

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 256**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 39/245 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2002 PCT/AU2002/00486**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2002 WO02083181**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2002 E 02717851 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.06.2017 EP 1390074**

54 Título: **Composiciones innovadoras y usos de las mismas**

30 Prioridad:

18.04.2001 AU PR446801

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2017

73 Titular/es:

**ADMEDUS VACCINES PTY LTD (100.0%)
Level 3 Translational Research Institute 37 Kent
Street
Woolloongabba, Queensland 4102, AU**

72 Inventor/es:

FRAZER, IAN, HECTOR

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 634 256 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones innovadoras y usos de las mismas

5 Campo de la invención

Las composiciones y métodos para prevenir y tratar una enfermedad o afección se desvelan en la presente memoria. Se describe un método para la fabricación de un medicamento que exhibe una mayor eficacia en aplicaciones profilácticas y terapéuticas. Se describen moléculas que son capaces de inducir la inmunidad tanto
10 humoral como celular y su uso como un medio para provocar dicha inmunidad en un individuo. Se describen métodos para la administración específica a células u orientada selectivamente al tejido de inmunógenos polinucleotídicos y/o polipeptídicos capaces de inducir simultáneamente anticuerpos neutralizantes y respuestas inmunitarias mediadas por células. Las células o tejidos que contienen los polinucleótidos también forman parte de la divulgación. La capacidad para proporcionar composiciones capaces de inducir anticuerpos protectores del
15 hospedador y respuestas inmunitarias mediadas por células facilita la generación de composiciones inmunogénicas capaces de combatir, entre otras cosas, las afecciones que tienen largos periodos de latencia y, por lo tanto, se benefician del doble enfoque de profilaxis y terapia en una administración.

Los detalles bibliográficos de las publicaciones referidas numéricamente en la presente memoria descriptiva se recogen al final de la descripción.

Antecedentes de la invención

Siempre se buscan nuevos enfoques para la intervención en una enfermedad inducida por virus. Se despertó un interés en la adaptación de la terapia génica para su uso en la administración de inmunógenos de ADN a las células y tejidos diana. El éxito en este empeño se ha limitado, no obstante, debido, en parte, a que la administración selectiva de genes a los tejidos diana ha demostrado ser extremadamente difícil, y en parte porque el éxito depende de que se sea capaz de provocar previsiblemente una respuesta de anticuerpos específicos o una respuesta
25 mediada por células o ambas. La respuesta que se desea depende de la naturaleza del problema que se presenta.

Si bien el uso de promotores específicos de tejido para orientar selectivamente la terapia génica ha sido eficaz en algunos modelos animales, se ha demostrado menos en el hombre y los promotores específicos de tejido selectivo no están disponibles para un amplio intervalo de tejidos. Los sistemas de administración génica, tales como vectores no son selectivos del tejido. Los vectores víricos, tales como retrovirus y adenovirus, se pueden utilizar y son en
30 cierta medida selectivos. No obstante, muchos sistemas de vectores son, por su naturaleza, incapaces de producir integrantes estables. Además, algunos también invocan por sí mismos respuestas inmunitarias, impidiendo, de ese modo, la intervención inmunológica predecible y eficaz.

Otra motivo más por el que la terapia génica ha demostrado ser difícil es la imprevisibilidad del tipo de respuesta inmunitaria que puede generarse como resultado de la administración de ADN empaquetado, por cualquier medio, a una célula o tejido. Por ejemplo, se sabe que las vacunas de ADN administradas a la piel tienden a causar la inducción de anticuerpos, mientras que la misma vacuna administrada por vía intramuscular puede favorecer una
40 respuesta celular. En casos en los que la infección por virus se asocia con largos periodos de latencia, tales como es el caso, por ejemplo, con la infección por virus de la inmunodeficiencia humana y virus del herpes simple, puede ser deseable ser capaz de provocar respuestas de ambos brazos del sistema inmunitario para permitir la protección simultánea contra la infección futura y el tratamiento de la infección existente.

Un ejemplo en el que la imprevisibilidad de la respuesta es motivo de inquietud reside en los intentos para superar los efectos de la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Se conocen muchos genotipos de VPH que son
50 antecedentes a la neoplasia anogenital¹; los tumores pueden desarrollarse después de un periodo de latencia de 10 a 30 años. Existe una necesidad, por lo tanto, de descubrir medios para inducir tanto anticuerpos neutralizantes para prevenir la infección por VPH como la inmunidad mediada por células para tratar la infección existente. La inducción de una respuesta inmunitaria mediada por células a genes víricos es deseable tanto para controlar la infección existente como para eliminar particularmente las consecuencias premalignas de la infección por VPH. Zhou *et al* (*Journal of Virology*, 73, 1999, 4972-4982, investigaron los niveles de expresión de la proteína de la cápside del virus del papiloma y se descubrió que la composición de codones puede limitar la traducción génica tardía. Penrose y McBride (*Journal of Virology*, 74, 2000, 6031-6038), mostraron que la degradación mediada por proteasomas de la proteína E2-7A del virus del papiloma está regulada por la fosforilación. Una vacuna, que era capaz de efectuar tanto la inmunidad humoral como celular, constituiría un avance importante en la capacidad de la medicina para
60 intervenir de manera efectiva en tales patologías.

Los recientes intentos para aumentar el nivel de respuesta celular tras la inmunización de ADN han tenido cierto éxito por medio de la conjugación de las secuencias que codifican la proteína celular ubiquitina. Se proporciona la secuencia de una proteína híbrida ubiquitina L1 humanizada en la base de datos n.º de acceso AF 322415 (5 de
65 diciembre de 2000). Además, Bosch *et al* (*Journal of Clinical Pathology*, 54, 2001, 163-175), describieron actualizaciones sobre la investigación del virus del papiloma que incluye el uso de proteínas fusionadas a ubiquitina.

Leachman *et al* (18th International Papillomavirus Conference, Abstract n.º 455, 2000) también describen vacunas de genes tempranos víricos fusionados a ubiquitina. Una proteína Tuberculosis conjugada a ubiquitina se describió adicionalmente en Delogu *et al* (*Infection and Immunity*, 68, 2000, 3097-3102). Velders *et al* (*Journal of Immunology*, 166, 2001, 5366-5373) desvelan una proteína fusionada a ubiquitina e investigaron el efecto de utilizar espaciadores definidos entre epítomos. Bergmann *et al* (*Journal of Immunology*, 157, 1996, 3242-3249) también utilizaron espaciadores vinculantes para optimizar la inmunogenicidad. Astori y Kraehenbuhl (*Molecular Immunology*, 33, 1996, 1017-1024) investigaron múltiples repeticiones de un epítipo T auxiliar.

La inmunización con ADN como una forma de terapia génica es un enfoque relativamente nuevo para la vacunación. En teoría, y a veces en la práctica, el ADN plásmido inoculado entra en la célula y las proteínas codificadas se expresan en la misma. De esta manera, es más probable que se produzca el acceso del antígeno a la vía de presentación del antígeno a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I. En algunos casos, se han mostrado respuestas potenciadas de linfocitos T citotóxicos (LTC) tras la ubiquitinación^{31,32}. No obstante, la ubiquitinación es conocida por no potenciar la inmunogenicidad de todas las vacunas polinucleotídicas³⁵. Además, el aumento de la respuesta de LTC se realiza a veces a expensas de la inmunogenicidad y la producción de anticuerpos neutralizantes³³. Li *et al* (*Infection and Immunity*, 67, 1999, 4780-4786) investigaron la inmunogenicidad de vacunas de ADN contra Tuberculosis fusionadas a secuencias del activador del plasminógeno tisular.

Además, los presentes inventores han demostrado previamente que la principal proteína de la cápside L1 de VPH puede autoensamblarse en partículas similares a virus (PSVs)³. Utilizadas como una vacuna, las PSV provocan anticuerpos neutralizantes protectores del hospedador dependientes de conformación⁴. No obstante, la infección por virus del papiloma (VP) suele ser persistente, y el 20-50 % de los individuos infectados por VPH no desarrollan inmunidad específica del VP⁵⁻⁷, lo que sugiere que la infección por VP se detecta deficientemente por el sistema inmunitario⁸. Se ha demostrado que los genes de la cápside de VPH tienen un uso de codones sub-óptimo para la expresión en células de mamíferos¹².

Sumario de la invención

Una innovadora estrategia para elevar una respuesta inmunitaria más eficaz contra un antígeno diana se desvela en la presente memoria. La estrategia implica el uso de (i) un primer antígeno correspondiente al antígeno diana, junto con (ii) un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno. Como se describe más completamente en lo sucesivo, la presente estrategia se utiliza ventajosamente para obtener simultáneamente niveles profilácticos y/o terapéuticos de las respuestas humorales y celulares contra un antígeno de interés para combatir, entre otras cosas, las afecciones que tienen periodos de latencia y, por lo tanto, se benefician del doble enfoque de profilaxis y terapia.

Se desvela una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende un primer antígeno que corresponde al antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno, o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno.

