecinfo). Expresa la secuencia de codificación del dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento de MS2 (6), modificado para contener sitios de restricción únicos de SalI y KpnI. Esto facilita la clonación simple de secuencias extrañas en el bucle AB. Para hacer que estos sitios sean únicos, fue necesario destruir otros sitios de SalI y KpnI en el vector y en la secuencia de recubrimiento 'aguas arriba'.

[0127] A continuación se muestra la secuencia de recubrimiento de MS2 en las cercanías del sitio de inserción del bucle AB para pDSP1. Nótese la presencia de sitios de SalI y KpnI.

```
... 6   7   8   9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22...

...GlnPheValLeuValAspAsnGlyGlyThrGlyAspValThrValAlaPro...

...CAGTTCGTTCTCGTCGACAATGGCGGTACCGGCGACGTGACTGTCGCCCA...

                  SalI        KpnI
```

[0128] A continuación se muestra un ejemplo de una biblioteca aleatoria de 7-mer en pDSP1, con la secuencia aleatoria insertada con el -así llamado- modo 13/16.

```
... 6  7  8  9 10 11 12 13                          16 17 18 19 20 21 22...
...GlnPheValLeuValAspAsnGly x  x  x  x  x  x  x GlyAspValThrValAlaPro...
...CAGTTCGTTCTCGTCGACAATGGCNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSGGCGACGTGACTGTCGCCCCA...
                  SalI
```

[0129] La presencia de sitios de restricción únicos en o cerca de las secuencias que codifican el bucle AB hace posible insertar simplemente las secuencias extrañas cuando están flanquedas por sitios cuya segmentación ('cleavage', en inglés) genera 'extremos cohesivos' compatibles. Sin embargo, a veces es más conveniente unir la secuencia extraña usando una combinación de PCR y métodos de ADN recombinantes, tal y como se muestra en la figura 5b. Por ejemplo, el partidor de PCR 5' que se muestra a continuación podría usarse con un partidor de 3', que se alinea con secuencias de vectores plásmidos 'aguas abajo' de un sitio BamHI, para generar un fragmento de la secuencia de codificación de proteína de recubrimiento con la secuencia aleatoria insertada entre los aminoácidos 13 y 16. N = A, C, G, o T; y S = G o C. Después de la digestión con SalI y BamHI, el fragmento se insertaría entre SalI y BamHI de pDSP1. A continuación se muestra un ejemplo de partidor de 5' que podría usarse para generar una biblioteca así:

5'-CGC**GTCGAC**AATGGC(NNS)7GGCGACGTGACTGTCGCCCCA-3'

[0130] Con pDSP1, las bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias normalmente se construyen clonando en el bucle AB un fragmento de PCR que se ha generado usando como plantilla (por ejemplo, pMCT) una secuencia de proteínas de recubrimiento monomérica. Un partidor 5' de oligonucleótidos sintéticos está diseñado para unir un sitio SalI (o KpnI) y una secuencia de codones aleatorios (por ejemplo, 6-10 copias de NNY) a un sitio situado justo 'aguas arriba' del bucle AB. Un partidor 3' se alinea con las secuencias en el vector plásmido que está justo 'aguas abajo' de BamHI. El producto de PCR resultante se digiere con SalI (o KpnI) y BamHI y se clona en los sitios correspondientes de pDSP1. Esto da como resultado la inserción de péptidos en el bucle AB, y el sitio exacto de inserción depende del diseño específico del partidor 5'. Para la mayoría de las inserciones se prefiere el uso del sitio SalI porque permite mayor flexibilidad que KpnI en la selección del sitio de inserción. Con estos métodos es relativamente sencillo producir bibliotecas de VLPs de péptidos con 10^8 – 10^9 miembros individuales.

[0131] Para introducir un medio para controlar la valencia de expresión de péptidos, se construyó un derivado de pDSP1 (llamado pDSP1(am)) introduciendo un codón sin sentido en la unión entre las mitades del dímero monocatenario. Cuando se expresa en presencia de un ARNt supresor sin sentido, como el producido por pNMsupA, se produce una pequeña cantidad del dímero monocatenario (junto con su péptido extraño). Sin embargo, la mayor parte de la proteína de recubrimiento que se produce a partir de pDSP1(am) se sintetiza en forma de proteína de tipo natural, de una unidad de longitud. Ambas formas de la proteína de recubrimiento se coensamblan en una partícula híbrida que solo expresa, de media, alrededor de 3 péptidos. El nivel medio de la valencia de expresión puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo alterando el nivel de expresión del ARNt supresor, o empleando supresores que exhiben una eficiciencia de supresión mayor o menor.

Ejemplo 2

pDSP62 – un plásmido apto para la construcción de bibliotecas utilizando métodos eficientes de mutagénesis de sitio dirigido.

Introducción de un origen de replicación M13.

[0132] Los métodos para la producción de bibliotecas como los descritos previamente para pDSP1 son difíciles de ampliar porque no resulta conveniente depurar los fragmentos de restricción de ADN en las cantidades necesarias. Además, durante las reacciones de ligación, una parte del ADN se convierte inevitablemente en productos secundarios inútiles, reduciendo la producción del plásmido deseado. La construcción de bibliotecas complejas se facilitaría con métodos que producen eficientemente mayores cosechas del ADN recombinante correcto que las que se encuentran en una reacción de ligación normal. Más específicamente, se prefiere usar una variante de un viejo método de mutagénesis de sitio dirigido, que ya fue utilizada por otros para producir bibliotecas de péptidos en fagos filamentosos con un intervalo de complejidad de 10^{11} (2, 6). El método se aplica a los ADN circulares monocatenarios producidos a partir de un tipo particular de plásmido (también conocido como fagémido o fagómido) que contiene un origen de replicación M13. La infección de una cepa duf-, ung- (por ejemplo, BW313) -que contiene el plásmido- con un fago ayudante M13 da como resultado una producción sencilla de ADN monocatenario sustituido con dUTP. En la reacción de mutagénesis propiamente dicha, un partidor de oligonucleótidos desemparejado se alinea con la plantilla de ADN monocatenario y se alarga utilizando ADN polimerasa (por ejemplo, la del fago T7). El ADN se liga para producir ADN circular cerrado, y se introduce mediante transformación en la cepa ung+, donde,

preferentemente, se replica la cadena mutante. La experiencia previa en la producción de bibliotecas de VLPs de péptidos indica que, normalmente, alrededor del 90% de los transformantes contienen las inserciones de péptidos deseadas. La reacción de mutagénesis de la extensión del partidor puede realizarse con cantidades relativamente grandes de ADN (por ejemplo, 20 ug), suficientes para producir con facilidad del orden de 10^{11} recombinantes individuales mediante electroporación.

[0133] Para facilitar la producción de ADN monocatenario, se introdujo un origen de replicación de M13 en pDSP1. Para ello, se amplificó mediante PCR el origen de M13 encontrado en pUC119, y se clonó en un sitio único de AlwNI en pDSP1. Este plásmido, llamado pDSP1-IG, es el progenitor de pDSP62. Puesto que es un intermediario en la construcción de pDSP62 I, su secuencia no se muestra.

Dirigir inserciones solamente a una mitad del dímero monocatenario mediante el uso de un gen sintético de recubrimiento con codón variado.

[0134] El deseo de utilizar mutagénesis para la extensión del partidor para construir una biblioteca de péptidos efectiva provocó una nueva complicación. El presente método de expresión se basa en la capacidad de introducir específicamente péptidos extraños en uno solo de los dos bucles AB del dímero monocatenario. Utilizando la secuencia del dímero monocatenario presente en pDSP1, el partidor mutagénico se alinearía o aparearía con secuencias en ambas mitades, lo que daría dobles inserciones como resultado, pero ya se sabe que las inserciones en ambos bucles AB dan como resultado una alta frecuencia de fallos en el pliegue o proceso de plegado de las proteínas. Además, aunque se toleraran las inserciones, una mutagénesis de sitio dirigido que fallara a la hora de dirigir solo una mitad del dímero monocatenario provocaría la expresión de dos péptidos diferentes en cada VLP.

[0135] Por estos motivos, se sintetizó una versión de la proteína de recubrimiento con el codón variado o cambiado de orden ('codon-juggled', en inglés) y se cambió por la mitad 'aguas arriba' normal del dímero monocatenario. La secuencia con el codón variado contiene el número máximo posible de sustituciones de nucleótidos silenciosas, y, de este modo, produce un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de proteínas de recubrimiento de tipo natural. Sin embargo, la presencia de numerosas mutaciones hace que la secuencia variada ('juggled sequence', en inglés) sea incapaz de alinearse eficazmente con el oligonucleótido mutagénico y, por tanto, el partidor mutagénico se dirige específicamente a la secuencia 'aguas abajo' del bucle AB. El plásmido pDSP62 se muestra en la figura 6 y su secuencia se proporciona en la figura 7b.

Un fago auxiliar M13 resistente al cloranfenicol para la producción de pDSP62 monocatenario.

[0136] El plásmido pDSP62 confiere resistencia a la kanamicina. Los fagos ayudantes o auxiliares (por ejemplo, M13KO7) que se usan normalmente para producir ADN de fagémidos monocatenario también confieren resistencia a la kanamicina y, por lo tanto, no son aptos para usarse con los plásmidos aquí descritos. Por esta razón, se construyó M13CM1, un derivado de M13KO7 resistente al cloranfenicol. El gen de resistencia al cloranfenicol de pACYC184 (7) se amplificó mediante PCR usando partidores que unían secuencias de reconocimiento para XhoI y SacI, y el fragmento se insertó en M13KO7 en lugar de su gen de resistencia a la kanamicina, aprovechando los sitios de XhoI y SacI que flanquean de manera aproximada el determinante de resistencia a la kanamicina. En presencia de kanamicina (para el mantenimiento de pDSP62) y cloranfenicol (para el fago auxiliar), las células producen grandes cantidades de ADN de plásmidos monocatenario después de la infección con M13 CM1. Utilizando estas plantillas monocatenarias y el método de Kunkel et al. (2), se han producido fácilmente bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias que contienen más de 10^{10} miembros individuales para $[NNS]_6$, $[NNS]_7$, $[NNS]_8$ y $[NNS]_{10}$. Se puede obtener una complejidad significativamente más alta con una ampliación.

[0137] Para introducir un medio para controlar la valencia de expresión de péptidos, se construyó un derivado de pDSP62 (llamado pDSP62(am)) introduciendo un codón sin sentido en la unión entre las mitades del dímero monocatenario. Cuando se expresa en presencia de un ARNt supresor sin sentido, como el producido por pNMsupA, se produce una pequeña cantidad del dímero monocatenario (junto con su péptido extraño). Sin embargo, la mayor parte de la proteína de recubrimiento que se produce a partir de pDSP1(am) se sintetiza en forma de proteína de tipo natural, de una unidad de longitud. Ambas formas de la proteína de recubrimiento se coensamblan en una partícula híbrida que solo expresa, de media, alrededor de 3 péptidos. El nivel medio de la valencia de expresión puede ajustarse hacia arriba o hacia abajo alterando el nivel de expresión del ARNt supresor, o empleando supresores que exhiben una eficiciencia de supresión mayor o menor.

[0138] Tal y como se ha explicado previamente, las partículas tipo virus de bacteriófagos MS2 se usaron para la expresión peptídica, y de determinó que los dímeros monocatenarios de proteínas de recubrimiento de MS2 tienen una alta tolerancia a las inserciones de péptidos y producen VLPs correctamente ensambladas que encapsidan específicamente el ARNm que codifica su síntesis [2]. Pero MS2 sólo es un miembro de una gran familia de virus cuyos miembros individuales comparten una biología molecular similar. Los plásmidos y los metodos previamente descritos representan mejoras para el sistema de expresión de VLPs de MS2 previamente descrito, en el que los inventores habían demostrado la tolerancia a la inserción que tiene el dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento de MS2 y la capacidad de las VLPs de MS2 para encapsidar el ARNm que dirige su síntesis [2]. Los ejemplos siguientes documentan unos resultados similares obtenidos recientemente con VLPs de PP7 [1],

mostrando específicamente que el pliegue y el ensamblaje del dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento de PP7 también muestra una alta tolerancia a la inserción de péptidos extraños y que las VLPs así obtenidas contienen, en forma de ARNm, la información genética para su síntesis.

[0139] Por tanto, se describe aquí la ingeniería de las VLPs de PP7 -un fago bacteriófago de 'Pseudomonas aeruginosa'- para la expresión de péptidos.

[0140] Las VLPs de PP7 ofrecen varias ventajas potenciales y mejoras frente a las VLPs de MS2. En primer lugar, las partículas son mucho más estables termodinámicamente debido a la presencia de vínculos estabilizantes de intersubunidades de sulfuro (8). Para muchas aplicaciones prácticas, incluyendo las vacunas, un aumento de la estabilidad es una característica deseable. En segundo lugar, las VLPs de PP7 no tienen una reactividad cruzada inmunológica con las de MS2 (9). Esto podría ser importante en las vacunas o en las aplicaciones de liberación dirigida de fármacos en las que puede ser necesaria la administración en serie de VLPs. En tercer lugar, se prevé que el pliegue y ensamblaje correctos de la VLP de PP7 puede ser más resistente frente a los efectos desestabilizadores de la inserción de péptidos, o que al menos puede mostrar tolerancia a algunos péptidos no tolerados en las VLPs de MS2.

Ejemplo 3

Diseño de un vector de expresión de péptidos de PP7.

[0141] Se construyeron dos tipos generales de plásmidos para la síntesis de proteína de recubrimiento de PP7 en E. coli (ver figuras 9 a 13). El primero expresa proteína de recubrimiento a partir del promotor lac y se usa (en combinación con pRZP7, ver más abajo) para analizar la tolerancia de las proteínas de recubrimiento a las inserciones de péptidos usando receptores de traducción y ensayos de ensamblajes de VLPs. El segundo tipo de plásmidos expresa la proteína a partir del promotor T7 y el terminador transcripcional. Estos plásmidos producen grandes cantidades de proteína de recubrimiento que se ensambla correctamente en una VLP. También producen ARNm específico para el recubrimiento con extremos terminales 5' y 3' discretos para su encapsidación en VLPs.

Diseño del sitio de inserción de péptidos.

[0142] La estructura tridimensional de la cápsida de PP7 muestra que está compuesta de una proteína de recubrimiento cuya estructura terciaria imita estrechamente la de MS2, a pesar de que las secuencias de aminoácidos de las dos proteínas solo muestran alrededor de un 12% de igualdad en su secuencia (10) [17]. La proteína de PP7 posee un bucle AB en el que se pueden insertar péptidos siguiendo una estrategia similar a la que se ha descrito previamente para MS2 [2]. Como en el caso de MS2, esto empezó mutando la secuencia de recubrimiento de PP7 para contener un sitio para la endonucleasa de restricción KpnI, facilitando así la inserción de secuencias extrañas en el plásmido denominado pP7K (figura 9a). Esta modificación provocó la sustitución de aminoácidos (E11T) que se muestra en la figura 10. Dicha sustitución se toleró bien, ya que la proteína de recubrimiento mutante reprime la traducción y se ensambla correctamente en una VLP. Siguiendo de nuevo el ejemplo de MS2, se asumió que el pliegue de una versión de un dímero monocatenario realizada de una proteína de recubrimiento de PP7 sería más resistente a las inserciones en el bucle AB que el dímero convencional. Su construcción se había descrito previamente (8), pero se describe aquí por primera vez en relación con su uso para la expresión peptídica. El dímero monocatenario se modificó para contener un sitio de KpnI solamente en la copia 'aguas abajo' de la secuencia de codificación, produciendo p2P7K32 (figura 9b). En este diseño, se insertaron péptidos en el aminoácido 11, pero debe entenderse que podrían utilizarse otros sitios de inserción específicos, posiblemente en cualquier lugar del bucle AB. De hecho, a continuación se describen pruebas de dos modos de inserción alternativos (figuras 10 y 11). El primero se llama el modo 11/11 porque el 11º aminoácido aparece dos veces – como thr en el lado del extremo N-terminal del péptido insertado, y como el glu11 de tipo natural en el lado del extremo C-terminal. En el -así llamado- método 11/12, la inserción está flanqueada por thr11 en un lado y ala12 en el otro.