Se desvela además una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende al menos un polinucleótido a partir del cual se expresa un primer antígeno correspondiente al antígeno diana y un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, mejora o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

Se desvela adicionalmente una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende un primer antígeno que corresponde al antígeno diana y un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

Se describe una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende un primer antígeno que corresponde al antígeno diana y un polinucleótido a partir del cual se expresa un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

Se describe asimismo una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende un polinucleótido a partir del cual se expresa un primer antígeno que corresponde al antígeno diana, junto con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

La degradación proteolítica intracelular puede ser mediada por proteasomas.

La degradación proteolítica intracelular puede ser mediada por ubiquitinas.

5 El segundo antígeno puede comprender, o asociarse de otro modo con una señal de degradación intracelular o
degrón. La señal de degradación intracelular puede comprender un aminoácido desestabilizador en el extremo
amino terminal del segundo antígeno. El aminoácido desestabilizador puede seleccionarse entre isoleucina y ácido
glutámico, o entre histidina, tirosina y glutamina, o entre ácido aspártico, asparagina, fenilalanina, leucina, triptófano
y lisina. El aminoácido desestabilizador puede ser arginina. El segundo antígeno puede fusionarse o conjugarse de
10 otro modo a una entidad de enmascaramiento, que enmascara dicho extremo amino terminal de modo que cuando
se desenmascara el segundo antígeno exhibirá la velocidad deseada de degradación proteolítica intracelular. De
forma adecuada, la entidad de enmascaramiento es una secuencia de proteínas de enmascaramiento. La secuencia
de proteínas de enmascaramiento puede escindirse por una endoproteasa, que es adecuadamente una
15 endoproteasa endógena de una célula de mamífero. Por ejemplo, un sitio de escisión por endoproteasas puede
interponerse entre la secuencia de proteínas de enmascaramiento y el segundo antígeno. Endoproteasas
adecuadas incluyen, entre otras, endoproteasas de serina (p. ej., subtilisinas y furinas), endopeptidasas
proteasomales, proteasas relacionadas con la vía de procesamiento a través del CMH clase I y las peptidasas señal.
La secuencia de proteínas de enmascaramiento puede comprender una secuencia de péptido señal. Secuencias de
20 péptidos señal adecuadas se describen, por ejemplo, por Nothwehr *et al.* (1990., *Bioessays* 12 (10): 479-484), Izard,
et al. (1994, *Mol. Microbiol.* 13 (5): 765-773), Menne, *et al.* (2000, *Bioinformatics* 16 (8): 741-742) y Ladunga (2000,
Curr. Opin. Biotechnol. 11 (1): 13-18).

Alternativamente o además, la señal de degradación intracelular comprende un aceptor de ubiquitina, que permite la
unión de ubiquitina por las enzimas intracelulares, que se orientan selectivamente al segundo antígeno para la
25 degradación por medio de la vía ubiquitina-proteosoma. Adecuadamente, el aceptor de ubiquitina es una molécula
que contiene un residuo apropiadamente posicionado en el extremo amino terminal del segundo antígeno para que
sea capaz de unirse por las moléculas de ubiquitina. Tales residuos tienen preferentemente un grupo amino épsilon,
tal como lisina. El aceptor de ubiquitina puede comprender al menos uno, preferentemente al menos dos, más
preferentemente al menos cuatro y aún más preferentemente al menos seis residuos de lisina, que están
30 adecuadamente presentes en una región suficientemente de forma segmentalmente móvil del segundo antígeno.

La señal de degradación intracelular puede comprender una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la
misma. La ubiquitina o fragmento biológicamente activo de la misma se pueden fusionar, o conjugarse de otro modo,
con el segundo antígeno. Adecuadamente, la ubiquitina es de origen mamífero, por ejemplo de origen humano u otro
35 primate. La ubiquitina puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. Además, la ubiquitina puede
comprender dos o más copias de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

El antígeno diana es adecuadamente refractario o resistente a la escisión proteolítica intracelular, que puede
asociarse con una mala respuesta o de otro modo una respuesta ineficaz de linfocitos T citotóxicos (LTC). El
40 antígeno diana puede corresponder a al menos una porción de una proteína en la que se desea una respuesta
inmunitaria. El antígeno diana puede corresponder a al menos una porción de una proteína estructural.
Adecuadamente, la proteína estructural es una proteína de un organismo patógeno (p. ej., vírico, bacteriano, fúngico,
protozoario). La proteína estructural puede ser una proteína vírica, p. ej., una proteína de la cápside o capsómero.
La proteína de la cápside vírica puede ser una proteína de la cápside de un virus cristalino. Ejemplos de proteínas
45 de la cápside vírica adecuados incluyen, entre otros, proteínas L1 y/o L2 de virus del papiloma, proteínas de la
cápside de un virus del herpes (p. ej., GpD y GpB), VP1-3 de poliomavirus, VP1-6 del virus de la lengua azul,
antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno de superficie de la hepatitis C, proteínas de la cápside de
parvovirus, proteínas de la cápside de las partículas de levadura Ty, proteínas de la cápside de retrovirus (p. ej., VIH
y VSR), proteínas de la cápside de rotavirus, proteínas de la cápside de coronavirus, y proteínas de la cápside de
50 adenovirus. La proteína de la cápside puede ser una proteína de la cápside del virus del papiloma (VP). La proteína
de la cápside del VP se selecciona adecuadamente entre proteínas de la cápside L1 y L2.

La composición puede comprender además un adyuvante. El adyuvante puede administrar los antígenos,
preferentemente el segundo antígeno, a la vía a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I. Por
ejemplo, tales adyuvantes incluyen, entre otros, compuestos que contienen saponina (p. ej., ISCOMs) y citolisinas,
que median la administración de antígenos al citosol de una célula diana. La citolisina puede vincularse o asociarse
de otro modo con uno de dichos antígenos o los dos. La citolisina puede mediar la transferencia de los antígenos
desde la vacuola (p. ej., fagosoma o endosoma) al citosol de la célula diana y la citolisina puede ser una listeriolisina.

60 Se desvela una composición de ácidos nucleicos para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra
un antígeno diana, que comprende:

- un primer polinucleótido que codifica un primer antígeno que corresponde al antígeno diana; y

- un segundo polinucleótido que codifica un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno;

5 en la que dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido se vinculan operativamente a un polinucleótido regulador.

Se desvela además una composición de ácidos nucleicos para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende:

- 10
- un primer polinucleótido que codifica un primer antígeno que corresponde al antígeno diana; y
 - un segundo polinucleótido que codifica un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno;
- 15

en la que dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido se vinculan operativamente a diferentes polinucleótidos reguladores.

20 Se desvela adicionalmente una composición de ácidos nucleicos para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende:

- una construcción sintética que comprende un primer polinucleótido, que codifica un primer antígeno correspondiente al antígeno diana, y que se vincula operativamente a un polinucleótido regulador; y
- 25 - otra construcción sintética que comprende un segundo polinucleótido que codifica un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno, en el que dicho segundo polinucleótido se vincula operativamente a un polinucleótido regulador.

30 El segundo polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. Así, el segundo polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula cadena abajo y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. Alternativamente, el segundo polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula cadena arriba y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la ubiquitina puede comprender la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

35

40

Se desvela un segundo polinucleótido que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno, que corresponde al antígeno diana, y que se modifica para incluir un aminoácido desestabilizador en su extremo amino terminal, en el que dicha primera secuencia de ácidos nucleicos se vincula cadena abajo y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de proteínas de enmascaramiento.

45

El primer polinucleótido y/o el segundo polinucleótido pueden ser optimizados por codones para permitir una expresión superior de un antígeno así codificado en una célula diana.

50

El primer polinucleótido y/o el segundo polinucleótido pueden ser optimizados por codones para permitir una expresión superior del antígeno así codificado en una célula diana que en otra célula.

La composición de ácidos nucleicos puede comprender opcionalmente un portador y/o un diluyente o un adyuvante farmacéuticamente aceptables como se ha descrito a grandes rasgos previamente.

55

Las composiciones de ácidos nucleicos descritas a grandes rasgos previamente pueden encontrarse en forma de una o más construcciones sintéticas.

60 Se desvela una célula hospedadora que contiene la construcción sintética o un sistema de construcción sintética como se ha descrito a grandes rasgos previamente.

Se desvela un método de provocación de una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende:

65

- poner en contacto al menos una célula receptora con una composición que comprende un primer antígeno que corresponde al antígeno diana y un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno,

por lo que dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno se expresan conjuntamente en la misma célula receptora o se expresan por separado en diferentes células receptoras.

Se desvela asimismo un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende:

- poner en contacto al menos una célula receptora con una composición de ácidos nucleicos como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, por lo que dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno se expresan conjuntamente en la misma célula receptora o se expresan por separado en diferentes células receptoras.

Adecuadamente, la composición de ácidos nucleicos se produce:

- optimizando la composición de codones de un polinucleótido parental que codifica un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en el primer antígeno y el segundo antígeno para construir un polinucleótido optimizado por codones mediante el cual la expresión del antígeno a partir del polinucleótido optimizado por codones en al menos dicha célula receptora se aumenta, potencia o de otro modo eleva con relación a la de dicho polinucleótido parental.

La composición de codones puede optimizarse:

- seleccionando un primer codón del polinucleótido parental para reemplazarlo con un codón sinónimo, en el que el primer codón se selecciona sobre la base que tiene una eficacia de traducción superior a la de dicho codón sinónimo en al menos dicha célula receptora, y

- reemplazando dicho primer codón con dicho codón sinónimo para construir dicho polinucleótido optimizado por codones.

Alternativamente, la composición de codones puede optimizarse de manera que el antígeno se exprese en un nivel superior en dicha célula receptora que en otra celda. Por ejemplo, la composición de codones puede optimizarse:

- seleccionando un primer codón del polinucleótido parental para reemplazarlo con un codón sinónimo que tiene una eficacia de traducción superior en dicha célula receptora que en otra célula; y

- reemplazando dicho primer codón con dicho codón sinónimo para formar dicho polinucleótido optimizado por codones.

La célula o células receptoras, que están en contacto con la composición, pueden ser una célula o células presentadora de antígeno, que se seleccionan adecuadamente entre una célula dendrítica, un macrófago o una célula B.

Se desvela una composición de materia para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con un primer antígeno que corresponde al antígeno diana o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, y con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho primer antígeno, y una forma procesada de dicho segundo antígeno, para su presentación a las células T y modulación de las mismas.

Adecuadamente, la composición de materia comprende además un adyuvante.

Adecuadamente, las células T son linfocitos T citotóxicos (LTCs).

Se describe un método de administración de un antígeno a las células presentadoras de antígeno para la producción de células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno útiles para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, comprendiendo dicho método:

- la puesta en contacto de células presentadoras de antígeno con un primer antígeno que corresponde al antígeno diana o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno y con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o con un polinucleótido a partir del

cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho primer antígeno y una forma procesada de dicho segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dichos antígenos se internalicen por las células presentadoras de antígeno.

5 Las células presentadoras de antígeno pueden ponerse en contacto *in vivo* o *in vitro* y se seleccionan adecuadamente entre células dendríticas, macrófagos y células B. Las células presentadoras de antígeno pueden ser células dendríticas.

10 Se describe un método de producción de células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende:

- la puesta en contacto de células presentadoras de antígeno con un primer antígeno que corresponde al antígeno diana o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, y con un segundo antígeno que
15 corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho primer antígeno y una forma procesada de dicho segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dichos antígenos se internalicen por las células presentadoras de
20 antígeno; y
- el cultivo de las células presentadoras de antígeno durante un tiempo y en condiciones suficientes para que dicho primer y dicho segundo antígenos se procesen para la presentación por las células presentadoras de antígeno.

25 El método anterior puede comprender además el aislamiento de las células presentadoras de antígeno de una población heterogénea de células.

Se describe un método para modular una respuesta inmunitaria, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una composición como se ha descrito a grandes rasgos previamente.

30 Se desvela un método para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de una composición como se ha descrito a grandes rasgos previamente.

35 Se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende coadministrar a un paciente:

- un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno; y
- 40 - un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en el que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, mejora o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno.

También se describe un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende coadministrar a un paciente:

- un polinucleótido a partir del cual se expresa un primer antígeno, que corresponde al antígeno diana; y
- un polinucleótido a partir del cual se expresa un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en el que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta,
50 potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

Se describe además un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende coadministrar a un paciente:

- un primer antígeno que corresponde al antígeno diana; y
- un polinucleótido a partir del cual se expresa un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en el que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta,
potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

60 Se desvela un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende coadministrar a un paciente:

- un polinucleótido a partir del cual se expresa un primer antígeno, que corresponde al antígeno diana; y
- un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en el que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en
65 relación con el primer antígeno.

También se desvela un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende coadministrar a un paciente:

- células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho primer antígeno para su presentación a las células T y modulación de las mismas; y
- células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho segundo antígeno para su presentación a las células T y modulación de las mismas,

en el que las células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con el primer antígeno y las células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con el segundo antígeno pueden ser idénticas o diferentes.

Se desvela un método para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende coadministrar a un paciente:

- células presentadoras de antígeno que se han puesto en contacto con un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho primer antígeno y una forma procesada de dicho segundo antígeno para su presentación a las células T y modulación de las mismas.

Se desvela asimismo el uso de un primer antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un antígeno diana, dicho primer antígeno correspondiente al antígeno diana y dicho segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, en el que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno.

Se desvela además el uso de un primer antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con células presentadoras de antígeno, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un antígeno diana, en el que dicho primer antígeno corresponde al antígeno diana y en el que dichas células presentadoras de antígeno se han expuesto a un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho segundo antígeno para su presentación a las células T y modulación de las mismas.

Se desvela asimismo el uso de células presentadoras de antígeno en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un antígeno diana, en el que dichas células presentadoras de antígeno se han expuesto a un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o a un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o con un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho primer antígeno y una forma procesada de dicho segundo antígeno para su presentación a las células T y modulación de las mismas.

Se desvela el uso del polipéptido sintético, el polinucleótido sintético y la construcción sintética como se ha descrito a grandes rasgos previamente en el estudio y la modulación de respuestas inmunitarias.

En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende un primer antígeno que corresponde a un antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, y que es un derivado del primer antígeno, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en la que el segundo antígeno comprende una señal de degradación intracelular que comprende una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma, en la que el primer antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria humoral al antígeno diana, en la que el segundo antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria celular al antígeno diana, y en la que dicha composición es adecuada para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra el antígeno diana.

La presente invención proporciona además una célula hospedadora que comprende la composición descrita anteriormente.

Además, la invención proporciona un método de producción de una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, comprendiendo el método la combinación de un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, con un segundo antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en el que el segundo antígeno corresponde a una forma modificada del antígeno diana y es un derivado del primer antígeno y en el que el segundo antígeno comprende una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma, en el que el primer antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria humoral al antígeno diana y el segundo antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria celular al antígeno diana.

La presente invención también proporciona una composición que se ha descrito anteriormente para su uso como un medicamento y para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de una composición como se ha descrito previamente, en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana o modular una respuesta inmunitaria, por lo que, en la administración, dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno se expresan conjuntamente en la misma célula receptora o se expresan por separado en diferentes células receptoras.

La invención también contempla el uso de una composición como se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta humoral y celular contra un antígeno diana.

La invención proporciona además el uso de un primer antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho primer antígeno en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra dicho antígeno diana, en el que dicho medicamento es para la coadministración con un segundo antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho segundo antígeno. Alternativamente, la invención proporciona el uso de un segundo antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho segundo antígeno en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra dicho antígeno diana, en el que dicho medicamento es para la coadministración con un primer antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho primer antígeno.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una representación gráfica que muestra la inmunogenicidad de HPV6L1 modificado y no modificado con codones. Los gráficos a y b muestran la reactividad de sueros de ratones inmunizados con (■) L1 de pH6L1Δ modificado con codones, única inmunización, o (▼) L1 (pH6L1Δ) modificado con codones, doble inmunización, o (●) L1 (p6L1Δ) no modificado con codones, doble inmunización con (a) PSVs de HPV6bL1 (anticuerpo conformacional) o (b) L1 de HPV6b desnaturalizado (anticuerpo lineal); los gráficos c y d muestran la reactividad de sueros de ratones inmunizados con (■) L1E7.1 de HPV6b modificado con codones, (A) L1-E7.2 de HPV6b modificado con codones, (◆) L1 de HPV6b-HPV16E7 modificado con codones o (▼) L1 de HPV6b de secuencia nativa con (c) PSVs de L1 de HPV6b (anticuerpo conformacional), o (d) L1 de HPV6b desnaturalizado (anticuerpo lineal). Todos los resultados son medias $\pm$ E.E.M. de grupos de 5 ratones. El gráfico e muestra la reactividad de sueros de ratones inmunizados con p6HL116E7 (■▲), pU6HL116E7 conjugado con ubiquitina (▼◆) o pCDNA3 (●□) contra PSVs nativas (■▼●) o L1 desnaturalizado (▲◆□). El gráfico f muestra la reactividad de suero en HPV6b E7 recombinante de ratones inmunizados con pH6L1E7.1 (carril 1,4), pH6L1E7.2 (carril 2,5), o p6L1Δ (carril 3,6). Carril 1-3: lisado de células Cos-1 transfectadas con pCDNAE7. Carril 4-6: lisado de células Cos-1.

La Figura 2 es una representación gráfica que muestra la inmunidad mediada por células en L1 inducida por vacunas polinucleotídicas. El gráfico a muestra respuestas de HTR cutánea en L1 medidas en grupos de ratones inmunizados con pH6L1Δ modificado con codones, o H6L1E7.1 o .2 quimérico modificado con codones, con p6L1 o p6L1Δ no modificado, o con el vector pCDNA3. El gráfico b ilustra el IFN γ específico del epítipo de LTC de HPV 16E7 secretado por precursores de células T de ganglios linfáticos en ratones C57BL/6 inmunizados con pCDNA3, HPV6L1-HPV16E7 (pH6L1E7) modificado con codones o ADN de HPV6L1-HPV16E7 (pUH6L1E7) modificado con codones y conjugado con ubiquitina. Se muestra la media de triplicados $\pm$ 1 D.E. El gráfico c muestra la protección contra el crecimiento subcutáneo de E7 que expresa tumores TC-1 en ratones inmunizados con pCDNA3, pH6L116E7 (ensayo t apareado, $P < 0,01$, pH6L116E7 frente a pUH6L116E7), o ADN de pUH6L116E7 (ensayo t apareado, $P < 0,01$, pCDNA3 frente a pUH6L116E7).