[0143] Para analizar la tolerancia general de la proteína de recubrimiento de PP7 a las inserciones en el bucle AB, se crearon bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias insertados en el bucle AB de las proteínas de recubrimiento de PP7 utilizando la estrategia que se muestra en la figura 11. Las secuencias aleatorias consistían en 6, 8 ó 10 copias de la secuencia NNY (en la que N es cualquier nucleótido, e Y es pirimidina). Estas bibliotecas contienen 15 de los 20 aminoácidos posibles y, por lo tanto, son capaces de propiciar una considerable diversidad. Sin embargo, si se elimina la posibilidad de que haya codones de parada, se facilita en gran medida el análisis posterior.

Ejemplo 4

Métodos para analizar los miembros individuales de las bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias para conservar la función de la proteína de recubrimiento.

[0144] Al igual que la proteína de recubrimiento de MS2, el recubrimiento de PP7 es un represor de la traducción.

La construcción de pRZP7, un plásmido que fusiona el operador de traducción de PP7 con el gen lacZ de E. coli, se había descrito previamente, poniendo la síntesis de la β-galactosidasa bajo el control de la actividad del represor de traducción de la proteína de recubrimiento (11). Puesto que confiere resistencia un antibiótico diferente (cloranfenicol), y puesto que proviene de un grupo de incompatibilidad diferente (esto es, utiliza el origen de replicación de p15A), puede mantenerse fácilmente en la misma cepa de E. coli bien como pP7K o p2P7K32, ya que ambos confieren resistencia a la ampicilina y usan un origen de colE1. Estos dos plásmidos se derivan de pUC119 y expresan proteína de recubrimiento a niveles relativamente bajos a partir del promotor lac. La expresión de la proteína de recubrimiento de PP7 a partir de pP7K o p2P7K32 reprime la traducción de la β-galactosidasa expresada a partir de pRZP7. Esto hace que sea sencillo determinar si una inserción peptídica dada ha interferido con la capacidad que tiene la proteína de recubrimiento para plegarse correctamente, ya que las proteínas de recubrimiento defectuosas producen colonias azules en láminas que contienen el sustrato cromogénico de β-galactosidasa conocido como 'xgal', mientras que una proteína de recubrimiento que funciona correctamente produce colonias blancas.

[0145] Un test de mantenimiento de las funciones más riguroso consiste en examinar directamente la presencia de VLPs en lisados celulares que expresan un recombinante de proteínas de péptidos de recubrimiento. Esto se consigue realizando una electroforesis con gel de agarosa a células lisadas por sonicación. La tinción con bromuro de etidio detecta la VLP que contiene ARN, cuya presencia se confirma después mediante un análisis con electrotransferencia ('western blot', en inglés) utilizando un suero anti PP7.

[0146] La idea es analizar la tolerancia de la proteína de recubrimiento de PP7 a la inserción de péptidos y el ensamblaje mediante la creación de bibliotecas de péptidos de secuencias aleatorias y el medio de determinar la proporción de clones que conservan la función del represor de la traducción (esto es, producen colonias blancas) y producen una VLP. Nótese que estos inventores informaron previamente de una prueba similar para analizar la tolerancia que tiene el dímero monocatenario de proteínas de recubrimiento de MS2 a la inserción de péptidos [2].

Ejemplo 5

El pliegue y ensamblaje de las proteínas de recubrimiento de PP7 toleran la mayoría de inserciones aleatorias de péptidos 6-mer, 8-mer y 10-mer.

[0147] Las bibliotecas de $(NNY)_8$ se construyeron en pP7K y p2P7K32 y se introdujeron mediante transformación en las cepas de E. coli CSH41F-/pRZP7. Los transformantes se plaquearon en un medio sólido que contenía xgal. La gran mayoría eran recombinantes auténticos, ya que las ligaciones de control sin fragmentos de inserción dieron 1000 veces menos de colonias. Solo se analizó un pequeño número de los recombinantes de pP7K, pero se descubrió que todos eran defectuosos para el pliegue de proteínas y no podían hacer VLPs. Esto confirma lo esperado a raíz de experimentos previos con MS2 [2], que el dímero convencional se desestabiliza normalmente por las inserciones de péptidos en el bucle AB. Sin embargo, en el dímero monocatenario de p2P7K32 cerca del 100% de las colonias fueron blancas. 24 colonias blancas de cada una de las bibliotecas se transfirieron a cultivos duplicados de 1 ml. A partir de uno de los conjuntos de cultivos se prepararon lisados crudos de células para analizar las VLPs con gel de agarosa. A partir del otro conjunto, se aislaron plásmidos y se sometieron a una digestión con enzimas de restricción y una electroforesis con gel, confirmando que todas contenían una inserción con la longitud esperada. También se aislaron plásmidos de las pocas colonias azules.

[0148] Resultó que todos contenían plásmidos resultantes de ligaciones anormales, y generalmente no contenían una secuencia de recubrimiento intacta. Prácticamente el 100% de las inserciones de péptidos eran compatibles con la función de represor de traducción de la proteína de recubrimiento. Es decir, producen la suficiente cantidad de proteína correctamente plegada como para reprimir la traducción como la proteína de tipo natural. Se obtuvo este resultado con todas las bibliotecas de NNY -6-mer, 8-mer y 10-mer-, independientemente de si habían sido clonadas con el modo 11/11 u 11/12.

[0149] Para analizar directamente la presencia de VLPs, se prepararon lisados crudos de células a partir de cada uno de los cultivos duplicados y se sometieron a electroforesis con gel de agarosa. El gel se tiñó con bromuro de etidio, y con un duplicado se usó nitrocelulosa y se sondeó con suero de ratón anti-PP7 y con un anticuerpo secundario marcado con peroxidasa de rábano. Se consideró que un clon es positivo para la síntesis de VLPs cuando contiene una banda tanto en el gel teñido como en la electrotransferencia. Los resultados se muestran en la figura 13, y demuestran que casi todos los clones de 6-mer producen una VLP en algún nivel, a pesar de que unos pocos muestran un rendimiento reducido. Esto resultó ser cierto para los modos de inserción 11/11 y 11/12. La gran mayoría de clones de 8-mer también producen una VLP fácilmente identificable. Sin embargo, la eficiencia parece descender un poco a medida que la longitud de inserción aumenta hasta 10-mers, pero, aun así, una clara mayoría de los clones producen una VLP. Nótese que la movilidad de las partículas individuales es variable, lo cual es consistente con la previsión de que algunos péptidos alteran la carga superficial de la VLP incorporando aminoácidos cargados.

Ejemplo 6

La VLP de PP7 encapsida ARNm específico de recubrimiento.

[0150] Para las pruebas de expresión de alto nivel y de encapsidación de ARN, las secuencias de recubrimiento de PP7 de pP7K y p2P7K32 se clonaron en un plásmido que contenía el promotor T7 y el terminador transcripcional, produciendo los plásmidos denominados pETP7K y pET2P7K32. Los plásmidos, en la cepa de E. coli BL21(DE3), sintetizaron grandes cantidades de proteína de recubrimiento. Las VLPs resultantes se depuraron mediante cromatografía en Sefarosa CL4B, tal y como se ha descrito previamente (11, 12). Se depuró ADN de VLPs mediante extracción de fenol/cloroformo y se sometió a electroforesis en duplicados de gel de agarosa que contenían formaldehído. Un gel se tiñó con bromuro de etidio y el otro se trató con nitrocelulosa utilizando la técnica de 'Northern blot', donde se detectaron secuencias de PP7 usando un oligonucleótido sintético marcado que es específico para la cadena de sentido de recubrimiento. Los ARN producidos por transcripción 'in vitro' de pETP7K y pET2P7K32 con ARN polimerasa de T7 se utilizaron como patrón estándar. Cada VLP contiene una especie predominante cuya movilidad es idéntica a la del producto de transcripción 'in vitro', y que se hibrida específicamente con la sonda de recubrimiento específica de PP7. Se determinó que las VLPs de PP7 encapsidan sus ARNm, estableciendo que el vínculo ('linkage', en inglés) genotipo/fenotipo es necesario para la selección por afinidad. Nótese que estos inventores previamente dieron cuenta de pruebas similares sobre la capacidad de la proteína de recubrimiento de MS2 para encapsidar su ARNm.

Ejemplo 7

Los péptidos que se expresan en VLPs de PP7 se expresan al sistema inmunitario y son inmunogénicos.

[0151] Se construyeron VLPs de PP7 que expresan las secuencias de péptidos específicas que se muestran en las figuras 10 y 15. Estas incluían el -así llamado- péptido Flag y secuencias derivadas de la proteína capsídica menor L2 del virus del papiloma humano tipo 16 (HPV16), el bucle V3 de HIV-1 gp120 y un antígeno protector de 'Bacillus anthracis'. Para demostrar que estos péptidos insertados se expresaban realmente en la superficie de las VLPs, la capacidad de un anticuerpo monoclonal frente a HPV16 L2 (llamado RG-1) para unirse a VLPs de L2 y PP7 fue evaluada utilizando la técnica ELISA. Tal y como se muestra en la figura 16, RG-1 se unió a las L2-VLPs, pero no a VLPs de PP7 que expresaban el péptido V3 (también llamadas V3-VLPs). Para demostrar la inmunogenicidad de las VLPs, se inmunizaron ratones con V3-VLPs utilizando una inyección intramuscular, tal y como se ha descrito previamente [2]. Tal y como se muestra en la figura 17, lo sueros de los ratones fueron evaluados utilizando la técnica ELISA y demostraron tener una alta concentración de anticuerpos IgG que reaccionan específicamente con una versión sintética del péptido V3. Nótese que estos inventores previamente dieron cuenta de pruebas similares realizadas para estudiar la inmunogenicidad de los péptidos expresados en VLPs de MS2.

[0152] Ejemplo 8. Los plásmidos pET2P7K32 y pDSP7 son los análogos de pDSP1 y pDSP62, los productores de proteína de recubrimiento de MS2 previamente descritos. Para controlar la valencia de expresión de péptidos en VLPs de PP7, también se construyeron pET2P7K32(am) y pDSP7(am). Son análogos de pDSP1(am) y pDSP7(am), respectivamente.

[0153] La descripción detallada y los ejemplos anteriores se han ofrecido solo para hacer más clara la comprensión de la presente invención. De ellos no han de inferirse limitaciones innecesarias. La invención no se limita a los detalles exactos que se han mostrado y descrito, ya que en la invención definida por las reivindicaciones se incluirán variaciones que resultan evidentes para aquellos versados en la materia.

[0154] Todos los encabezamientos se han incluido en beneficio del lector, y no deben usarse para limitar el significado del texto que sigue al encabezamiento, a menos que así se especifique.

Literatura citada (Primer conjunto de referencias)

[0155]

1. Peabody, DS, Jordan, SK, Caldeira, JC, Manifold-Wheeler, B, Medford, A y Chackerian, B (2007) 'Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2'. J. Mol. Biol. 380: 252-263.
2. Kunkel TA, Bebenek, McClary J. (1991) 'Efficient Site-Directed Mutagenesis Using Uracil-Containing DNA' Methods Enzymol. 204:125-139.
3. Sidhu SS, Lowman HB, Cunningham BC, Wells JA. (2000) 'Phage display for selection of novel binding peptides'. Methods Enzymol. 328:333-363.
4. Kleina LG, Masson J-M, Normanly J, Abelson J, y Miller JH. (1990) 'Construction of Escherichia coli Amber Suppressor tRNA Genes'. J. Mol. Biol. 213: 705-717.
5. Lee SK and Deasling JD. (2005) 'A propionate-inducible expression system for enteric bacteria. Appl. Env. Microbiol. 71:6856-6862.
6. Peabody, D. S., y Lim, F. (1996) 'Nucleic Acids' Res 24,2352-2359.
7. Chang, A. C., y Cohen, S. N. (1978) 'J Bacteriol' 134, 1141-1156.

8. Caldeira, J. C., y Peabody, D. S. (2007) 'J Nanobiotechnology' 5,10
9. Olsthoorn, R. C., Garde, G., Dayhuff, T., Atkins, J. F., y Van Duin, J. (1995) 'Virology' 206, 611-625.
10. Tars K, F. K., Bundule M, Liljas L. (2000) 'Virology' 272, 331-337
11. Lim, F., Downey, T. D., y Peabody, D. S. (2001) 'Journal of Biological Chemistry' 276,22507-22512.
12. Peabody, D. S. (1990) 'J Biol Chem' 265, 5684-5689.

Literatura citada (Segundo conjunto de referencias)

[0156]

1. Caldeira Jdo C, Medford A, Kines RC, Lino CA, Schiller JT, Chackerian B, Peabody DS: 'Immunogenic display of diverse peptides, including a broadly cross-type neutralizing human papillomavirus L2 epitope, on virus-like particles of the RNA bacteriophage PP7'. Vaccine, 28(27):4384-4393.
2. Peabody DS, Manifold-Wheeler B, Medford A, Jordan SK, do Carmo Caldeira J, Chackerian B: 'Immunogenic display of diverse peptides on virus-like particles of RNA phage MS2'. JMol Biol 2008, 380(1):252-263.
3. Lowman HB, Bass SH, Simpson N, Wells JA: 'Selecting high-affinity binding proteins by monovalent phage display'. Biochemistry 1991, 30(45):10832-10838.
4. Sidhu SS, Lowman HB, Cunningham BC, Wells JA: 'Phage display for selection of novel binding peptides'. Methods in Ezymology 2000, 328:333-363.
5. Wells JA: 'Hormone mimicry'. Science 1996, 273(5274):449-450.
6. Peabody DS: 'Subunit fusion confers tolerance to peptide insertions in a virus coat protein'. Arch Biochem Biophys 1997, 347(1):85-92.
7. Peabody DS, Chakerian A: 'Asymmetric contributions to RNA binding by the Thr(45) residues of the MS2 coat protein dimer'. J Biol Chem 1999, 274(36):25403-25410.
8. Lim F, Peabody DS: 'RNA recognition site of PP7 coat protein'. Nucleic Acids Res 2002, 30(19):4138-4144.
9. Lim F, Downey TP, Peabody DS: 'Translational repression and specific RNA binding by the coat protein of the Pseudomonas phage PP7'. J Biol Chem 2001, 276(25):22507-22513.
10. Kunkel TA, Bebenek K, Mcclary J: 'Efficient Site-Directed Mutagenesis Using Uracil-Containing DNA'. Methods in Enzymology 1991, 204:125-139.
11. Tars K FK, Bundule M, Lilies L: 'The Three-Dimensional Structure of Bacteriophage PP7 from Pseudomonas aeruginosa at 3.7A Resolution'. Virology 2000, 272:331-337.
12. Kleina LG, Masson JM, Normanly J, Abelson J, Miller JH: 'Construction of Escherichia coli amber suppressor tRNA genes. II. Synthesis of additional tRNA genes and improvement of suppressor efficiency'. J Mol Biol 1990, 213(4):705-717.
13. Normanly J, Kleina LG, Masson JM, Abelson J, Miller JH: 'Construction of Escherichia coli amber suppressor tRNA genes. III. Determination of tRNA specificity'. J Mol Biol 1990, 213(4):719-726.
14. Kunkel TA: 'Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection'. Proc Natl Acad Sci U S A 1985. 82(2):488-492.
15. Maruyama IN, Maruyama HI, Brenner S: 'Lambda foo: a lambda phage vector for the expression of foreign proteins'. Proc Natl Acad Sci USA 1994, 91(17):8273-8277.
16. Mikawa YG, Maruyama IN, Brenner S: 'Surface display of proteins on bacteriophage lambda heads'. J Mol Biol 1996, 262(1):21-30.
17. Dunn IS: 'Assembly of functional bacteriophage lambda virions incorporating C-terminal peptide or protein fusions with the major tail protein'. J Mol Biol 1995, 248(3):497-506.

Reivindicaciones

1. Una construcción (o constructo) de ácido nucleico que comprende:

(a) un promotor bacteriano o bacteriofágico asociado operativamente con una secuencia de codificación para un dímero monocatenario de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos de ARN, que comprende una secuencia primaria de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas arriba' ('upstream', en inglés) y una secuencia secundaria de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo' ('downstream', en inglés), de manera que la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo' comprende un sitio para la inserción de una secuencia de codificación heteróloga;
(b) un origen de replicación para la replicación en una procariota;
(c) un gen con resistencia a los antibióticos; y
(d) un codón de parada de traducción situado en la unión entre las secuencias de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas arriba' y 'aguas abajo'.

2. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende múltiples sustituciones de nucleótidos silenciosas en la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas arriba', de manera que los partidores de oligonucleótidos mutagénicos se alinean con la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo', y no con la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas arriba'.

3. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sitio para la inserción de una secuencia de codificación heteróloga está situado en la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo', en la secuencia que codifica el bucle AB del polipéptido de recubrimiento 'aguas abajo' o en 3' hacia la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo'.

4. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3, en la que la secuencia de codificación del dímero monocatenario de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos de ARN es una secuencia de codificación de un dímero monocatenario de polipéptidos de recubrimiento de bacteriófagos MS2 o PP7.

5. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende dos sitios de restricción: un sitio de restricción primario situado en 5' hacia la parte de la secuencia que define el bucle AB del dímero de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo', y un sitio de restricción secundario situado en 3' hacia la secuencia de codificación del dímero de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo'.

6. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5, que además comprende un sitio de unión primario del partidor de PCR situado en 5' hacia el sitio de restricción primario, y un sitio de unión secundario del partidor de PCR situado en 3' hacia el sitio de restricción secundario.

7. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en la que la mencionada construcción comprende además un terminador de transcripción situado en 5' hacia el mencionado sitio de restricción secundario.

8. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que comprende, además, una región de codificación para un ARNt supresor.

9. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende, además, una secuencia de codificación para un péptido heterólogo insertado en un sitio de inserción de la secuencia de codificación de polipéptidos de recubrimiento 'aguas abajo'.

10. Una partícula tipo virus (VLP) producida a) por una procariota (i) transformada con una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9 y (ii) que expresa un ARNt supresor, y b) en la que la proporción de péptidos heterólogos que expresan polipéptidos de recubrimiento diméricos, presentada como el total de la proteína de recubrimiento presente en la partícula tipo virus, es reducida si se compara con una partícula tipo virus producida a partir de un dímero de polipéptidos de recubrimiento que porta una secuencia de péptidos heteróloga y se expresa a partir de un ácido nucleico en ausencia de ARNt supresor.

11. Una biblioteca de partículas tipo virus que comprende partículas tipo virus de acuerdo con la reivindicación 10.

FIGURA 1

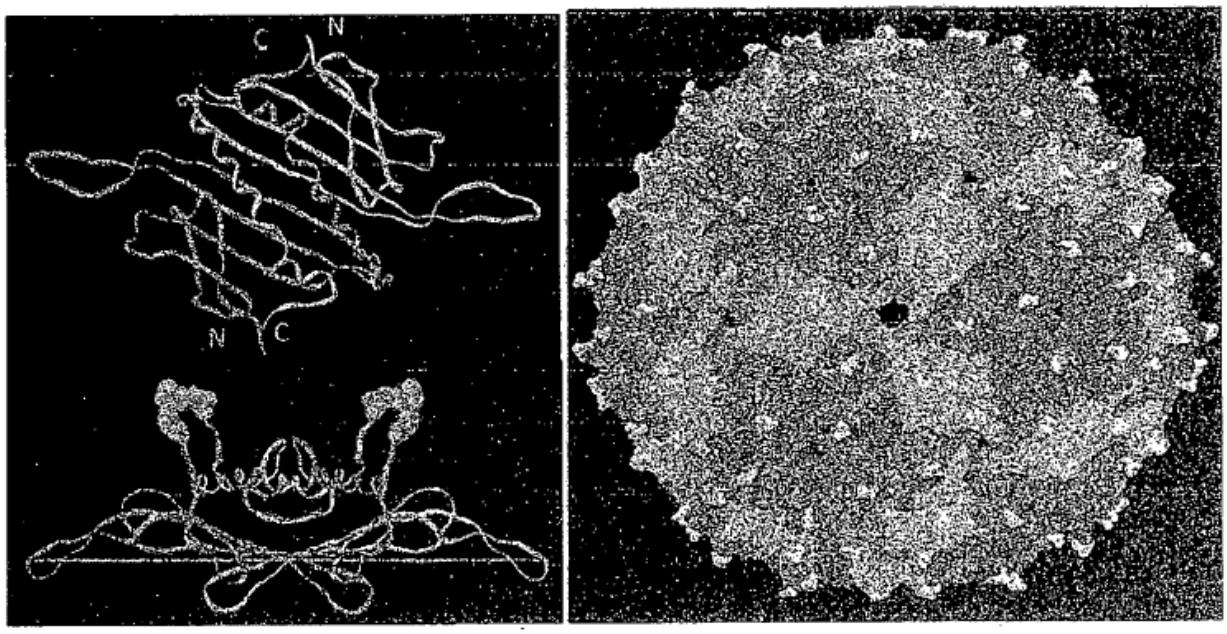


FIGURA 2

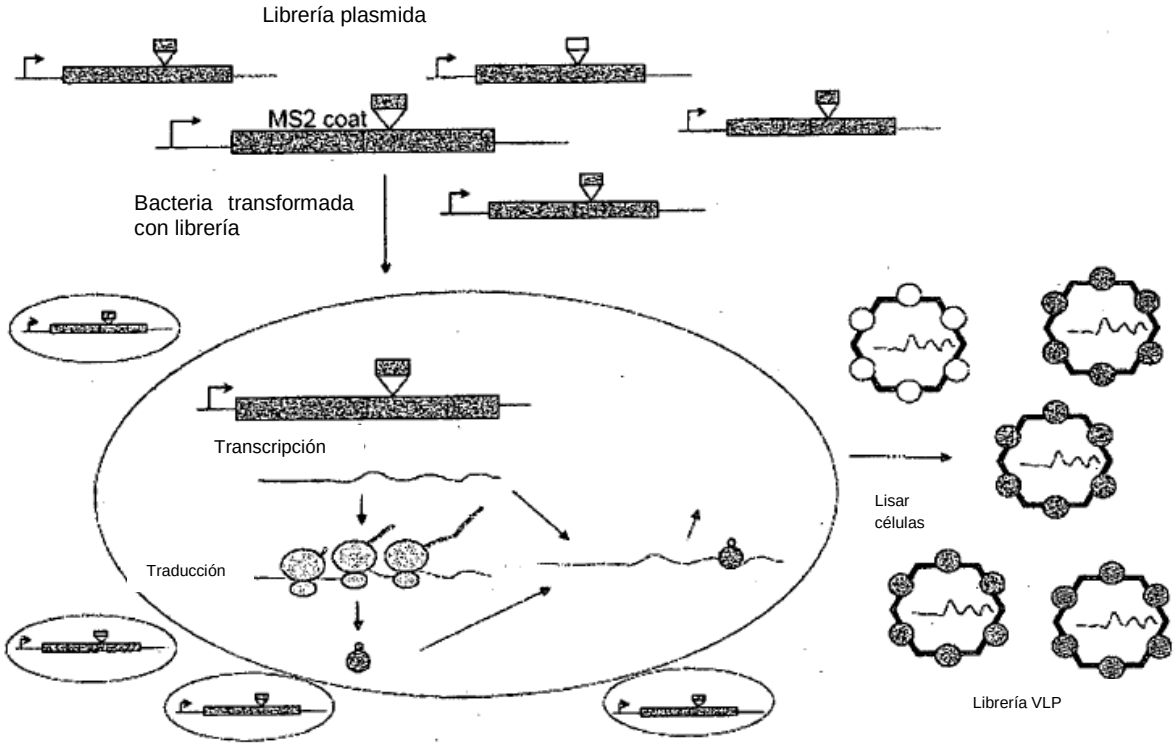

Librería plasmida
MS2 coat
Bacteria transformada con librería
Transcripción
Traducción
Lisar células
Librería VLP

FIGURA 3

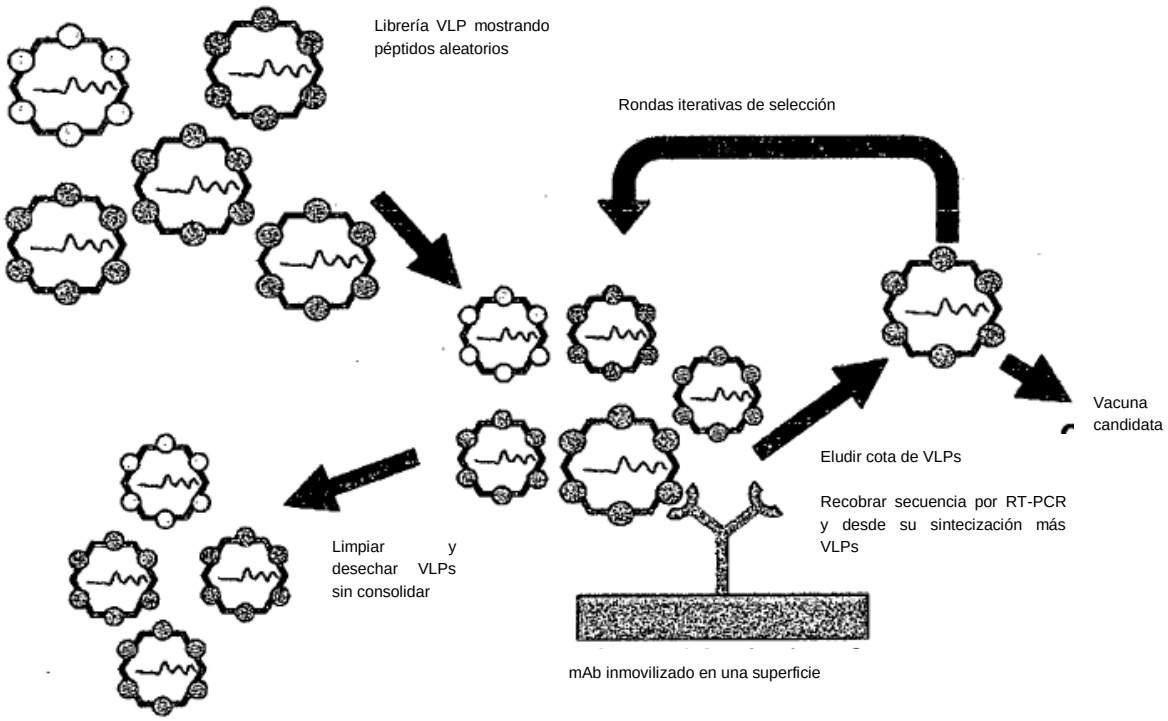

Librería VLP mostrando péptidos aleatorios
Rondas iterativas de selección
Vacuna candidata
Eludir cota de VLPs
Recobrar secuencia por RT-PCR y desde su sintecización más VLPs
Limpiar y desechar VLPs sin consolidar
mAb inmovilizado en una superficie

FIGURA 4

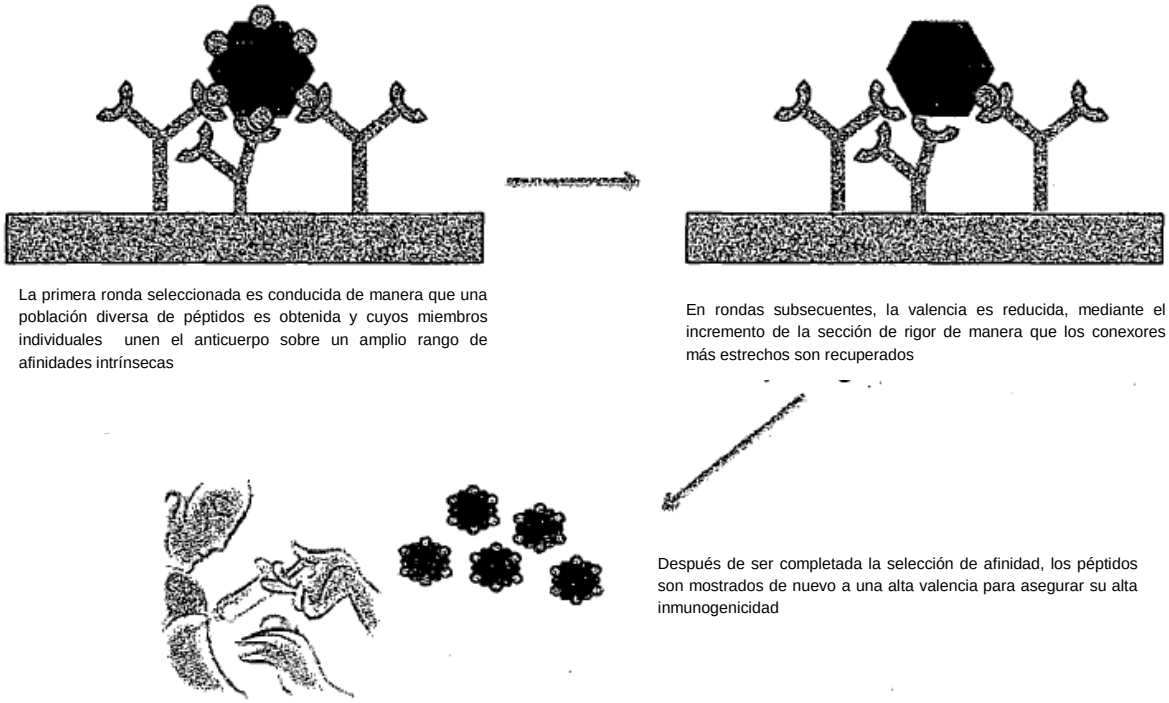

La primera ronda seleccionada es conducida de manera que una población diversa de péptidos es obtenida y cuyos miembros individuales unen el anticuerpo sobre un amplio rango de afinidades intrínsecas
En rondas subsecuentes, la valencia es reducida, mediante el incremento de la sección de rigor de manera que los conexores más estrechos son recuperados
Después de ser completada la selección de afinidad, los péptidos son mostrados de nuevo a una alta valencia para asegurar su alta inmunogenicidad

FIGURA 5

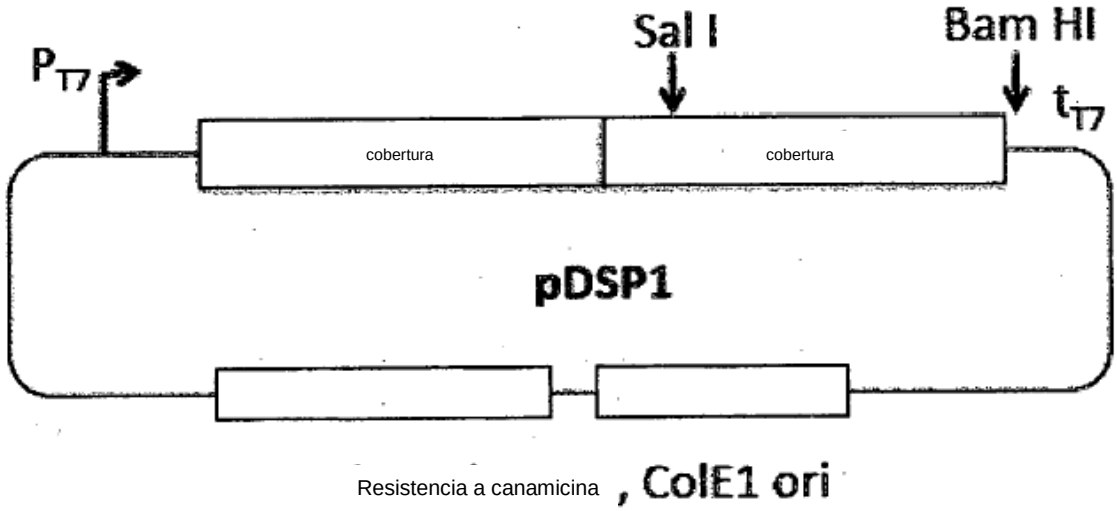

Sal I
Bam HI
P_{T7}
t_{T7}
cobertura
cobertura
pDSP1
Resistencia a canamicina
, ColE1 ori