La Figura 3 es una representación gráfica que ilustra la inducción de anticuerpos neutralizantes y células T CD8+ por una vacuna polinucleotídica mixta que comprende HPV6bL116E7 conjugado y no conjugado con ubiquitina. a. IFN γ específico del epítipo de LTC de HPV 16E7 secretado por precursores de células T de ganglios linfáticos (L) o bazo (S) en ratones C57BL/6 inmunizados con una mezcla de HPV6L1-HPV16E7 modificado con codones y (mezcla) o un control de ADN de HPV6L1-HPV16E7 modificado con codones y conjugado con ubiquitina.

La Figura 4 es una representación fotográfica de una placa que muestra la inhibición de la aglutinación inducida por L1 de HPV6 de eritrocitos de ratón por sueros de ratones inmunizados con ADN de L1 de HPV6b modificado o no modificado con codones. Las diluciones en serie (1:100-1:12.800) de sueros de ratones inmunizados con genes L1 modificados con codones; A: pH6L1 Δ , una inmunización; B: pH6L1 Δ , dos inmunizaciones; C: pH6L1E7.1; D: pH6L1E7.2, aglutinación inhibida, mientras que el gen no modificado (E: p6L1 Δ) no indujo anticuerpo inhibidor alguno. El anticuerpo de conejo anti-L1 de HPV6 (F) se utilizó como control positivo.

La Figura 5 es una representación gráfica que muestra la inmunogenicidad de L2 de BPV1 modificado y no modificado con codones. Los grupos de ratones C57BL/6 se inmunizaron con reactividad específica para HBL2E7 (■); HBL2 (▲); L2E7 (▼); L2 (◆) y L2 medida por ELISA. Los resultados se muestran como la reactividad media $\pm$ 1 D:E.

Breve descripción de las secuencias: CUADRO SINÓPTICO

TABLA A

SECUENCIA ID	DESCRIPCIÓN	LONGITUD
SEQ ID NO: 1	secuencia codificante (CDS) de ubiquitina humana, 1 copia	231 nts
SEQ ID NO: 2	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 1	76 aa
SEQ ID NO: 3	CDS (L1) de la proteína L1 de tipo natural del VPH tipo 6b como se expone en el n.º de acceso a GenBank NC_001355	1.503 nts
SEQ ID NO: 4	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 3	500 aa
SEQ ID NO: 5	CDS (L1) de la proteína L1 humanizada del VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF322411	1.503 nts
SEQ ID NO: 6	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 5	500 aa
SEQ ID NO: 7	CDS (L1) de la proteína L1 All truncada de tipo natural de VPH tipo 6b con construcción sintética	1.404 nts
SEQ ID NO: 8	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 7	467 aa
SEQ ID NO: 9	CDS (L1) de la proteína L1 truncada humanizada de VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF322412	1.404 nts
SEQ ID NO: 10	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 9	467 aa
SEQ ID NO: 11	CDS de la proteína híbrida L1/E7.1 humanizada de VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF322413	1.554 nts
SEQ ID NO: 12	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 11	517 aa
SEQ ID NO: 13	CDS de la proteína híbrida L1/E7.2 humanizada de VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF322414	1.554 nts
SEQ ID NO: 14	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 13	517 aa
SEQ ID NO: 15	CDS de la proteína híbrida L1/ubiquitina humanizada de VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF322415	1.728 nts
SEQ ID NO: 16	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 15	575 aa
SEQ ID NO: 17	CDS de la proteína híbrida del epítipo LTC ubiquitina/L1 delta/H-2Db humanizada de VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF323508	1.677 nts
SEQ ID NO: 18	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 17	558 aa
SEQ ID NO: 19	CDS de la proteína híbrida del epítipo LTC L1 delta/H-2Db humanizada de VPH tipo 6b con construcción sintética como se expone en el n.º de acceso a GenBank AF323509	1.452 nts
SEQ ID NO: 20	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 19	483 aa
SEQ ID NO: 21	CDS (L2) de la proteína L2 de tipo natural de BPV tipo 1 como se expone en el n.º de acceso a GenBank X01768	1.404 nts
SEQ ID NO: 22	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 21	467 aa
SEQ ID NO: 23	CDS (L2) de la proteína L2 humanizada de BPV tipo 1 con construcción sintética	1.410 nts
SEQ ID NO: 24	Polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 23	469 aa

Descripción detallada de la invención

En particular, la presente invención proporciona una composición que comprende un primer antígeno que corresponde a un antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, y que es un derivado del primer antígeno, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en la que el segundo antígeno comprende una señal de degradación intracelular que comprende una ubiquitina o fragmento biológicamente activo de la misma, en la que el primer antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria humoral al antígeno diana, en la que el segundo antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria celular al antígeno diana, y en la que dicha composición es adecuada para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra el antígeno diana.

La presente invención proporciona además una célula hospedadora que comprende la composición descrita anteriormente.

Además, la invención proporciona un método de producción de una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, comprendiendo el método la combinación de un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, con un segundo antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en el que el segundo antígeno corresponde a una forma modificada del antígeno diana y es un derivado del primer antígeno y en el que el segundo antígeno comprende una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma, en el que el primer antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria humoral al antígeno diana y el segundo antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria celular al antígeno diana.

La presente invención también proporciona una composición que se ha descrito anteriormente para su uso como un medicamento y para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana.

Adicionalmente, la presente invención proporciona el uso de una composición que se ha descrito anteriormente, en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana o modular una respuesta inmunitaria, por lo que, en la administración, dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno se expresan conjuntamente en la misma célula receptora o se expresan por separado en diferentes células receptoras.

La invención también proporciona el uso de una composición que se ha descrito anteriormente en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta humoral y celular contra un antígeno diana.

La invención proporciona además el uso de un primer antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho primer antígeno en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra dicho antígeno diana, en el que dicho medicamento es para la coadministración con un segundo antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho segundo antígeno. Alternativamente, la invención proporciona el uso de un segundo antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho segundo antígeno en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra dicho antígeno diana, en el que dicho medicamento es para la coadministración con un primer antígeno como se define en la composición anterior o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho primer antígeno.

1. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por los expertos en la materia a la que pertenece la invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden utilizarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales preferentes. Para los fines de la presente invención, se definen a continuación los siguientes términos.

Los artículos "*un*" y "*una*" se utilizan en la presente memoria para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

El término "*aproximadamente*" se utiliza en la presente memoria para referirse a condiciones (p. ej., cantidades, concentraciones, tiempo, etc.) que varían hasta en un 30 %, preferentemente hasta en un 20 %, y más preferentemente hasta en un 10 % en relación con una condición especificada.

Las expresiones "*administración simultánea*" o "*administrar simultáneamente*" o "*coadministración*" y similares se refieren a la administración de una única composición que contiene dos o más activos, o la administración de cada

activo como composiciones separadas y/o administradas por vías separadas ya sea simultáneamente o secuencialmente en un periodo de tiempo lo suficientemente breve cuyo resultado efectivo sea equivalente al obtenido cuando se administran todos los activos de este tipo como una única composición.

- 5 Por "*molécula de unión al antígeno*" se entiende una molécula que tiene una afinidad de unión para un antígeno diana. Se entenderá que este término se extiende a inmunoglobulinas, fragmentos de inmunoglobulina y armazones de proteínas derivados de no inmunoglobulinas que exhiben actividad de unión al antígeno.

Por "*autólogo*" se entiende algo (p. ej., células, tejidos, etc.) derivado del mismo organismo.

- 10 El término "*alogénico*", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a células, tejidos, organismos, etc. que poseen diferente constitución genética aunque se derive de la misma especie.

- 15 Por "*fragmento biológicamente activo*" se entiende un fragmento de un polipéptido parental de longitud completa cuyo fragmento conserva la actividad del polipéptido parental. Por ejemplo, un fragmento biológicamente activo de la ubiquitina cuando se conjuga con un antígeno de interés aumentará, potenciará o de otro modo elevará la velocidad de degradación proteolítica intracelular de ese antígeno. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*fragmento biológicamente activo*" incluye mutantes de delección y pequeños péptidos, por ejemplo de al menos 8, preferentemente al menos 10, más preferentemente al menos 15, incluso más preferentemente al menos 20 e
20 incluso más preferentemente al menos 30 aminoácidos contiguos, que comprenden la actividad anterior. Los péptidos de este tipo se pueden obtener mediante la aplicación de técnicas recombinantes o de sintetización convencionales de ácidos nucleicos utilizando técnicas de síntesis en fase líquida o sólida convencionales. Por ejemplo, puede hacerse referencia a la síntesis de solución o síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el capítulo 9 titulado "*Peptide Synthesis*" de Atherton y Shephard, que se incluye en una publicación titulada
25 "*Synthetic Vaccines*", editado por Nicholson y publicado por Blackwell Scientific Publications. Alternativamente, los péptidos pueden producirse por la digestión de un polipéptido utilizado en la invención con proteinasas, tales como endoLys-C, endoArg-C, endoGlu-C y proteasa V8 de *Staphylococcus*. Los fragmentos digeridos pueden purificarse, por ejemplo, por técnicas de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC).