FIGURA 6

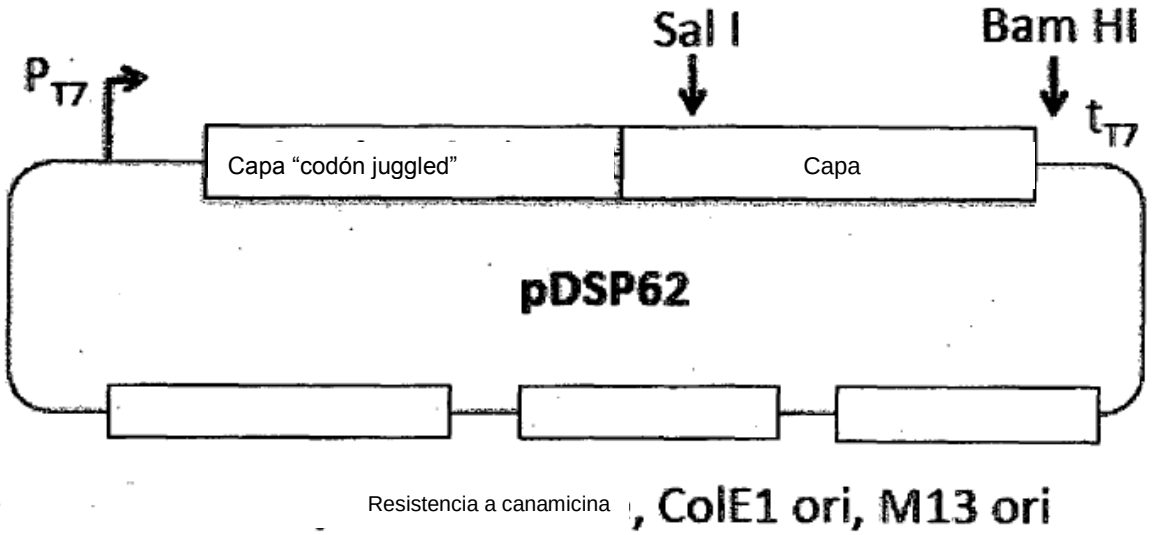

Sal I
Bam HI
P_{T7}
t_{T7}
Capa “codón juggled”
Capa
pDSP62
Resistencia a canamicina
, ColE1 ori, M13 ori

FIGURA 7

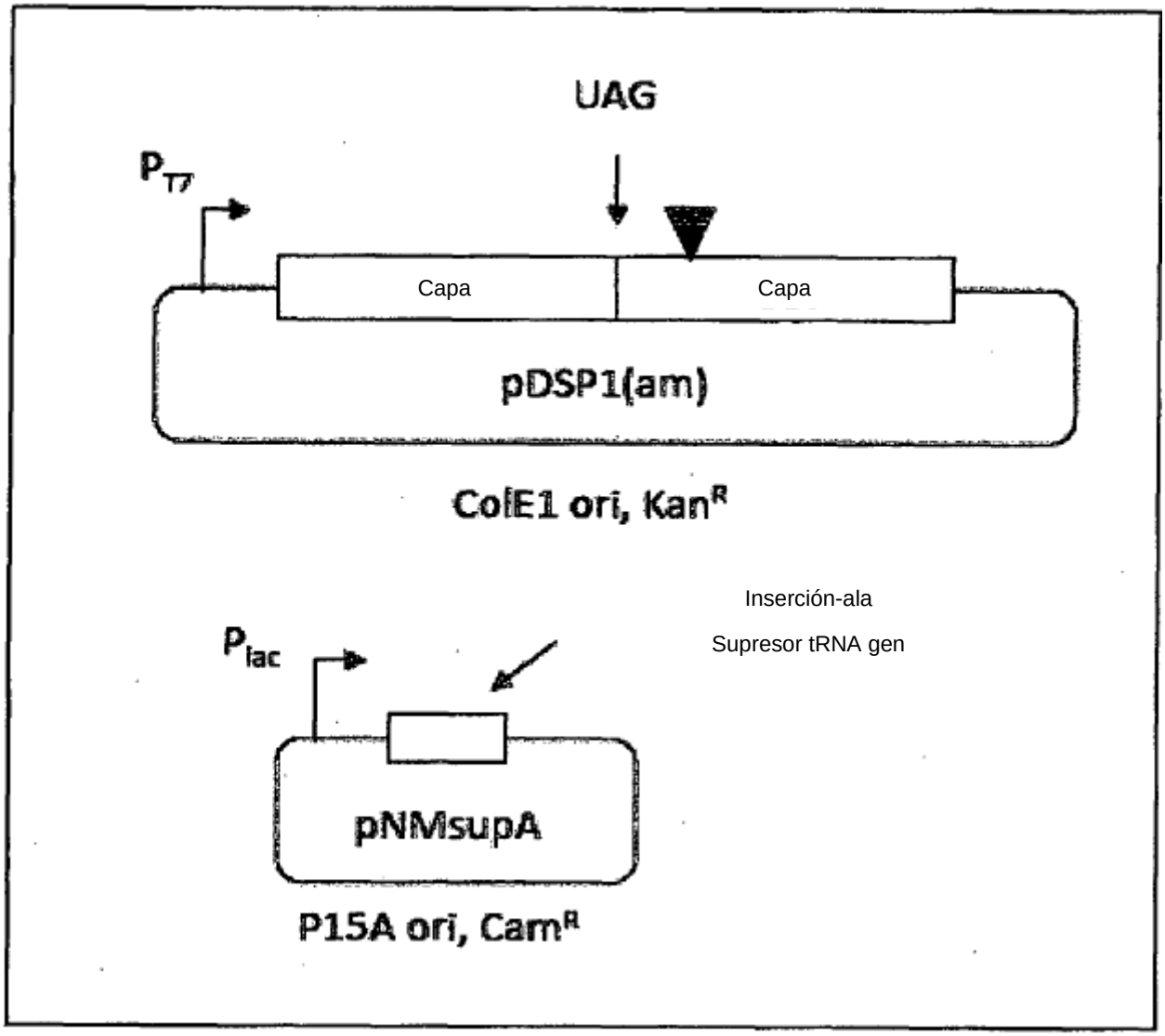

UAG
P_{T7}
Capa
Capa
pDSP1(am)
ColE1 ori, Kan^R
Inserción-ala
Supresor tRNA gen
P_{lac}
pNMsupA
P15A ori, Cam^R

FIGURA 8

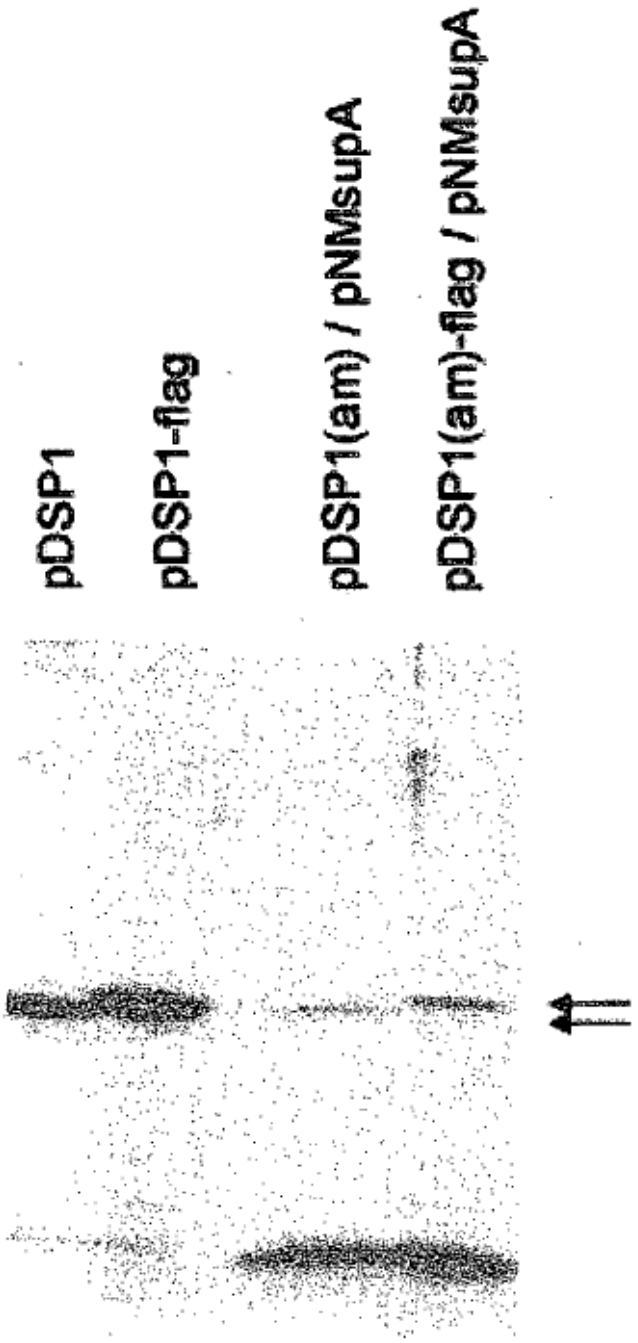


FIGURA 9a

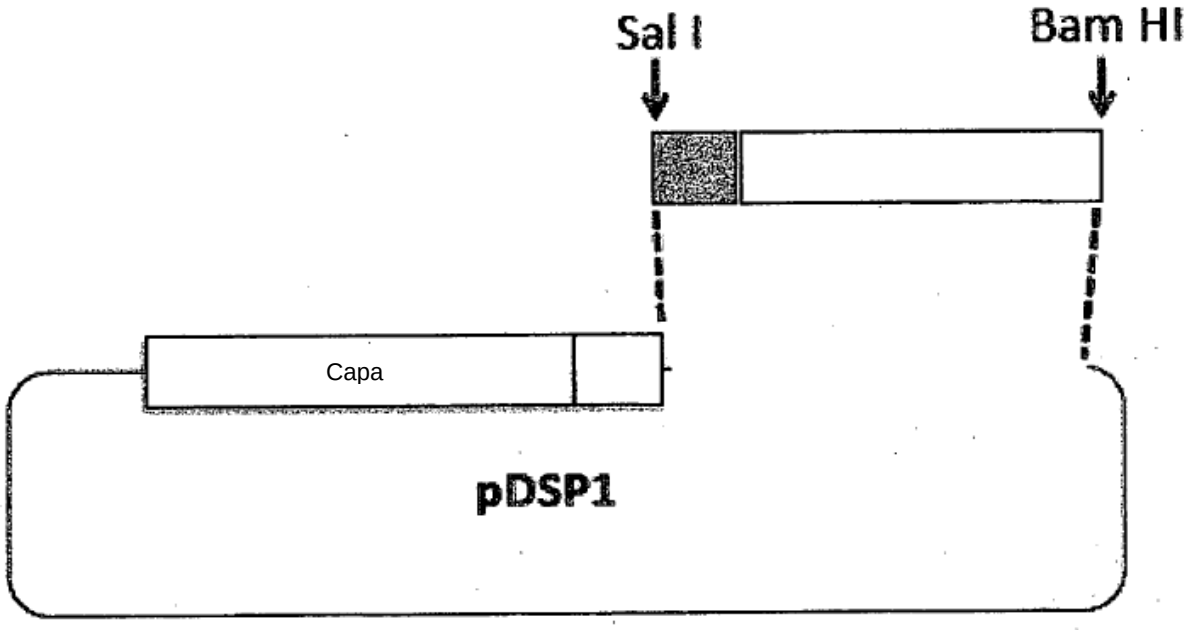


FIGURA 9B

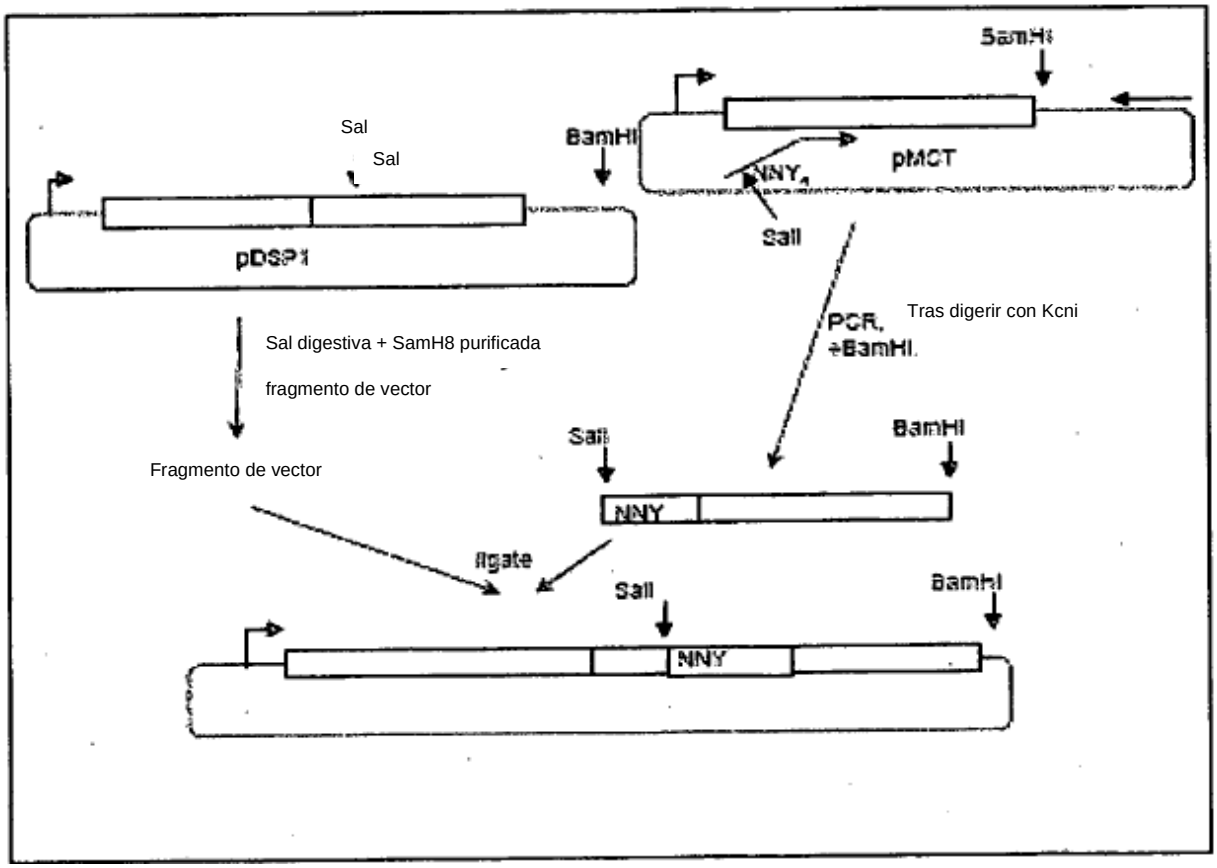

SamHI
Sal
Sal
BamHI
pMCT
NNY
SalI
pDSP1
PCR,
+BamHI.
Tras digerir con Kcni
Sal digestiva + SamH8 purificada
fragmento de vector
Fragmento de vector
SalI
BamHI
NNY
ligate
SalI
BamHI
NNY

FIGURA 10

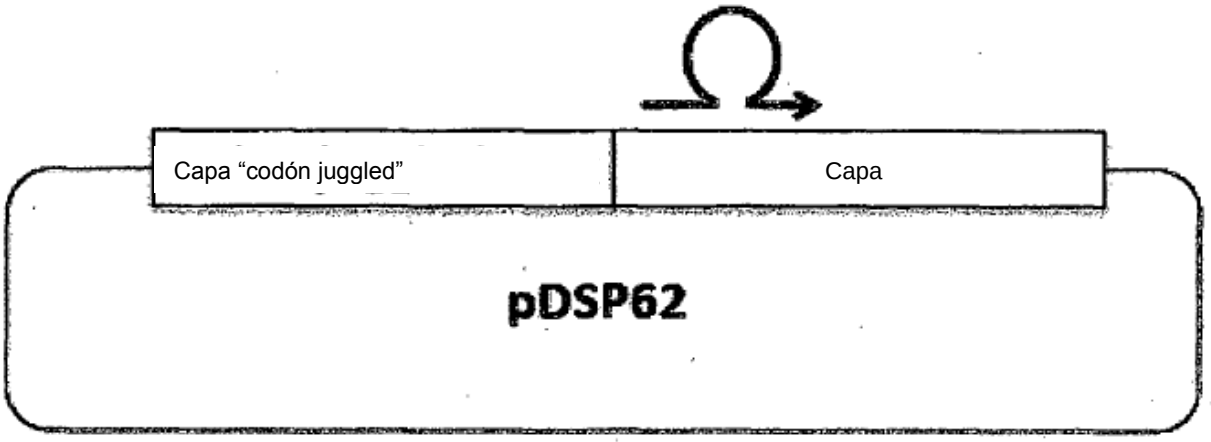


FIGURA 11 A

Secuencias de nucleótidos:

pDSP1 :

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC

FIGURA 11 A (Cont.)

ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CGATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAA
GCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTG
TTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATA
CCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCC
CGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGAC
CAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGT
GTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTG
CAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACC
ATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTC
GCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAG
CCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAAC
GCTGCCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATAT
GTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCT
CCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCAGGT
CGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTA
TAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCGGCA
TAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGCC
GCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCA
TGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGG
GGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCGT
CGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGG
ACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGA
CAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCA
GAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAG
TGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAA
GGCTCTCAAGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCC
AGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAG
GAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCG
AAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATG
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACG
ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCA
CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACCATGGCTTCTAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTTGACAATGGCG
GAACTGGCGACGTGACTGTCGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGAAT

FIGURA 11 A (CONT.)

GGATCAGCTCTAACTCGCGTTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTCGTCA
GAGCTCTGCGCAGAATCGCAAATACACCATCAAAGTCGAGGTGCCTAAAGTGGC
AACCCAGACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTACTTA
AATATGGAACTAACCATTCCAATTTTCGCTACGAATTCCGACTGCGAGCTTATTG
TTAAGGCAATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATCG
CAGCAAACTCCGGCCTCTACGGCAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTCGACAATGG
CGGTACCGGCGACGTGACTGTCGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGA
ATGGATCAGCTCTAACTCGCGTTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTCGT
CAGAGCTCTGCGCAGAATCGCAAATACACCATCAAAGTCGAGGTGCCTAAAGTG
GCAACCCAGACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTACT
TAAATATGGAACTAACCATTCCAATTTTCGCTACGAATTCCGACTGCGAGCTTAT
TGTTAAGGCAATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATC
GCAGCAAACTCCGGCATCTACTAATAGACGCCGGGTTAATTAATTAAGGATCCG
GCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAA
TAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGA
AAGGAGGAACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCG
TAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAG
CGGTCGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATAT
AGCGCTAGCAGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCC
CGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGG
GTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCT
GACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGAT
AAGCTGTCAAACATGAA

FIGURA 11 B

pDSP1(am)

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CGATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAA
GCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTG
TTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATA
CCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCC
CGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGAC
CAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGT
GTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTG
CAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACC
ATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTC
GCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAG

FIGURA 11B (CONT.)

CCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAAC
GCTGCCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATAT
GTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCT
CCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCAGGT
CGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTA
TAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCGGCA
TAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGCC
GCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCA
TGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGG
GGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCGT
CGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGG
ACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGA
CAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCA
GAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAG
TGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAA
GGCTCTCAAGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCC
AGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAG
GAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCG
AAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATG
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACG
ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCA
CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACAATGGCTTCTAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTTGACAATGGCG
GAACTGGCGACGTGACTGTCGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGAAT
GGATCAGCTCTAACTCGCGTTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTCGTCA
GAGCTCTGCGCAGAATCGCAAATACACCATCAAAGTCGAGGTGCCTAAAGTGGC
AACCCAGACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTACTTA
AATATGGAACTAACCATTCCAATTTTCGCTACGAATTCCGACTGCGAGCTTATTG
TTAAGGCAATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATCG
CAGCAAACTCCGGCATCTACTAGAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTCGACAATGG
CGGTACCGGCGACGTGACTGTCGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGA
ATGGATCAGCTCTAACTCGCGTTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTCGT
CAGAGCTCTGCGCAGAATCGCAAATACACCATCAAAGTCGAGGTGCCTAAAGTG
GCAACCCAGACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTACT
TAAATATGGAACTAACCATTCCAATTTTCGCTACGAATTCCGACTGCGAGCTTAT
TGTTAAGGCAATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATC
GCAGCAAACTCCGGCATCTACTAATAGACGCCGGGTTAATTAATTAAGGATCCG
GCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAA
TAACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGA
AAGGAGGAACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCG
TAGTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAG
CGGTCGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATAT
AGCGCTAGCAGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCC
CGCAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGG

FIGURA 11B (CONT)

GTGACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCT
GACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGAT
AAGCTGTCAAACATGAA

FIGURA 11C

pDSP62 :

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CTTTTCAAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCA
AAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA

FIGURA 11C (CONT)

CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGC
GATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCG
TAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGG
AAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCC
GCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTCGGCCGCC
ATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGA
CGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGA
TCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTG
CCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGA
CGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCA
AGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAG
GTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGC
GCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGC
GCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATA
TAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCG
GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT
ACCATGGCAAGCAATTTCACGCAATTTGTATTGGTAGATAACGGGGGTACGGGG
GATGTTACGGTAGCACCTTCAAATTTTGCAAATGGTGTAGCAGAGTGGATATCAA
GCAATAGCAGAAGCCAAGCATATAAGGTTACGTGCTCAGTAAGACAATCAAGCG
CTCAAAACAGAAAGTATACGATAAAGGTAGAAGTTCCGAAGGTTGCTACGCAAA
CGGTAGGTGGTGTTGAATTGCCGGTTGCAGCTTGGAGAAGCTATCTCAACATGGA
GTTGACGATACCTATATTTGCAACCAACAGTGATTGTGAATTGATAGTAAAAGCT
ATGCAGGGGTTGTTGAAGGACGGTAATCCTATACCGAGCGCTATAGCTGCTAATA
GTGGCCTCTACGGCAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTCGACAATGGCGGAACTGG
CGACGTGACTGTCGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGAATGGATCAG
CTCTAACTCGCGTTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTCGTCAGAGCTCT
GCGCAGAATCGCAAATACACCATCAAAGTCGAGGTGCCTAAAGTGGCAACCCAG
ACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTACTTAAATATGG
AACTAACCATTCCAATTTTCGCTACGAATTCCGACTGCGAGCTTATTGTTAAGGC
AATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATCGCAGCAAA
CTCCGGCATCTACTAATAGACGCCGGGTTAATTAATTAGGATCCGGCTGCTAACA
AAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT
AACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC
TATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGT
GGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTCGGACA
GTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCA

FIGURA 11 C (CONT)

GCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGC
CCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGC
CGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTA
GCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAA
ACATGAA

FIGURA 11D

pDSP62(am)

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CTTTTCAAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCA
AAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGC
GATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCG
TAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGG
AAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCC
GCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTCGGCCGCC
ATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGA

FIGURA 11 D (CONT)

CGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGA
TCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTG
CCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGA
CGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCA
AGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAG
GTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGC
GCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGC
GCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATA
TAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCG
GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT
ACCATGGCAAGCAATTTCACGCAATTTGTATTGGTAGATAACGGGGGTACGGGG
GATGTTACGGTAGCACCTTCAAATTTTGCAAATGGTGTAGCAGAGTGGATATCAA
GCAATAGCAGAAGCCAAGCATATAAGGTTACGTGCTCAGTAAGACAATCAAGCG
CTCAAAACAGAAAGTATACGATAAAGGTAGAAGTTCCGAAGGTTGCTACGCAAA
CGGTAGGTGGTGTTGAATTGCCGGTTGCAGCTTGGAGAAGCTATCTCAACATGGA
GTTGACGATACCTATATTTGCAACCAACAGTGATTGTGAATTGATAGTAAAAGCT
ATGCAGGGGTTGTTGAAGGACGGTAATCCTATACCGAGCGCTATAGCTGCTAATA
GTGGCCTCTACTAGAACTTTACTCAGTTCGTTCTCGTCGACAATGGCGGAACTGG
CGACGTGACTGTCGCCCCAAGCAACTTCGCTAACGGGGTCGCTGAATGGATCAG
CTCTAACTCGCGTTCACAGGCTTACAAAGTAACCTGTAGCGTTCGTCAGAGCTCT
GCGCAGAATCGCAAATACACCATCAAAGTCGAGGTGCCTAAAGTGGCAACCCAG
ACTGTTGGTGGTGTAGAGCTTCCTGTAGCCGCATGGCGTTCGTACTTAAATATGG
AACTAACCATTCCAATTTTCGCTACGAATTCCGACTGCGAGCTTATTGTTAAGGC
AATGCAAGGTCTCCTAAAAGATGGAAACCCGATTCCCTCAGCAATCGCAGCAAA
CTCCGGCATCTACTAATAGACGCCGGGTTAATTAATTAGGATCCGGCTGCTAACA
AAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCAT
AACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAAC
TATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAGT
GGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTCGGACA
GTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGCA
GCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCGCAAGAGGC
CCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTGC
CGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTTA
GCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCAA
ACATGAA

FIGURA 11 E

M13CM1 :

AACATCCAATAAATCATACAGGCAAGGCAAAGAATTAGCAAAATTAAGCAATAA
AGCCTCAGAGCATAAAGCTAAATCGGTTGTACCAAAAACATTATGACCCTGTAAT
ACTTTTGCGGGAGAAGCCTTTATTTCAACGCAAGGATAAAAATTTTTAGAACCCT
CATATATTTTAAATGCAATGCCTGAGTAATGTGTAGGTAAAGATTCAAAAGGGTG
AGAAAGGCCGGAGACAGTCAAATCACCATCAATATGATATTCAACCGTTCTAGC
TGATAAATTCATGCCGGAGAGGGTAGCTATTTTTGAGAGGTCTACAAAGGCTATC
AGGTCATTGCCTGAGAGTCTGGAGCAAACAAGAGAATCGATGAACGGTAATCGT
AAAACTAGCATGTCAATCATATGTACCCCGGTTGATAATCAGAAAAGCCCCAAA
AACAGGAAGATTGTATAAGCAAATATTTAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAA
AATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATC
GGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGCCCGAGACCTGCAGGGGGGGGGGG
GGAAAGCCACGTTGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAGATAAAAAT
ATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGGGGT
GTTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCTTGCTCGAGTGTTGATACCGGGAAGC
CCTGGGCCAACTTTTGGCGAAAATGAGACGTTGATCGGCACGTAAGAGGTTCCA
ACTTTCACCATAATGAAATAAGATCACTACCGGGCGTATTTTTTGAGTTATCGAG
ATTTTCAGGAGCTAAGGAAGCTAAAATGGAGAAAAAAATCACTGGATATACCAC
CGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACATTTTGAGGCATTTCAGTCAGTT
GCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTCAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAAGA
CCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCG
CCTGATGAATGCTCATCCGGAATTCCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGT
GATATGGGATAGTGTTCACCCTTGTTACACCGTTTTCCATGAGCAAACTGAAACG
TTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACATAT
ATTCGCAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTT
TATTGAGAATATGTTTTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTCACCAGTTTTG
ATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACTTCTTCGCCCCCGTTTTCACCATGGGCAA
ATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTCAGGTTCATCAT
GCCGTCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAATGCTTAATGAATTACAACAGTACT
GCGATGAGTGGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTTAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTA
AACGCCTGGTGCTACGCCTGAATAAGTGATAATAAGCGGATGAATGGCAGAAAT
TGAGCTCGAATCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGT
GGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCG
TAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGA
TCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTA
CTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGG
TGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTC
CACTGAGCGTCAGACCCCTTAATAAGATGATCTTCTTGAGATCGTTTTGGTCTGC
GCGTAATCTCTTGCTCTGAAAACGAAAAAACCGCCTTGCAGGGCGGTTTTTCGAA
GGTTCTCTGAGCTACCAACTCTTTGAACCGAGGTAACTGGCTTGGAGGAGCGCAG

FIGURA 11 E (CONT)

TCACCAAAACTTGTCCTTTCAGTTTAGCCTTAACCGGCGCATGACTTCAAGACTA
ACTCCTCTAAATCAATTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGTGCTTTTGCATGTCTTTC
CGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGACTGAAC
GGGGGGTTCGTGCATACAGTCCAGCTTGGAGCGAACTGCCTACCCGGAACTGAG
TGTCAGGCGTGGAATGAGACAAACGCGGCCATAACAGCGGAATGACACCGGTAA
ACCGAAAGGCAGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCCGCCAGGGGGAAACGCC
TGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCACTGATTTGAGCGTCAGATTTC
GTGATGCTTGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGGCTTTGCCGCGGCCCT
CTCACTTCCCTGTTAAGTATCTTCCTGGCATCTTCCAGGAAATCTCCGCCCCGTTC
GTAAGCCATTTCCGCTCGCCGCAGTCGAACGACCGAGCGTAGCGAGTCAGTGAG
CGAGGAAGCGGAATATATCCTGTATCACATATTCTGCTGACGCACCGGTGCAGCC
TTTTTTCTCCTGCCACATGAAGCGATCCGTCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCC
AGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCG
AAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAG
TTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCC
CCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGA
AGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTG
CGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATG
GTTGCTTTGACGAGCACGTATAACGTGCTTTCCTCGTTGGAATCAGAGCGGGAGC
TAAACAGGAGGCCGATTAAAGGGATTTTAGACAGGAACGGTACGCCAGAATCTT
GAGAAGTGTTTTTATAATCAGTGAGGCCACCGAGTAAAAGAGTCTGTCCATCACG
CAAATTAACCGTTGTAGCAATACTTCTTTGATTAGTAATAACATCACTTGCCTGA
GTAGAAGAACTCAAACTATCGGCCTTGCTGGTAATATCCAGAACAATATTACCGC
CAGCCATTGCAACAGGAAAAACGCTCATGGAAATACCTACATTTTGACGCTCAAT
CGTCTGAAATGGATTATTTACATTGGCAGATTCACCAGTCACACGACCAGTAATA
AAAGGGACATTCTGGCCAACAGAGATAGAACCCTTCTGACCTGAAAGCGTAAGA
ATACGTGGCACAGACAATATTTTTGAATGGCTATTAGTCTTTAATGCGCGAACTG
ATAGCCCTAAAACATCGCCATTAAAAATACCGAACGAACCACCAGCAGAAGATA
AAACAGAGGTGAGGCGGTCAGTATTAACACCGCCTGCAACAGTGCCACGCTGAG
AGCCAGCAGCAAATGAAAAATCTAAAGCATCACCTTGCTGAACCTCAAATATCA
AACCCTCAATCAATATCTGGTCAGTTGGCAAATCAACAGTAGAAAGGAATTGAG
GAAGGTTATCTAAAATATCTTTAGGTGCACTAACAACTAATAGATTAGAGCCGTC
AATAGATAATACATTTGAGGATTTAGAAGTATTAGACTTTACAAACAATTCGACA
ACTCGTATTAAATCCTTTGCCCGAACGTTATTAATTTTAAAAGTTTGAGTAACATT
ATCATTTTGCGGAACAAAGAAACCACCAGAAGGAGCGGAATTATCATCATATTC
CTGATTATCAGATGATGGCAATTCATCAATATAATCCTGATTGTTTGGATTATACT
TCTGAATTATGGAAGGAATTGAACCAACCATATCAAAATTATTAGCACGTAAAA

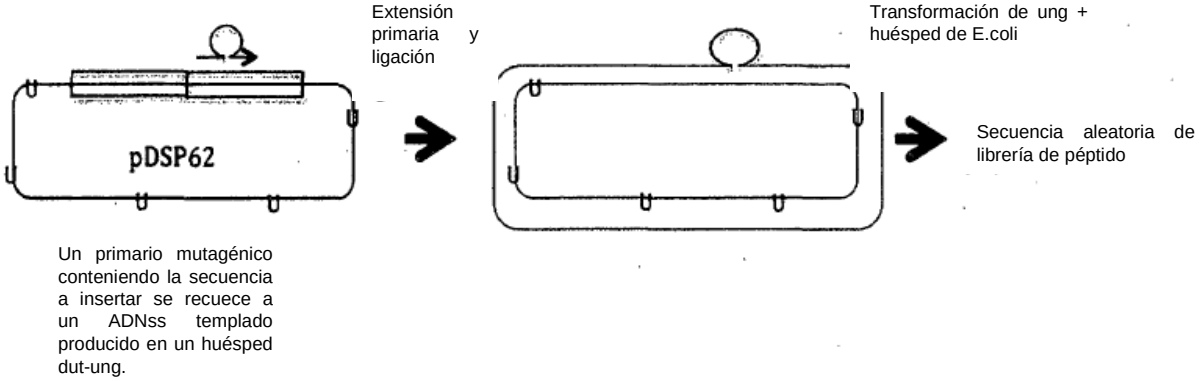
FIGURA 11 E (CONT)

CAGAAATAAAGAAATTGCGTAGATTTTCAGGTTTAACGTCAGATGAATATACAGT
AACAGTACCTTTTACATCGGGAGAAACAATAACGGATTCGCCTGATTGCTTTGAA
TACCAAGTTACAAAATCGCGCAGAGGCGAATTATTCATTTCAATTACCTGAGCAA
AAGAAGATGATGAAACAAACATCAAGAAAACAAAATTAATTACATTTAACAATT
TCATTTGAATTACCTTTTTTAATGGAAACAGTACATAAATCAATATATGTGAGTG
AATAACCTTGCTTCTGTAAATCGTCGCTATTAATTAATTTTCCCTTAGAATCCTTG
AAAACATAGCGATAGCTTAGATTAAGACGCTGAGAAGAGTCAATAGTGAATTTA
TCAAAATCATAGGTCTGAGAGACTACCTTTTTAACCTCCGGCTTAGGTTGGGTTA
TATAACTATATGTAAATGCTGATGCAAATCCAATCGCAAGACAAAGAACGCGAG
AAAACTTTTTCAAATATATTTTAGTTAATTTCATCTTCTGACCTAAATTTAATGGT
TTGAAATACCGACCGTGTGATAAATAAGGCGTTAAATAAGAATAAACACCGGAA
TCATAATTACTAGAAAAAGCCTGTTTAGTATCATATGCGTTATACAAATTCTTAC
CAGTATAAAGCCAACGCTCAACAGTAGGGCTTAATTGAGAATCGCCATATTTAAC
AACGCCAACATGTAATTTAGGCAGAGGCATTTTCGAGCCAGTAATAAGAGAATA
TAAAGTACCGACAAAAGGTAAAGTAATTCTGTCCAGACGACGACAATAAACAAC
ATGTTCAGCTAATGCAGAACGCGCCTGTTTATCAACAATAGATAAGTCCTGAACA
AGAAAAATAATATCCCATCCTAATTTACGAGCATGTAGAAACCAATCAATAATC
GGCTGTCTTTCCTTATCATTCCAAGAACGGGTATTAAACCAAGTACCGCACTCAT
CGAGAACAAGCAAGCCGTTTTTATTTTCATCGTAGGAATCATTACCGCGCCCAAT
AGCAAGCAAATCAGATATAGAAGGCTTATCCGGTATTCTAAGAACGCGAGGCGT
TTTAGCGAACCTCCCGACTTGCGGGAGGTTTTGAAGCCTTAAATCAAGATTAGTT
GCTATTTTGCACCCAGCTACAATTTTATCCTGAATCTTACCAACGCTAACGAGCG
TCTTTCCAGAGCCTAATTTGCCAGTTACAAAATAAACAGCCATATTATTTATCCC
AATCCAAATAAGAAACGATTTTTTGTTTAACGTCAAAAATGAAAATAGCAGCCTT
TACAGAGAGAATAACATAAAAACAGGGAAGCGCATTAGACGGGAGAATTAACT
GAACACCCTGAACAAAGTCAGAGGGTAATTGAGCGCTAATATCAGAGAGATAAC
CCACAAGAATTGAGTTAAGCCCAATAATAAGAGCAAGAAACAATGAAATAGCAA
TAGCTATCTTACCGAAGCCCTTTTTAAGAAAAGTAAGCAGATAGCCGAACAAAG
TTACCAGAAGGAAACCGAGGAAACGCAATAATAACGGAATACCCAAAAGAACT
GGCATGATTAAGACTCCTTATTACGCAGTATGTTAGCAAACGTAGAAAATACATA
CATAAAGGTGGCAACATATAAAAGAAACGCAAAGACACCACGGAATAAGTTTAT
TTTGTCACAATCAATAGAAAATTCATATGGTTTACCAGCGCTAAAGACAAAAGG
GCGACATTCAACCGATTGAGGGAGGGAAGGTAAATATTGACGGAAATTATTCAT
TAAAGGTGAATTATCACCGTCACCGACTTGAGCCATTTGGGAATTAGAGCCAGCA
AAATCACCAGTAGCACCATTACCATTAGCAAGGCCGGAAACGTCACCAATGAAA
CCATCGATAGCAGCACCGTAATCAGTAGCGACAGAATCAAGTTTGCCTTTAGCGT
CAGACTGTAGCGCGTTTTCATCGGCATTTTCGGTCATAGCCCCCTTATTAGCGTTT
GCCATCTTTTCATAATCAAAATCACCGGAACCAGAGCCACCACCGGAACCGCCTC
CCTCAGAGCCGCCACCCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCCACCACCCTCAGAGC
CGCCACCAGAACCACCACCAGAGCCGCCGCCAGCATTGACAGGAGGTTGAGGCA

FIGURA 11 E (CONT)

GGTCAGACGATTGGCCTTGATATTCACAAACGAATGGATCCTCATTAAAGCCAGA
ATGGAAAGCGCAGTCTCTGAATTTACCGTTCCAGTAAGCGTCATACATGGCTTTT
GATGATACAGGAGTGTACTGGTAATAAGTTTTAACGGGGTCAGTGCCTTGAGTAA
CAGTGCCCGTATAAACAGTTAATGCCCCCTGCCTATTTCGGAACCTATTATTCTG
AAACATGAAAGTATTAAGAGGCTGAGACTCCTCAAGAGAAGGATTAGGATTAGC
GGGGTTTTGCTCAGTACCAGGCGGATAAGTGCCGTCGAGAGGGTTGATATAAGT
ATAGCCCGGAATAGGTGTATCACCGTACTCAGGAGGTTTAGTACCGCCACCCTCA
GAACCGCCACCCTCAGAACCGCCACCCTCAGAGCCACCACCCTCATTTTCAGGGA
TAGCAAGCCCAATAGGAACCCATGTACCGTAACACTGAGTTTCGTCACCAGTACA
AACTACAACGCCTGTAGCATTCCACAGACAACCCTCATAGTTAGCGTAACGATCT
AAAGTTTTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGGGGTTTTGC
TAAACAACTTTCAACAGTTTCAGCGGAGTGAGAATAGAAAGGAACAACTAAAGG
AATTGCGAATAATAATTTTTTCACGTTGAAAATCTCCAAAAAAAAAGGCTCCAAA
AGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCTTGCTTTCGAGGTGAATTTCTTAAAC
AGCTTGATACCGATAGTTGCGCCGACAATGACAACAACCATCGCCCACGCATAA
CCGATATATTCGGTCGCTGAGGCTTGCAGGGAGTTAAAGGCCGCTTTTGCGGGAT
CGTCACCCTCAGCAGCGAAAGACAGCATCGGAACGAGGGTAGCAACGGCTACAG
AGGCTTTGAGGACTAAAGACTTTTTCATGAGGAAGTTTCCATTAAACGGGTAAAA
TACGTAATGCCACTACGAAGGCACCAACCTAAAACGAAAGAGGCGAAAGAATAC
ACTAAAACACTCATCTTTGACCCCCAGCGATTATACCAAGCGCGAAACAAAGTA
CAACGGAGATTTGTATCATCGCCTGATAAATTGTGTCGAAATCCGCGACCTGCTC
CATGTTACTTAGCCGGAACGAGGCGCAGACGGTCAATCATAAGGGAACCGAACT
GACCAACTTTGAAAGAGGACAGATGAACGGTGTACAGACCAGGCGCATAGGCTG
GCTGACCTTCATCAAGAGTAATCTTGACAAGAACCGGATATTCATTACCCAAATC
AACGTAACAAAGCTGCTCATTCAGTGAATAAGGCTTGCCCTGACGAGAAACACC
AGAACGAGTAGTAAATTGGGCTTGAGATGGTTTAATTTCAACTTTAATCATTGTG
AATTACCTTATGCGATTTTAAGAACTGGCTCATTATACCAGTCAGGACGTTGGGA
AGAAAAATCTACGTTAATAAAACGAACTAACGGAACAACATTATTACAGGTAGA
AAGATTCATCAGTTGAGATTTAGGAATACCACATTCAACTAATGCAGATACATAA
CGCCAAAAGGAATTACGAGGCATAGTAAGAGCAACACTATCATAACCCTCGTTT
ACCAGACGACGATAAAAACCAAAATAGCGAGAGGCTTTTGCAAAAGAAGTTTTG
CCAGAGGGGGTAATAGTAAAATGTTTAGACTGGATAGCGTCCAATACTGCGGAA
TCGTCATAAATATTCATTGAATCCCCCTCAAATGCTTTAAACAGTTCAGAAAACG
AGAATGACCATAAATCAAAAATCAGGTCTTTACCCTGACTATTATAGTCAGAAGC
AAAGCGGATTGCATCAAAAAGATTAAGAGGAAGCCCGAAAGACTTCAAATATCG
CGTTTTAATTCGAGCTTCAAAGCGAACCAGACCGGAAGCAAACTCCAACAGGTC
AGGATTAGAGAGTACCTTTAATTGCTCCTTTTGATAAGAGGTCATTTTTGCGGAT
GGCTTAGAGCTTAATTGCTGAATCTGGTGCTGTAGCTCAACATGTTTTAAATATG
CAACTAAAGTACGGTGTCTGGAAGTTTCATTCCATGTAACAGTTGATTCCCAATT
CTGCGAACGAGTAGATTTAGTTTGACCATTAGATACATTTCGCAAATGGTCAATA
ACCTGTTTAGCTATATTTTCATTTGGGGCGCGAGCTGAAAAGGTGGCATCAATTC
TACTAATAGTAGTAGCGTT

FIGURA 12


pDSP62
Extensión primaria y ligación
Transformación de ung + huésped de E.coli
Secuencia aleatoria de librería de péptido
Un primario mutagénico conteniendo la secuencia a insertar se recuece a un ADNss templado producido en un huésped dut-ung.

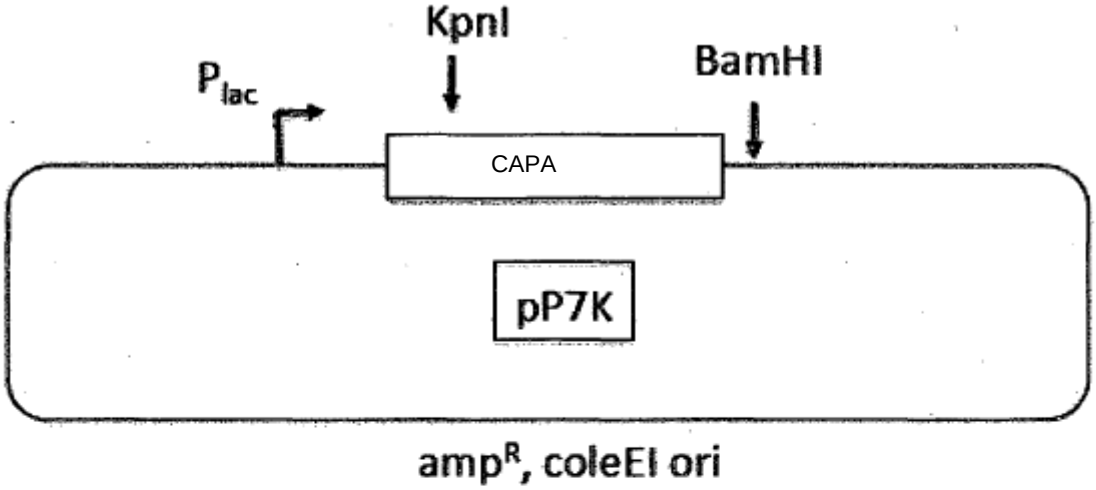


FIGURA 13A

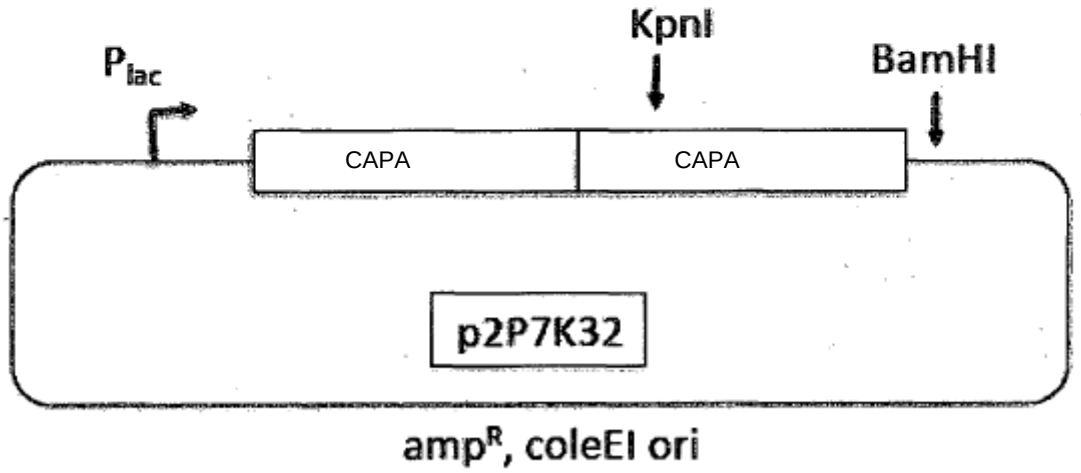


FIGURA 13B

FIGURA 14

PP7 Tipo libre secuencia N-terminal proteína capa:

```
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18
ATG,GCC,AAA,ACC,ATC,GTT,CTT,TCG,GTC,GGC,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG
Met,ala,lys,thr,ile,val,leu,ser,val,gly,glu,ala,thr,arg,thr,leu,thr,gl
```

pP7K secuencia de proteína capa mutante (KpnI en negrita):

```
 1   2   3   4   5   6   7   8   9  10  11  12  13  14  15  16  17  18
ATG,GCC,AAA,ACC,ATC,GTT,CTT,TCG,GTC,GGT,ACC,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG
Met,ala,lys,thr,ile,val,leu,ser,val,gly,thr,ala,thr,arg,thr,leu,thr,glu
```

Inserciones primarias en secuencias aleatorias de péptidos:

```
GCG GGTACC(NNY)6,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG  1112-(NNY)6
This yields exact insertions between residues thr11 and ala12.

GCG GGTACC(NNY)6,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG  1111-(NNY)6
GCG GGTACC(NNY)8,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG  1111-(NNY)8
GCG GGTACC(NNY)10,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG  1111-(NNY)10
These last three primers yield insertions between thr11 and glu11, i.e.
residue 11 is repeated at the insertion boundaries, but it's thr on the N-
terminal side, and glu (the wild-type position 11 amino acid) on the C-
terminal side.
```

Inserciones específicas de péptidos que fueron construidos usando los siguientes primarios:

Fp7 (Péptido indicador)

```
GCC,GGT,ACC,GAT,TAT,AAA,GAT,GAT,GAT,GAT,AAA,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG
```

atxp7 (epitopo F20 antrax)

```
GCC,GGT,ACC,GTG,CAT,GCG,AGC,TTT,TTT,GAT,ATC,GGC,GGC,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG
,ACT,GAG
```

atxp7r (antígeno F20 protectivo de Antrax con aminoácidos aleatorios flaqueados)

```
GCC,GGT,ACC,NNS,NNS,GCG,AGC,TTT,TTT,GAT,NNS,NNS,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT
,GAG
```

v3p7 (lazo VIH V3)

```
GCC,GGT,ACC,ATC,CAG,CGC,GGC,CCG,GGC,CGC,GCG,TTT,GTG,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG
,ACT,GAG
```

L2p7 (HPV L2 peptido)

```
GCC,GGT,ACC,CAG,CTG,TAT,AAA,ACC,TGC,AAA,CAG,GCG,GGC,ACC,TGC,CCG,CCG,GAT,GAG
,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG
```