- 30 Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "*secuencia que actúa en cis o región reguladora de cis*" o expresión similar se tomará para referirse a cualquier secuencia de nucleótidos que se deriva de una secuencia genética expresable en la que la expresión de la secuencia genética se regula, al menos, en parte, por dicha secuencia de nucleótidos. Los expertos en la materia serán conscientes de que una región reguladora de *cis* puede ser capaz de activar, silenciar, potenciar, reprimir o de otro modo alterar el nivel de expresión y/o especificidad de
35 tipo celular y/o especificidad de desarrollo de cualquier secuencia genética estructural.

- A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto sugiera lo contrario, las palabras "*comprende*", y "*que comprende*" se entenderán como la implicación de la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos indicados, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o
40 elementos.

- Por "*corresponde a*" o "*correspondiente a*" se entiende un polinucleótido (a) que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica o complementaria a la totalidad o parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia o (b) que codifica una secuencia de aminoácidos idéntica a una secuencia de aminoácidos en un péptido
45 o proteína. Esta frase también incluye dentro de su alcance un péptido o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una secuencia de aminoácidos en un péptido o proteína de referencia.

- Por "*derivado*" se entiende un polipéptido que se ha derivado de la secuencia básica mediante la modificación, por ejemplo, mediante conjugación o formación de complejos con otras mitades químicas o mediante técnicas de modificación post-traduccionales, como se entenderá en la materia. El término "*derivado*" también incluye dentro de su alcance las alteraciones que se han realizado en una secuencia parental que incluye adiciones, o delecciones que proporcionan moléculas funcionalmente equivalentes.

- 55 Por "*cantidad eficaz*", en el contexto de tratar, prevenir o mejorar los síntomas de una afección, se entiende la administración de esa cantidad de la composición inmunopotenciadora o compuesto activo que provoca una respuesta inmunitaria en un individuo en necesidad de dicho tratamiento, prevención o mejora, ya sea en una dosis única o como parte de una serie, que es eficaz para el tratamiento de esa afección. La cantidad eficaz variará dependiendo de la salud y condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar, la formulación de la composición, la evaluación de la situación médica, y otros factores relevantes. Se espera que la
60 cantidad caiga en un intervalo relativamente amplio que puede determinarse mediante experimentos rutinarios.

- Por "*expresar*", y términos similares, tales como "*expresión*" y "*expresable*", en el contexto o expresión de proteínas, se entiende la expresión de una proteína a un nivel suficiente para efectuar una función particular asociada con la
65 proteína.

Por "*expresar dicho polinucleótido*" se entiende la transcripción del polinucleótido de manera tal que se produce ARNm.

Por "*vector de expresión*" se entiende cualquier elemento genético autónomo capaz de dirigir la síntesis de una proteína codificada por el vector. Tales vectores de expresión son conocidos por los profesionales en la materia.

El término "*gen*" se utiliza en su contexto más amplio para incluir una región de ADN genómico correspondiente al gen, así como una secuencia de ADNc correspondiente a exones o una molécula recombinante modificada por ingeniería genética para codificar una forma funcional de un producto.

"*Homología*" se refiere al número de porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras como se define en la Tabla B *infra*. La homología puede determinarse utilizando programas de comparación de secuencias, tales como GAP (Deveraux *et al.* 1984). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente de las citadas en la presente memoria pueden compararse por inserción de huecos en el alineamiento, siendo tales huecos determinados, por ejemplo, por el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

Potenciar la respuesta inmunitaria ("reforzamiento inmunológico"), como se conoce adecuadamente en la materia, significa aumentar la capacidad del animal para responder a antígenos exógenos o específicos de la enfermedad (p. ej., antígenos víricos, antígenos de cáncer) es decir, aquellas células sensibilizadas para atacar tales antígenos se aumentan en número, actividad y capacidad para detectar y destruir aquellos antígenos. La fuerza de la respuesta inmunitaria se mide mediante ensayos convencionales, incluyendo: medición directa de los linfocitos de sangre periférica por medios conocidos en la materia; ensayos de citotoxicidad de linfocito citolítico natural (véase, p. ej., Provinciali *et al.* (1992, *J. Immunol Meth.* 155: 19-24), ensayos de proliferación celular (véase, p. ej., Vollenweider y Groseurth (1992, *J. Immunol Meth.* 149: 133-135), inmunoensayos de células inmunitarias y subconjuntos (véase, p. ej., Loeffler *et al.* (1992, *Cytom.* 13: 169-174); Rivoltini *et al.* (1992, *Can. Immunol. Immunother.* 34: 241-251), o ensayos cutáneos para la inmunidad mediada por células (véase, p. ej., Chang *et al.* (1993, *Cancer Res.* 53 1043-1050). Cualquier aumento estadísticamente significativo de la fuerza de la respuesta inmunitaria como se mide por los ensayos anteriores se considera "respuesta inmunitaria potenciada" "reforzamiento inmunológico" o "inmunopotenciación" como se utiliza en la presente memoria. La respuesta inmunitaria potenciada también se indica por manifestaciones físicas, tales como fiebre e inflamación, así como la curación de infecciones sistémicas y locales, y la reducción de los síntomas de la enfermedad, es decir, disminución en el tamaño del tumor, alivio de los síntomas de una enfermedad o afección, incluyendo, entre otros, lepra, tuberculosis, malaria, úlceras aftosas, verrugas herpéticas y papilomatosas, gingivitis, aterosclerosis, concomitantes del SIDA, tales como sarcoma de Kaposi, infecciones bronquiales, y similares. Tales manifestaciones físicas también definen la "respuesta inmunitaria potenciada" "reforzamiento inmunológico" o "inmunopotenciación", como se utiliza en la presente memoria.

La referencia en la presente memoria a "*inmunointeractivo*" incluye la referencia a cualquier interacción, reacción, u otra forma de asociación entre las moléculas y, en particular, en el que una de las moléculas es, o imita, un componente del sistema inmunitario.

Por "*aislado*" significa un material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo.

Por "*modular*" se entiende aumentar o disminuir, ya sea directa o indirectamente, el nivel y/o actividad funcional de una molécula diana. Por ejemplo, un agente puede modular indirectamente dicho nivel/actividad mediante la interacción con una molécula distinta de la molécula diana. A este respecto, la modulación indirecta de un gen que codifica un polipéptido diana incluye dentro de su alcance una modulación de la expresión de una primera molécula de ácidos nucleicos, en la que un producto de expresión de la primera molécula de ácidos nucleicos modula la expresión de una molécula de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido diana.

La expresión "*región 5' no codificante*" se utiliza en la presente memoria en su contexto más amplio para incluir todas las secuencias de nucleótidos que se derivan de la región cadena arriba de un gen expresable, distintas de aquellas secuencias que codifican residuos de aminoácidos que comprenden el producto polipeptídico de dicho gen, en el que la que región 5' no codificante confiere o activa o de otro modo facilita, al menos, en parte, la expresión del gen.

El término "*oligonucleótido*", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polímero compuesto de una multiplicidad de unidades de nucleótidos (desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de las mismas) vinculadas por medio de enlaces fosfodiéster (o variantes estructurales relacionadas o análogos sintéticos de las mismas). De este modo, si bien el término "oligonucleótido" se refiere normalmente a un polímero de nucleótidos en el que los nucleótidos y enlaces entre ellos son de origen natural, se entenderá que el término también incluye dentro de su alcance varios análogos que incluyen, entre otros, ácidos nucleicos peptídicos (ANPs), fosforamidatos, fosforotioatos, fosfonatos de metilo, ácidos ribonucleicos 2-O-metilo, y similares. El tamaño exacto de la molécula puede variar dependiendo de la aplicación particular. Un oligonucleótido posee normalmente una longitud bastante corta, generalmente de aproximadamente 10 a 30

nucleótidos, pero el término puede referirse a moléculas de cualquier longitud, aunque el término "polinucleótido" o "ácidos nucleicos" se utilice normalmente para grandes oligonucleótidos.

La expresión "*conectado de forma operable*" o "*vinculado operativamente*", como se utiliza en la presente memoria, significa colocar un gen estructural bajo el control regulador de un promotor, que luego controla la transcripción y opcionalmente la traducción del gen. En la construcción del promotor heterólogo/combinaciones génicas estructurales, se prefiere generalmente posicionar la secuencia genética o promotor a una distancia del sitio de inicio de la transcripción del gen que es aproximadamente la misma que la distancia entre esa secuencia genética o promotor y el gen lo controla en su entorno natural; es decir, el gen a partir del cual se deriva la secuencia genética o promotor. Como se conoce en la materia, alguna variación en esta distancia se puede acomodar sin pérdida de función. De manera similar, el posicionamiento preferente de un elemento de secuencia reguladora en relación con un gen heterólogo que va a colocarse bajo su control se define por el posicionamiento del elemento en su entorno natural; es decir, los genes a partir de los cuales se deriva.