L2.5p7 (HPV L@ medio peptido)

```
GCC,GGT,ACC,CAG,CTG,TAT,AAA,ACC,TGC,AAA,CAG,GAG,GCT,ACT,CGC,ACT,CTG,ACT,GAG
```

FIGURA 15

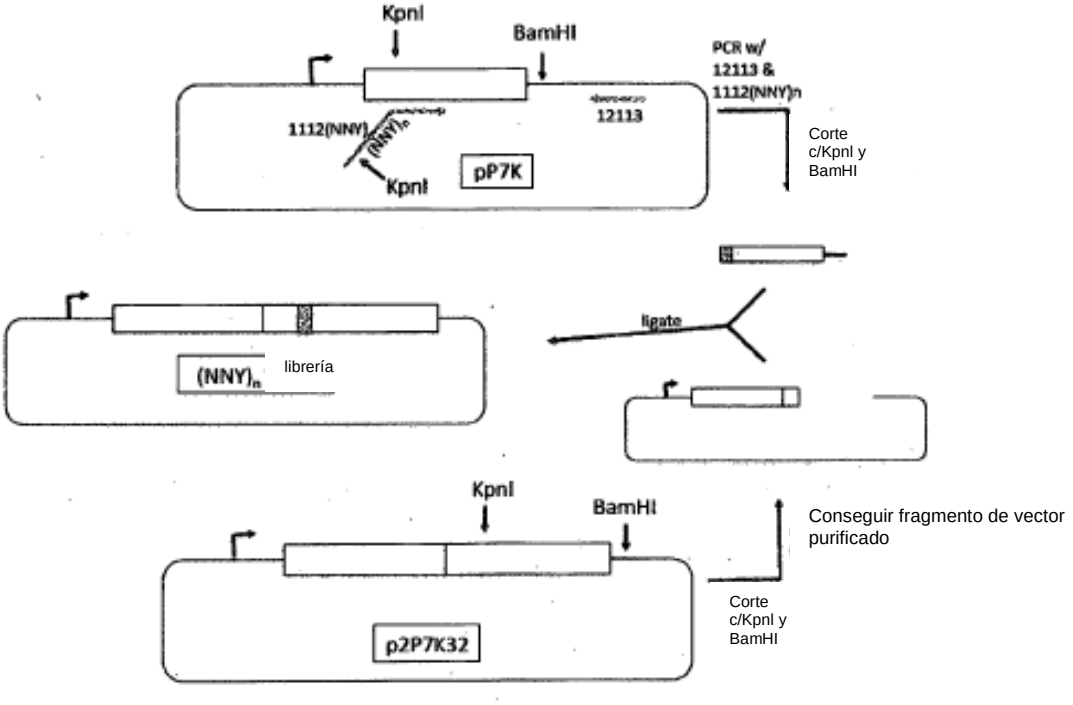
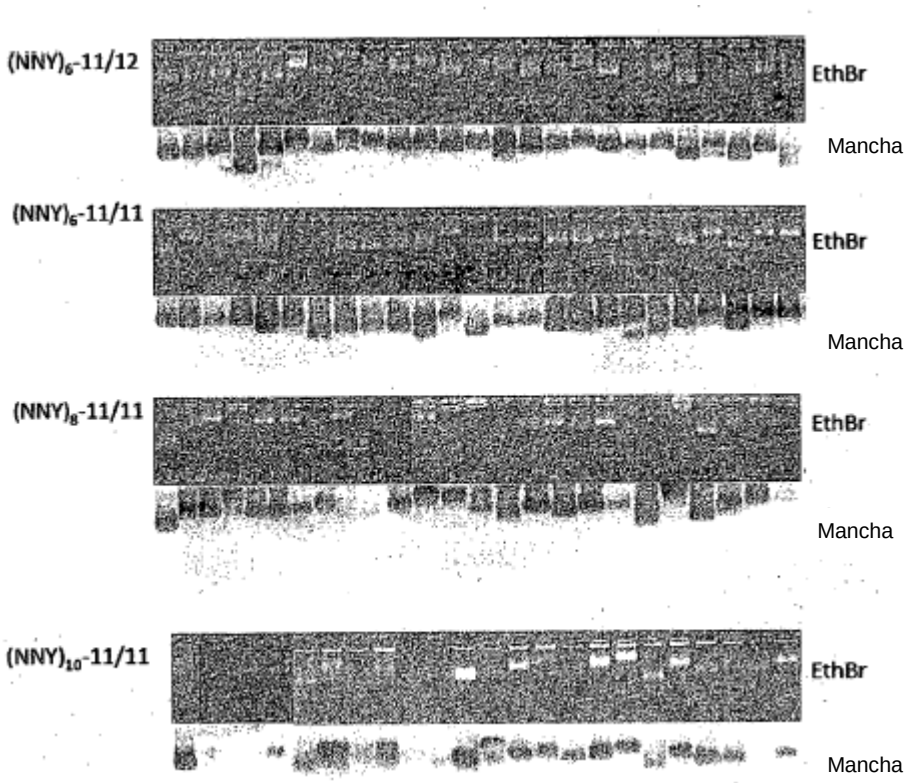

KpnI
BamHI
PCR w/
12113 &
1112(NNY)n
12113
1112(NNY)
(NNY)n
KpnI
pP7K
Corte
c/KpnI y
BamHI
ligate
(NNY)n
librería
KpnI
BamHI
Conseguir fragmento de vector
purificado
p2P7K32
Corte
c/KpnI y
BamHI

FIGURA 16


(NNY)6-11/12
EthBr
Mancha
(NNY)6-11/11
EthBr
Mancha
(NNY)8-11/11
EthBr
Mancha
(NNY)10-11/11
EthBr
Mancha

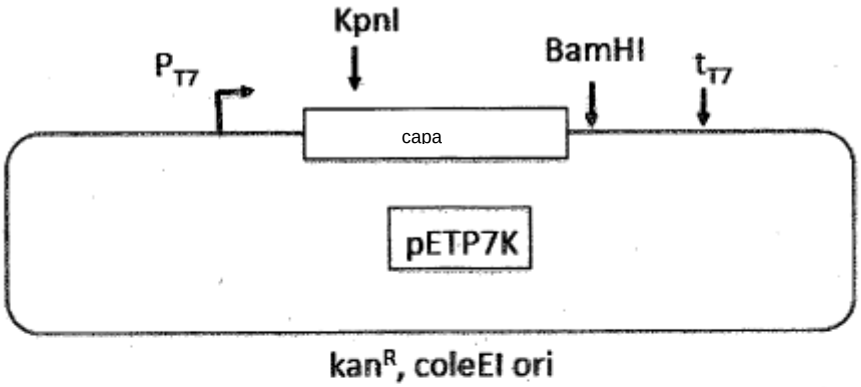


Figura 17A

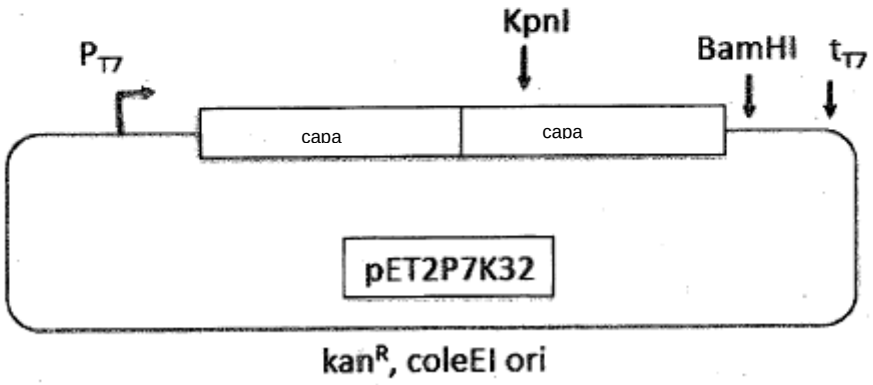


Figura 17B

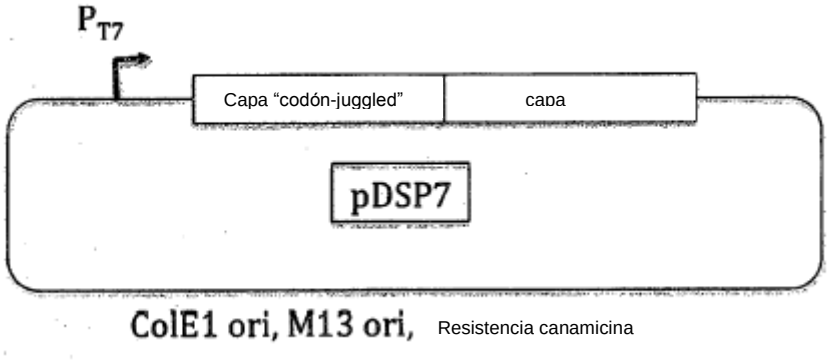

P_{T7}
Capa “codón-juggled”
capa
pDSP7
ColE1 ori, M13 ori,
Resistencia canamicina

Figura 17c

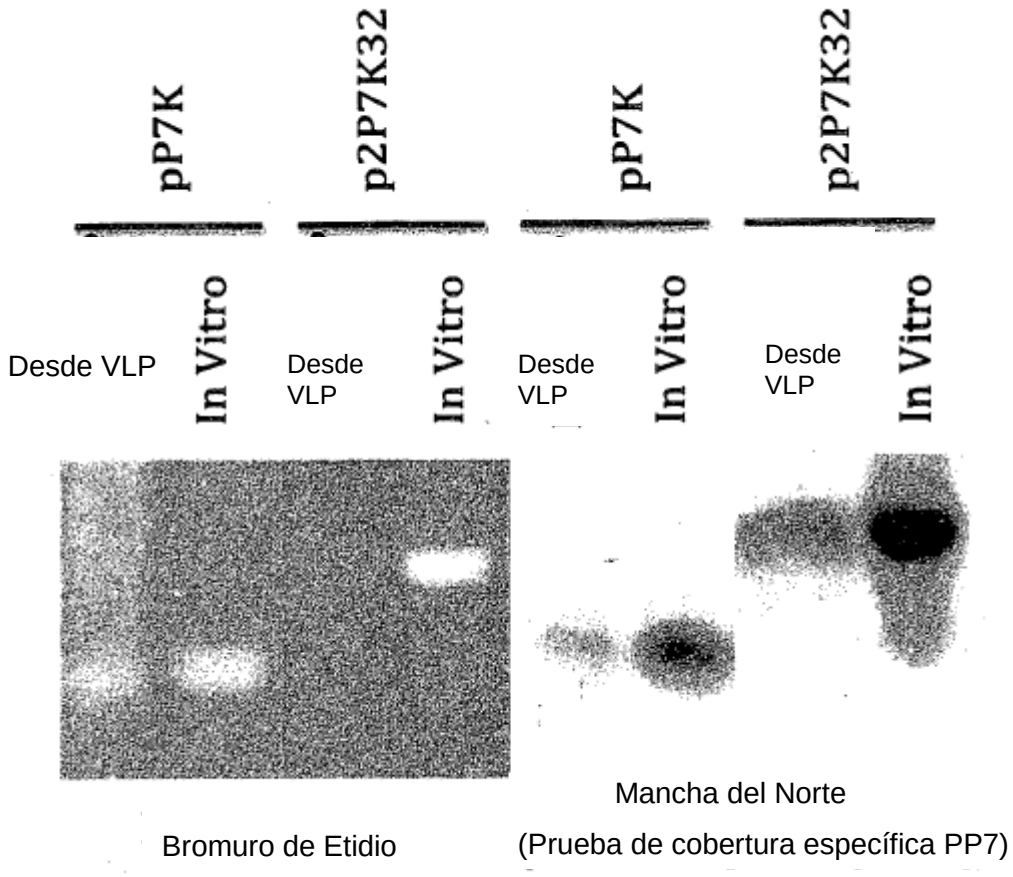

pP7K
p2P7K32
pP7K
p2P7K32
Desde VLP
In Vitro
Desde VLP
In Vitro
Desde VLP
In Vitro
Desde VLP
In Vitro
Bromuro de Etidio
Mancha del Norte
(Prueba de cobertura específica PP7)

Figura 18

Epitopo indicador	DYKDDDDK
Peptido VIH V3	IQRGPGRAPV
Peptido HPV16 l2	QLYKTCKQAGTCPPD
Antigen Protectivo Antrax	VHASFFDIGG

Figura 19

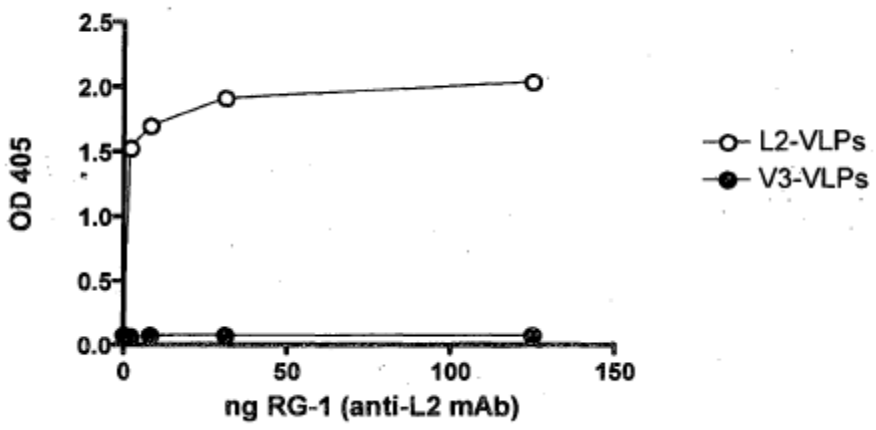

2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
OD 405
0
50
100
150
ng RG-1 (anti-L2 mAb)
L2-VLPs
V3-VLPs

Figura 20

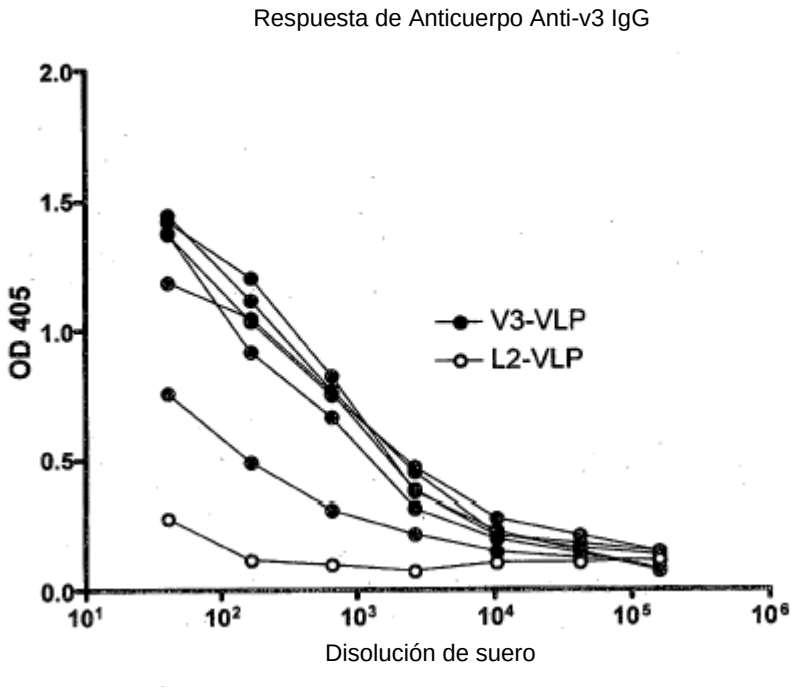
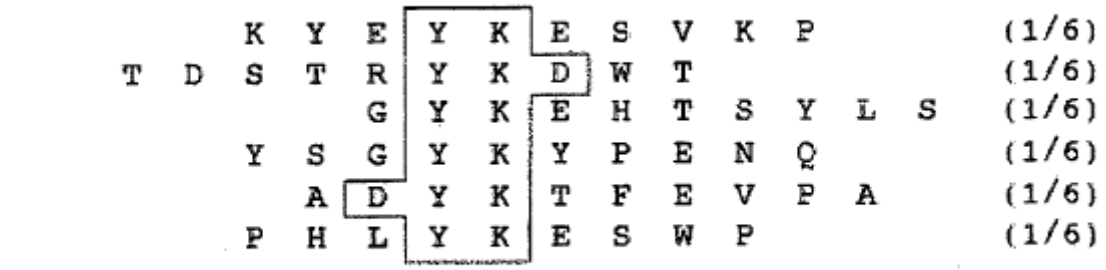
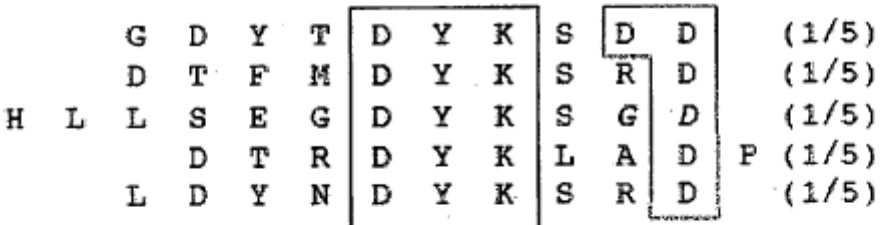

Respuesta de Anticuerpo Anti-v3 IgG
OD 405
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
V3-VLP
L2-VLP
10¹
10²
10³
10⁴
10⁵
10⁶
Disolución de suero

Figura 21

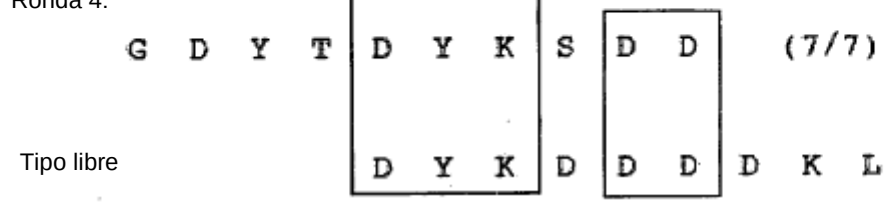
Rondas 1 y 2:



Ronda 3:



Ronda 4:



Tipo libre

Figura 22

Figura 23

pET2P7K32

TTCTTAGAÅAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CGATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAA
GCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTG
TTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATA
CCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCC
CGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGAC
CAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGT
GTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTG
CAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACC
ATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTC
GCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAG

Figura 23 (Cont.)

CCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAAC
GCTGCCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATAT
GTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCT
CCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCAGGT
CGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTA
TAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCGGCA
TAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGCC
GCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCA
TGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGG
GGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCGT
CGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGG
ACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGA
CAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCA
GAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAG
TGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAA
GGCTCTCAAGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCC
AGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAG
GAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCG
AAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATG
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACG
ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCA
CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACCATGGCCAAAACCATCGTTCTTTCGGTCGGCGAGGCTACTCGCA
CTCTGACTGAGATCCAGTCCACCGCAGACCGTCAGATCTTCGAAGAGAAGGTCG
GGCCTCTGGTGGGTCGGCTGCGCCTCACGGCTTCGCTCCGTCAAAACGGAGCCAA
GACCGCGTATCGAGTCAACCTAAAACTGGATCAGGCGGACGTCGTTGATTGCTCC
ACCAGCGTCTGCGGCGAGCTTCCGAAAGTGCGCTACACTCAGGTATGGTCGCAC
GACGTGACAATCGTTGCGAATAGCACCGAGGCCTCGCGCAAATCGTTGTACGATT
TGACCAAGTCCCTCGTCGCGACCTCGCAGGTCGAAGATCTTGTCGTCAACCTTGT
GCCGCTGGGCCGTTATGGCTCCAAAACCATCGTTCTTTCGGTCGGCGAGGGTACC
CGCACTCTGACTGAGATCCAGTCCACCGCAGACCGTCAGATCTTCGAAGAGAAG
GTCGGGCCTCTGGTGGGTCGGCTGCGCCTCACGGCTTCGCTCCGTCAAAACGGAG
CCAAGACCGCGTATCGAGTCAACCTAAAACTGGATCAGGCGGACGTCGTTGATT
GCTCCACCAGCGTCTGCGGCGAGCTTCCGAAAGTGCGCTACACTCAGGTATGGTC
GCACGACGTGACAATCGTTGCGAATAGCACCGAGGCCTCGCGCAAATCGTTGTA
CGATTTGACCAAGTCCCTCGTCGCGACCTCGCAGGTCGAAGATCTTGTCGTCAAC
CTTGTGCCGCTGGGCCGTTAAGGCCCTGCGGTGTACCCGTGTGTATGGATCCGGC
TGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAA
GGAGGAACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTA
GTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCG
GTCGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAG
CGCTAGCAGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCG
CAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGT
GACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTG
ACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATA
AGCTGTCAAACATGAA

Figura 23 b

pET2P7K32(am)

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CGATTCACAGATGTCTGCCTGTTCATCCGCGTCCAGCTCGTTGAGTTTCTCCAGAA
GCGTTAATGTCTGGCTTCTGATAAAGCGGGCCATGTTAAGGGCGGTTTTTTCCTG
TTTGGTCACTGATGCCTCCGTGTAAGGGGGATTTCTGTTCATGGGGGTAATGATA
CCGATGAAACGAGAGAGGATGCTCACGATACGGGTTACTGATGATGAACATGCC
CGGTTACTGGAACGTTGTGAGGGTAAACAACTGGCGGTATGGATGCGGCGGGAC
CAGAGAAAAATCACTCAGGGTCAATGCCAGCGCTTCGTTAATACAGATGTAGGT
GTTCCACAGGGTAGCCAGCAGCATCCTGCGATGCAGATCCGGAACATAATGGTG
CAGGGCGCTGACTTCCGCGTTTCCAGACTTTACGAAACACGGAAACCGAAGACC
ATTCATGTTGTTGCTCAGGTCGCAGACGTTTTGCAGCAGCAGTCGCTTCACGTTC
GCTCGCGTATCGGTGATTCATTCTGCTAACCAGTAAGGCAACCCCGCCAGCCTAG

Figura 23 b (Cont.)

CCGGGTCCTCAACGACAGGAGCACGATCATGCGCACCCGTGGCCAGGACCCAAC
GCTGCCCGAGATGCGCCGCGTGCGGCTGCTGGAGATGGCGGACGCGATGGATAT
GTTCTGCCAAGGGTTGGTTTGCGCATTCACAGTTCTCCGCAAGAATTGATTGGCT
CCAATTCTTGGAGTGGTGAATCCGTTAGCGAGGTGCCGCCGGCTTCCATTCAGGT
CGAGGTGGCCCGGCTCCATGCACCGCGACGCAACGCGGGGAGGCAGACAAGGTA
TAGGGCGGCGCCTACAATCCATGCCAACCCGTTCCATGTGCTCGCCGAGGCGGCA
TAAATCGCCGTGACGATCAGCGGTCCAGTGATCGAAGTTAGGCTGGTAAGAGCC
GCGAGCGATCCTTGAAGCTGTCCCTGATGGTCGTCATCTACCTGCCTGGACAGCA
TGGCCTGCAACGCGGGCATCCCGATGCCGCCGGAAGCGAGAAGAATCATAATGG
GGAAGGCCATCCAGCCTCGCGTCGCGAACGCCAGCAAGACGTAGCCCAGCGCGT
CGGCCGCCATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGG
ACCAGTGACGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGA
CAGGCCGATCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCA
GAGCGCTGCCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAG
TGCGGCGACGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAA
GGCTCTCAAGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCC
AGTAGTAGGTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAG
GAGATGGCGCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCG
AAACAAGCGCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATG
TCGGCGATATAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACG
ATGCGTCCGGCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCA
CTATAGGGAGACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGA
AGGAGATATACCATGGCCAAAACCATCGTTCTTTCGGTCGGCGAGGCTACTCGCA
CTCTGACTGAGATCCAGTCCACCGCAGACCGTCAGATCTTCGAAGAGAAGGTCG
GGCCTCTGGTGGGTCGGCTGCGCCTCACGGCTTCGCTCCGTCAAAACGGAGCCAA
GACCGCGTATCGAGTCAACCTAAAACTGGATCAGGCGGACGTCGTTGATTGCTCC
ACCAGCGTCTGCGGCGAGCTTCCGAAAGTGCGCTACACTCAGGTATGGTCGCAC
GACGTGACAATCGTTGCGAATAGCACCGAGGCCTCGCGCAAATCGTTGTACGATT
TGACCAAGTCCCTCGTCGCGACCTCGCAGGTCGAAGATCTTGTCGTCAACCTTGT
GCCGCTGGGCCGTTAGGGCTCCAAAACCATCGTTCTTTCGGTCGGCGAGGGTACC
CGCACTCTGACTGAGATCCAGTCCACCGCAGACCGTCAGATCTTCGAAGAGAAG
GTCGGGCCTCTGGTGGGTCGGCTGCGCCTCACGGCTTCGCTCCGTCAAAACGGAG
CCAAGACCGCGTATCGAGTCAACCTAAAACTGGATCAGGCGGACGTCGTTGATT
GCTCCACCAGCGTCTGCGGCGAGCTTCCGAAAGTGCGCTACACTCAGGTATGGTC
GCACGACGTGACAATCGTTGCGAATAGCACCGAGGCCTCGCGCAAATCGTTGTA
CGATTTGACCAAGTCCCTCGTCGCGACCTCGCAGGTCGAAGATCTTGTCGTCAAC
CTTGTGCCGCTGGGCCGTTAAGGCCCTGCGGTGTACCCGTGTGTATGGATCCGGC
TGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA
ACTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAA
GGAGGAACTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTA
GTCGATAGTGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCG
GTCGGACAGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAG
CGCTAGCAGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCG
CAAGAGGCCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGT
GACGGTGCCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTG
ACTGCGTTAGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATA
AGCTGTCAAACATGAA

Figura 23 c

pDSP7

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CTTTTCAAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCA
AAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGC
GATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCG
TAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGG
AAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCC
GCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTCGGCCGCC
ATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGA

Figura 23 c (Cont.)

CGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGA
TCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTG
CCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGA
CGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCA
AGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAG
GTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGC
GCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGC
GCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATA
TAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCG
GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT
ACCATGGCAAAGACGATAGTATTGAGCGTAGGGGAAGCAACGAGAACGTTAACG
GAAATACAAAGTACGGCTGATAGACAAATATTTGAGGAAAAAGTAGGTCCGTTA
GTTGGGAGATTAAGATTGACCGCAAGCTTGAGACAGAATGGTGCAAAAACGGCT
TACAGGGTAAATTTGAAGTTAGACCAAGCTGATGTAGTAGACTGTAGTACGTCA
GTATGTGGGGAATTGCCTAAGGTTAGATATACGCAAGTTTGGAGCCATGATGTTA
CCATAGTAGCTAACTCAACGGAAGCAAGCAGAAAGAGCCTCTATGACCTCACGA
AAAGTTTGGTAGCTACGAGCCAAGTAGAGGACTTGGTAGTAAATTTGGTTCCTTT
AGGCCGTTATGGCTCCAAAACCATCGTTCTTTCGGTCGGCGAGGGTACCCGCACT
CTGACTGAGATCCAGTCCACCGCAGACCGTCAGATCTTCGAAGAGAAGGTCGGG
CCTCTGGTGGGTCGGCTGCGCCTCACGGCTTCGCTCCGTCAAAACGGAGCCAAGA
CCGCGTATCGAGTCAACCTAAAACTGGATCAGGCGGACGTCGTTGATTGCTCCAC
CAGCGTCTGCGGCGAGCTTCCGAAAGTGCGCTACACTCAGGTATGGTCGCACGA
CGTGACAATCGTTGCGAATAGCACCGAGGCCTCGCGCAAATCGTTGTACGATTTG
ACCAAGTCCCTCGTCGCGACCTCGCAGGTCGAAGATCTTGTCGTCAACCTTGTGC
CGCTGGGCCGTTAAGGCCCTGCGGTGTACCCGTGTGTATGGATCCGGCTGCTAAC
AAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCA
TAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAA
CTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAG
TGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTCGGAC
AGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGC
AGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCGCAAGAGG
CCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTG
CCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTT
AGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCA
AACATGAA

Figura 23 d

pDSP7(am)

TTCTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGA
TTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCCGTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCAC
CGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGATCCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCG
TCCAACATCAATACAACCTATTAATTTCCCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGT
GAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAATCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGC
ATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCCAGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACT
CGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCGTGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACG
CGATCGCTGTTAAAAGGACAATTACAAACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGG
AACACTGCCAGCGCATCAACAATATTTTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATA
CCTGGAATGCTGTTTTCCCGGGGATCGCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG
AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGAGGCATAAATTCCGTCAGCCAGTT
TAGTCTGACCATCTCATCTGTAACATCATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCA
GAAACAACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCATACAATCGATAGATTGTCGCACCTGA
TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCATTTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTG
GAATTTAATCGCGGCCTCGAGCAAGACGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATAACAC
CCCTTGTATTACTGTTTATGTAAGCAGACAGTTTTATTGTTCATGACCAAAATCCC
TTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGA
TCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACC
ACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCG
AAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGC
CGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCT
GCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGG
TTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGG
GGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATAC
CTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGAC
AGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCC
AGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT
GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCC
AGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG
CTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGG
AAGCGGAAGAGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATTTC
ACACCGCATATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAA
GCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACAC
CCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTT
ACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTC
ATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCTGCGGTAAAGCTCATCAGCGTGGTCGTGAAG
CTTTTCAAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTA
AATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCA
AAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCA
CTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGC
GATGGCCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCCG
TAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGG
AAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCC
GCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTACTATGGTTGCTTTGACGTCGGCCGCC
ATGCCGGCGATAATGGCCTGCTTCTCGCCGAAACGTTTGGTGGCGGGACCAGTGA

Figura 23 d (cont.)

CGAAGGCTTGAGCGAGGGCGTGCAAGATTCCGAATACCGCAAGCGACAGGCCGA
TCATCGTCGCGCTCCAGCGAAAGCGGTCCTCGCCGAAAATGACCCAGAGCGCTG
CCGGCACCTGTCCTACGAGTTGCATGATAAAGAAGACAGTCATAAGTGCGGCGA
CGATAGTCATGCCCCGCGCCCACCGGAAGGAGCTGACTGGGTTGAAGGCTCTCA
AGGGCATCGGCTCTCCCTTATGCGACTCCTGCATTAGGAAGCAGCCCAGTAGTAG
GTTGAGGCCGTTGAGCACCGCCGCCGCAAGGAATGGTGCATGCAAGGAGATGGC
GCCCAACAGTCCCCCGGCCACGGGGCCTGCCACCATACCCACGCCGAAACAAGC
GCTCATGAGCCCGAAGTGGCGAGCCCGATCTTCCCCATCGGTGATGTCGGCGATA
TAGGCGCCAGCAACCGCACCTGTGGCGCCGGTGATGCCGGCCACGATGCGTCCG
GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGA
GACCACAACGGTTTCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT
ACCATGGCAAAGACGATAGTATTGAGCGTAGGGGAAGCAACGAGAACGTTAACG
GAAATACAAAGTACGGCTGATAGACAAATATTTGAGGAAAAAGTAGGTCCGTTA
GTTGGGAGATTAAGATTGACCGCAAGCTTGAGACAGAATGGTGCAAAAACGGCT
TACAGGGTAAATTTGAAGTTAGACCAAGCTGATGTAGTAGACTGTAGTACGTCA
GTATGTGGGGAATTGCCTAAGGTTAGATATACGCAAGTTTGGAGCCATGATGTTA
CCATAGTAGCTAACTCAACGGAAGCAAGCAGAAAGAGCCTCTATGACCTCACGA
AAAGTTTGGTAGCTACGAGCCAAGTAGAGGACTTGGTAGTAAATTTGGTTCCTTT
AGGCCGTTAGGGCTCCAAAACCATCGTTCTTTCGGTCGGCGAGGGTACCCGCACT
CTGACTGAGATCCAGTCCACCGCAGACCGTCAGATCTTCGAAGAGAAGGTCGGG
CCTCTGGTGGGTCGGCTGCGCCTCACGGCTTCGCTCCGTCAAAACGGAGCCAAGA
CCGCGTATCGAGTCAACCTAAAACTGGATCAGGCGGACGTCGTTGATTGCTCCAC
CAGCGTCTGCGGCGAGCTTCCGAAAGTGCGCTACACTCAGGTATGGTCGCACGA
CGTGACAATCGTTGCGAATAGCACCGAGGCCTCGCGCAAATCGTTGTACGATTTG
ACCAAGTCCCTCGTCGCGACCTCGCAGGTCGAAGATCTTGTCGTCAACCTTGTGC
CGCTGGGCCGTTAAGGCCCTGCGGTGTACCCGTGTGTATGGATCCGGCTGCTAAC
AAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCA
TAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGCTGAAAGGAGGAA
CTATATCCGGATATCCACAGGACGGGTGTGGTCGCCATGATCGCGTAGTCGATAG
TGGCTCCAAGTAGCGAAGCGAGCAGGACTGGGCGGCGGCCAAAGCGGTCGGAC
AGTGCTCCGAGAACGGGTGCGCATAGAAATTGCATCAACGCATATAGCGCTAGC
AGCACGCCATAGTGACTGGCGATGCTGTCGGAATGGACGATATCCCGCAAGAGG
CCCGGCAGTACCGGCATAACCAAGCCTATGCCTACAGCATCCAGGGTGACGGTG
CCGAGGATGACGATGAGCGCATTGTTAGATTTCATACACGGTGCCTGACTGCGTT
AGCAATTTAACTGTGATAAACTACCGCATTAAAGCTTATCGATGATAAGCTGTCA
AACATGAA