El término "*paciente*" se refiere a pacientes de ser humano u otro mamífero e incluye a cualquier individuo que se desea examinar o tratar utilizando las composiciones de la invención. No obstante, se entenderá que "*paciente*" no implica que los síntomas estén presentes. Los mamíferos adecuados que caen dentro del alcance de la invención incluyen, entre otros, primates, animales de ganado (p. ej., ovejas, vacas, caballos, burros, cerdos), animales de ensayo de laboratorio (p. ej., conejos, ratones, ratas, cobayas, hámsteres), animales de compañía (p. ej., gatos, perros) y animales salvajes cautivos (p. ej., zorros, ciervos, dingos).

Por "*portador farmacéuticamente aceptable*" se entiende un relleno sólido o líquido, diluyente o sustancia encapsulante que puede utilizarse con seguridad en la administración tópica o sistémica.

El término "*polinucleótido*" o "*ácidos nucleicos*", como se utiliza en la presente memoria, designa ARNm, ARN, ARNc, ADNc o ADN. El término se refiere normalmente a oligonucleótidos superiores a 30 nucleótidos de longitud.

"*Polipéptido*", "*péptido*" y "*proteína*" se utilizan indistintamente en la presente memoria para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos del mismo. De este modo, estos términos se aplican a los polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos es un aminoácido de origen no natural sintético, tal como un análogo químico de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural.

Por "*cebador*" se entiende un oligonucleótido que, cuando se empareja con una cadena de ADN, es capaz de iniciar la síntesis de un producto de extensión del cebador en presencia de un agente de polimerización adecuado. El cebador es preferentemente monocatenario para máxima eficiencia en la amplificación, pero alternativamente puede ser bicatenario. Un cebador ha de ser suficientemente largo para cebar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente de polimerización. La longitud del cebador depende de muchos factores, incluyendo la aplicación, la temperatura que va a emplearse, las condiciones de reacción de plantilla, otros reactivos, y la fuente de cebadores. Por ejemplo, dependiendo de la complejidad de la secuencia diana, el cebador oligonucleótido contiene normalmente de 15 a 35 o más nucleótidos, aunque puede contener menos nucleótidos. Los cebadores pueden ser grandes polinucleótidos, tal como de aproximadamente 200 nucleótidos a varias kilobases o más. Los cebadores pueden seleccionarse para que sean "sustancialmente complementarios" a la secuencia en la plantilla en la que se diseña para hibridar y servir como un sitio para la iniciación de la síntesis. Por "sustancialmente complementario", se entiende que el cebador es suficientemente complementario para hibridarse con una secuencia de nucleótidos diana. Preferentemente, el cebador no contiene desapareamientos con la plantilla en la que se diseña para hibridarse, pero esto no es esencial. Por ejemplo, los nucleótidos no complementarios pueden unirse al extremo 5' del cebador, siendo el resto de la secuencia del cebador complementario a la plantilla. Alternativamente, los nucleótidos no complementarios o un tramo de nucleótidos no complementarios pueden intercalarse en un cebador, siempre que la secuencia del cebador tenga suficiente complementariedad con la secuencia de la plantilla para hibridarse con ella y de ese modo formar una plantilla para la síntesis del producto de extensión del cebador.

"*Sonda*" se refiere a una molécula que se une a una secuencia o subsecuencia específica u otra mitad de otra molécula. A menos que se indique lo contrario, el término "sonda" se refiere normalmente a una sonda de polinucleótidos que se une a otros ácidos nucleicos, a menudo llamado "ácidos nucleicos diana", a través del apareamiento de bases complementarias. Las sondas pueden unirse a ácidos nucleicos diana que carecen de complementariedad de secuencia completa con la sonda, dependiendo de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse directa o indirectamente.

La referencia en la presente memoria a un "*promotor*" ha de tomarse en su contexto más amplio e incluye las secuencias reguladoras transcripcionales de un gen genómico clásico, incluyendo la caja TATA que se requiere para el inicio preciso de la transcripción, con o sin una secuencia de caja CCAAT y elementos reguladores adicionales (es decir, secuencias activadoras cadena arriba, potenciadores y silenciadores) que alteran la expresión génica en respuesta a estímulos al desarrollo y/o ambientales, o de una manera específica del tejido o específica del tipo de célula. Un promotor es usualmente, pero no necesariamente, posicionado cadena arriba o 5', de un gen estructural, expresión de la que se regula. Además, los elementos reguladores que comprenden un promotor se posicionan

habitualmente en 2 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen. Los promotores preferentes para su uso de acuerdo con la invención pueden contener copias adicionales de uno o más elementos reguladores específicos para potenciar aún más la expresión en una célula, y/o para alterar el momento de la expresión de un gen estructural al que está conectado de forma operativa.

La expresión "*polinucleótido recombinante*", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polinucleótido formado *in vitro* por la manipulación de ácidos nucleicos en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza. Por ejemplo, el polinucleótido recombinante puede encontrarse en forma de un vector de expresión. Generalmente, tales vectores de expresión incluyen ácidos nucleicos reguladores transcripcionales y traduccionales vinculados operativamente a la secuencia de nucleótidos.

Por "*polipéptido recombinante*" se entiende un polipéptido realizado utilizando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un polinucleótido recombinante.

La expresión "*codón sinónimo*", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un codón que tiene una secuencia de nucleótidos diferente de otro codón pero que codifica el mismo aminoácido que ese otro codón.

Por "*eficacia traduccional*", se entiende la eficacia de la maquinaria de síntesis de proteínas de una célula para incorporar el aminoácido codificado por un codón en una cadena polipeptídica nascente. Esta eficacia puede ser evidenciada, por ejemplo, por la velocidad a la que la célula es capaz de sintetizar el polipéptido a partir de una plantilla de ARN que comprende el codón, o por la cantidad del polipéptido sintetizado a partir de una plantilla de este tipo.

Por "*vector*" se entiende una molécula de ácidos nucleicos, preferentemente una molécula de ADN derivada, por ejemplo, de un plásmido, bacteriófago, o virus de las plantas, en la que se puede insertar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos. Un vector contiene preferentemente uno o más sitios de restricción únicos y puede ser capaz de replicación autónoma en una célula hospedadora definida que incluye una célula o tejido diana o una célula o tejido progenitor de la misma, o puede integrarse con el genoma del hospedador definido de manera tal que la secuencia clonada es reproducible. Por consiguiente, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido lineal o circular cerrado, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica conjuntamente con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Un sistema de vector puede comprender un único vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que contienen conjuntamente el ADN total a ser introducido en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que el vector se va a introducir. El vector también puede incluir un marcador de selección, tal como un gen de resistencia a antibióticos que se puede utilizar para la selección de transformantes adecuados. Ejemplos de tales genes de resistencia son bien conocidos por los expertos en la materia.

2. Abreviaturas

VPB: virus del papiloma bovino

VPCCA: virus del papiloma del conejo de cola de algodón

HTR: hipersensibilidad de tipo retardado

PIH: prueba de inhibición de la hemaglutinación

VPH: virus del papiloma humano

VP: virus del papiloma

PSV: partícula similar a virus

3. Producción de antígenos para su uso en la invención

En el trabajo que condujo a la presente invención, los inventores trataron de desarrollar agentes inmunogénicos, particularmente polinucleótidos, que combinaran los efectos deseados de inmunogenicidad potenciada, así como la capacidad predecible/controlada para provocar el anticuerpo protector del hospedador, mientras que no se excluya o disminuya la inducción de una respuesta mediada por células para facilitar el tratamiento de la infección existente. Se observó que en los casos en que se vio favorecido el anticuerpo, el enfoque utilizado redujo la inducción de una respuesta mediada por células. Del mismo modo, en los casos en que se vio favorecido el último efecto, el enfoque utilizado redujo el efecto deseado anterior. Al tratar de superar una de las dificultades sin eliminar el segundo

beneficio deseado, los inventores descubrieron inadvertidamente que abordando al mismo tiempo los problemas de inmunogenicidad alterada y respuestas inmunológicas controladas, un enfoque combinado podría superar ambos obstáculos.

Por consiguiente, la presente invención se basa, en parte, en una innovadora estrategia para provocar simultáneamente una respuesta de anticuerpos protectores del hospedador y una respuesta inmunitaria mediada por células contra un antígeno diana para combatir, entre otras cosas, las condiciones que tienen periodos de latencia y, por lo tanto, se benefician del doble enfoque de profilaxis y terapia. La estrategia implica administrar a un individuo un primer antígeno correspondiente al antígeno diana, y es adecuadamente intracelularmente resistente a la proteólisis. Además, un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, se administra al individuo, en el que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno. El primer y segundo antígenos pueden administrarse en una forma proteínica, o en forma de ácidos nucleicos, o una combinación de los mismos. El determinante o determinantes antigénicos o epítipo o epítipos del primer antígeno y el segundo antígeno pueden ser idénticos o diferentes. Por consiguiente, la secuencia que contiene el epítipo del primer antígeno y el segundo antígeno pueden ser idénticos o diferentes. Particularmente, el primer antígeno y el segundo antígeno comprenden el mismo epítipo o epítipos. Adecuadamente, cuando los correspondientes epítipos son diferentes entre el primer antígeno y el segundo antígeno, tales epítipos son preferentemente capaces de provocar la producción de elementos que se unen a un epítipo correspondiente del antígeno diana.

Antígenos diana a modo de ejemplo incluyen, entre otros, al menos una porción de una proteína estructural que incluye, entre otros, proteínas estructurales de los organismos patógenos (p. ej., víricos, bacterianos, fúngicos, protozoos), tales como proteínas de la cápside o capsómeros. En una realización preferente, la proteína de la cápside es de origen vírico. Preferentemente, la proteína de la cápside vírica se refiere a un virus cristalino. Ejemplos de proteínas de la cápside vírica adecuados incluyen, entre otros, las proteínas L1 y/o L2 del virus del papiloma, proteínas de la cápside de un virus del herpes (p. ej., GpD y GpB), VP1-3 del poliomavirus, VP1-6 del virus de la lengua azul, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno de superficie de la hepatitis C, proteínas de la cápside de parvovirus, proteínas de la cápside de las partículas de levadura Ty, proteínas de la cápside de retrovirus (p. ej., VIH y VSR), proteínas de la cápside de rotavirus, proteínas de la cápside de coronavirus, y proteínas de la cápside de adenovirus. Alternativamente, el antígeno diana es una proteína estructural relativa al núcleo cristalino de un virus con envuelta lipídica. Para un listado más completo de las proteínas estructurales víricas, véase *Fields Virology* (redactores jefe, Bernard N. Fields, David M. Knipe, Peter M. Howley, 4ª edición, Lippincott-Raven Publishers, 1999, Filadelfia, EE.UU.).

Alternativamente, las proteínas de la cápside vírica adecuadas incluyen las que pueden utilizarse para producir partículas similares a virus, incluyendo, entre otros, partículas similares a virus como se describe por ejemplo por Oliveira-Ferreira *et al.* (2000 *Vaccine*, 18 (17): 1863-69), Hirschberg *et al.* (1999, *Int Immunol*, 11 (12): 1927-34), Klein *et al.* (1997, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13(5): 393-399), Allsopp *et al.* (1996, *Eur J Immunol*, 26 (8): 1951-195), Bachmann *et al.* (1996, *supra*), Layton *et al.* (1996, *Immunology*, 87 (2): 171-178; 1993, *J Immunol*, 151 (2): 1097-1107), Brookman *et al.* (1995, *Virology*, 207 (1): 59-67), Burns *et al.* (1994, *Mol Biotechnol*, 1 (2): 137-145), Martin *et al.* (1993, *AIDS*, 7(10): 1315-1323) y Adams *et al.* (1987, *Nature*, 329 (6134): 68-70), partículas similares a virus de la inmunodeficiencia en humanos como, por ejemplo, se describe por Paliard *et al.* (2000, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 16 (3): 273-282), Notka *et al.* (1999, *Biol Chem*, 380 (3): 341-352) y Wagner *et al.* (1998, *Virology*, 245 (1): 65-74; 1994, *Behring Inst Mitt*, (95): 23-34), partículas similares al virus Norwalk como se describe por ejemplo por Ball *et al.* (1999, *Gastroenterology*, 117 (1): 40-48) y White *et al.* (1996, *J Virol*, 70 (10): 6589-6597), PSV p24 como se describe por ejemplo por Benson *et al.* (1999, *AIDS Res Hum Retroviruses*, 15 (2): 105-113) partículas similares al virus del papiloma como se describe por ejemplo por Zhou *et al.* (1991, *Virology*, 181: 203-210; *ibid* 185: 251-257; y la publicación internacional WO 93/02184), Christensen *et al.* (2000, *Virology*, 269 (2): 451-461), y Benyacoub *et al.*, (1999, *Infect Immun*, 67 (7): 3674-3679, partículas similares al virus de la hepatitis como se describe por ejemplo por Falcon *et al.* (1999, *Cell Tissue*, 31 (2): 117-125), Li *et al.* (1997, *J Virol*, 71 (10): 7207-7213) y Schirmbeck *et al.* (1996, *Intervirology*, 39 (1-2): 111-119), partículas similares a virus del poliomavirus como se describe por ejemplo por Goldmann *et al.* (1999, *J Virol*, 73 (5): 4465-4469) y Szomolanyi-Tsuda *et al.* (1998, *J Virol*, 72 (8): 6665-6670), partículas similares a virus adenoasociados como se describe por ejemplo por Hoque *et al.* (1999, *Biochem Biophys Res Commun*, 266 (2): 371-376), partículas similares a virus a la enfermedad bursal infecciosa como se describe por ejemplo por Hu *et al.* (1999 *Biotechnol Bioeng*, 63 (6): 721-729), Kibenge *et al.* (1999, *Can J Vet Res*, 63 (1): 49-55) y Fernández-Arias *et al.* (1998, *J Gen Virol*, 79 (Pt 5): 1047-54), partículas similares a rotavirus como se describe por ejemplo por Jiang *et al.* (1999, *Vaccine*, 17 (7-8): 1005-13), Ciarlet *et al.* (1998, *J Virol*, 72 (11): 9233-9246), Gilbert *et al.* (1997, *J Virol*, 71 (6): 4555-4563) y Conner *et al.* (1996, *J Infect Dis*, 174 Supl. 1: S88-S92), partículas similares a calicivirus como se describe por ejemplo por Jiang *et al.* (1999, *J Virol Methods*, 78 (1-2): 81-91), partículas similares al virus de la leucemia bovina como se describe por ejemplo por Kakker *et al.* (1999, *Virology*, 265 (2): 308-318), partículas similares a virus de la enfermedad hemorrágica de conejo como se describe por ejemplo por Nagesha *et al.* (1999, *Arch Virol*, 144 (12): 2429-2439), partículas similares a parvovirus como se describe por ejemplo por Sedlik *et al.* (1999, *J Virol*, 73 (4): 2739-2744), Lo-Man *et al.* (1998, *Eur J Immunol*, 28 (4): 1401-1407) y Sedlik *et al.* (1997, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 94 (14): 7503-7508, particulares similares al virus basado en el elemento transponible D como se describe por ejemplo por Hajek *et al.* (1998, *J Virol*, 72 (11): 8718-8724), partículas similares al coronavirus de ratón como se describe por ejemplo por Bos *et al.* (1997,

J Virol, 71 (12): 9427-9433; 1996, *Virology*, 218 (1): 52-60), partículas similares al virus del enrollamiento de la hoja de la patata como se describe por ejemplo por Lamb *et al.* (1996, *J Gen Virol*, 77 (Pt 7): 1349-58), partículas similares al virus de la lengua azul como se describe por ejemplo por Murray y Eaton. (1996, *Vaccines for Vet Aust J*, 73 (6): 207-210), partículas similares a virus de protozoos como se describe por ejemplo por Sitja-Bobadilla *et al.* (1996, *Int J Parasitol*, 26 (4): 457-459), y partículas similares al virus Epstein-Barr como se describe por ejemplo por Yano *et al.* (1986, *Int J Cancer*, 38 (2): 275-284). En una realización preferente, la proteína de la cápside es una proteína de la cápside del virus del papiloma. La proteína de la cápside se selecciona adecuadamente entre las proteínas de la cápside L1 y L2.

3.1 Producción de antígeno modificado

Un segundo antígeno o antígeno modificado para su uso de acuerdo con la presente invención puede prepararse utilizando cualquier técnica adecuada que hace que sea menos resistente a la proteólisis intracelular con relación a un primer antígeno correspondiente al antígeno diana de interés. No obstante, hay que señalar que la presente invención no es dependiente, y no se dirige a, una cualquiera de una técnica particular por la que se produce el segundo antígeno o antígeno modificado. La semivida intracelular de un primer antígeno o antígeno diana es adecuadamente superior a aproximadamente 3 minutos, preferentemente superior a aproximadamente 5 minutos, más preferentemente superior a aproximadamente 10 minutos, aún más preferentemente superior a aproximadamente 15 minutos, incluso más preferentemente superior a aproximadamente 30 minutos, incluso más preferentemente superior a aproximadamente 1 hora, incluso más preferentemente superior a aproximadamente 10 horas, incluso más preferentemente superior a aproximadamente 24 horas, y todavía aún más preferentemente superior a aproximadamente 50 horas. Adecuadamente, un antígeno proteolíticamente resistente es uno que conserva más de aproximadamente el 10 % de su estructura terciaria después de aproximadamente 3 minutos, preferentemente después de aproximadamente 5 minutos, más preferentemente después de aproximadamente 10 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 15 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 30 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 1 hora, incluso más preferentemente después de aproximadamente 10 horas, incluso más preferentemente después de aproximadamente 24 horas, y aún más preferentemente después de aproximadamente 50 horas en condiciones intracelulares o similares a intracelulares. Preferentemente, un antígeno proteolíticamente resistente es uno que conserva más de aproximadamente el 20 % de su estructura terciaria después de aproximadamente 3 minutos, preferentemente después de aproximadamente 5 minutos, más preferentemente después de aproximadamente 10 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 15 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 30 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 1 hora, incluso más preferentemente después de aproximadamente 10 horas, incluso más preferentemente después de aproximadamente 24 horas, y aún más preferentemente después de aproximadamente 50 horas en condiciones intracelulares o similares a intracelulares. Más preferentemente, un antígeno proteolíticamente resistente es uno que conserva más de aproximadamente el 50 % de su estructura terciaria después de aproximadamente 3 minutos, preferentemente después de aproximadamente 5 minutos, más preferentemente después de aproximadamente 10 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 15 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 30 minutos, incluso más preferentemente después de aproximadamente 1 hora, incluso más preferentemente después de aproximadamente 10 horas, incluso más preferentemente después de aproximadamente 24 horas, y aún más preferentemente después de aproximadamente 50 horas en condiciones intracelulares o similares a intracelulares. Las condiciones intracelulares o similares a intracelulares son preferentemente fisiológicas para el tipo de célula. El tipo de célula es preferentemente una célula presentadora de antígeno, más preferentemente una célula presentadora de antígeno profesional que incluye, entre otros, una célula dendrítica, un macrófago y una célula B. La temperatura de las condiciones intracelulares o similares a intracelulares es preferentemente fisiológica para el tipo de célula. Las temperaturas a modo de ejemplo para las células de mamífero oscilan adecuadamente entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 42 °C, y preferentemente de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 37 °C. La semivida intracelular del segundo antígeno es adecuadamente inferior a aproximadamente 50 horas, preferentemente inferior a aproximadamente 10 horas, más preferentemente inferior a aproximadamente 1 hora, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 30 minutos, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 15 minutos, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 10 minutos y aún incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 3 minutos. Como mínimo, la degradación proteolítica potenciada del segundo antígeno se refiere a un nivel de degradación proteolítica que es de al menos aproximadamente 5 %, preferentemente al menos aproximadamente 10 %, más preferentemente al menos aproximadamente 20 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 40 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 50 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 60 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 70 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 90 %, aún incluso más preferentemente al menos aproximadamente 95 %, superior al de la diana o primer antígeno. Las pruebas para medir la degradación de proteínas se conocen por los expertos en la materia. Por ejemplo, la degradación proteolítica puede medirse utilizando una prueba de lisado celular de mamíferos incluyendo, entre otros, la prueba de lisado de reticulocitos de Bachmair *et al* en la patente de EE.UU. n.º de serie 5.646.017.

El segundo antígeno puede derivarse de un antígeno parental correspondiente al antígeno diana. El antígeno parental se selecciona adecuadamente entre un antígeno natural, un antígeno sintético o una combinación de los mismos.

El antígeno parental puede modificarse para incluir una señal de degradación intracelular o de grán. El de grán es adecuadamente una señal de degradación mediada por ubiquitina seleccionada entre un aminoácido desestabilizador en el extremo amino terminal de un antígeno, un aceptor de ubiquitina, una ubiquitina o combinación de los mismos. El antígeno parental puede modificarse para incluir un aminoácido desestabilizador en su extremo amino terminal de manera que la proteína así modificada se somete a la vía de la regla del N-terminal como se desvela, por ejemplo, por Bachmair *et al.* en la patente de EE.UU. n.º de serie 5.093.242 y por Varshavsky *et al.* en la patente de EE.UU. n.º de serie 5.122.463. El aminoácido desestabilizador puede seleccionarse entre isoleucina y ácido glutámico, más preferentemente entre tirosina, histidina y glutamina, y aún más preferentemente entre ácido aspártico, asparagina, fenilalanina, leucina, triptófano y lisina. El aminoácido desestabilizador puede ser arginina. En algunas proteínas, el extremo amino terminal se oscurece como resultado de la conformación de la proteína (es decir, su estructura terciaria o cuaternaria). En estos casos, una alteración más extensa del amino terminal puede ser necesaria para hacer que la proteína se someta a la vía de la regla del extremo N-terminal. Por ejemplo, cuando se insuficiente la simple adición o reemplazo del único residuo amino terminal debido a un extremo amino terminal inaccesible, varios aminoácidos (incluyendo lisina, el sitio de la ubiquitina de unión a proteínas de sustrato) pueden añadirse al extremo amino terminal original para aumentar la accesibilidad y/o movilidad segmental del extremo amino terminal modificado por ingeniería genética. Los segundos antígenos de acuerdo con la invención comprenden una señal de degradación intracelular que comprende una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma.

Las proteínas pueden diseñarse o modificarse a nivel de ácidos nucleicos o proteína para proporcionar un segundo antígeno con las características metabólicas deseadas. Un enfoque sencillo para la modificación de una proteína parental con el fin de aumentar su estabilidad metabólica es modificar por ingeniería genética directamente el amino terminal de la proteína a nivel de proteínas. Para proporcionar un aminoácido amino terminal deseado, el amino terminal de la proteína de interés puede alterarse químicamente, por ejemplo, mediante la adición de un aminoácido de la clase desestabilizadora al extremo amino terminal de una proteína o polipéptido, empleando una química adecuada. Así, por ejemplo, una proteína estable puede ser desestabilizada por adición de un aminoácido desestabilizador en el extremo amino terminal. Una forma distinta para modificar el amino terminal de una proteína sería emplear enzimas específicas, aminoácidos de la proteína ligasa, que catalizan la adición post-traducciona de un único aminoácido al amino terminal de la proteína. Otros métodos para alteraciones no genéticas del mismo tipo pueden ser fácilmente determinados por los expertos en la materia.

La modificación o diseño del amino terminal de una proteína también puede llevarse a cabo a nivel genético. Las técnicas convencionales de mutagénesis dirigida al sitio para la adición o sustitución de codones apropiados en el extremo 5' de un polinucleótido codificante de antígeno aislado o sintetizado pueden emplearse para proporcionar una estructura de amino terminal deseada para la proteína codificada. Por ejemplo, para que la proteína expresada tenga el aminoácido deseado en su extremo amino terminal, el codón apropiado para un aminoácido desestabilizador puede insertarse o integrarse en el amino terminal de la secuencia que codifica la proteína. Cuando sea necesario, una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región amino terminal de una proteína puede modificarse para introducir uno o más residuos de lisina en un contexto apropiado, que actúan como un aceptor de ubiquitina como se describe con más detalle a continuación. Esto se puede lograr más convenientemente mediante el empleo de construcciones de ADN que codifican "segmentos desestabilizadores universales". Un segmento desestabilizador universal, comprende una construcción de ácidos nucleicos que codifica una estructura polipeptídica, de manera preferente segmentalmente móvil, que contiene uno o más residuos de lisina, los codones para los residuos de lisina se posicionan en la construcción de tal manera que cuando se inserta la construcción en la secuencia codificante del polinucleótido que codifica el antígeno, los residuos de lisina son suficientemente espacialmente próximos al extremo amino terminal de la proteína codificada para servir como el segundo factor determinante de la señal de degradación amino terminal completa. La inserción de tales construcciones en la porción 5' de un polinucleótido que codifica el antígeno proporcionaría la proteína codificada con un residuo (o residuos) de lisina en un contexto apropiado para la desestabilización.

El codón para el aminoácido amino terminal de la proteína de interés puede fabricarse para codificar el aminoácido deseado, por ejemplo, por técnicas de mutagénesis dirigida al sitio actualmente convencional en el campo. Métodos de mutagénesis adecuados se describen por ejemplo en las secciones pertinentes de Ausubel, *et al.* (*supra*) y de Sambrook, *et al.*, (*supra*). Alternativamente, los métodos adecuados para alterar el ADN se exponen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º de serie 4.184.917, 4.321.365 y 4.351.901. En lugar de mutagénesis *in vitro*, el polinucleótido sintético puede sintetizarse *de novo* utilizando maquinaria fácilmente disponible. Se describe la síntesis secuencial de ADN, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º de serie 4.293.652. No obstante, hay que señalar que la presente invención no es dependiente y no se dirige a una cualquiera de una técnica particular para la construcción de un polinucleótido que codifica un antígeno modificado como se describe en la presente memoria.

Si el polinucleótido que codifica el antígeno es un polinucleótido sintético o recombinante, el codón 5' apropiado puede incorporarse durante el proceso sintético. Alternativamente, los nucleótidos de un codón específico se pueden

añadir al extremo 5' de un polinucleótido aislado o sintetizado por ligamento de una secuencia de ácidos nucleicos apropiada para el extremo 5' (codificación amino terminal) del polinucleótido. Los insertos de ácidos nucleicos que codifican los residuos de lisina apropiadamente ubicados (tales como los "segmentos desestabilizadores universales" descritos anteriormente) pueden insertarse de forma adecuada en la región 5' para proporcionar el segundo factor determinante de la degradación amino terminal completa.

El segundo antígeno o antígeno modificado, que comprende un aminoácido desestabilizador en su extremo amino, puede fusionarse o de otro modo conjugarse con una entidad de enmascaramiento, que enmascara dicho amino terminal de modo que cuando se desenmascara el segundo antígeno exhibirá la velocidad deseada de degradación proteolítica intracelular. De forma adecuada, la entidad de enmascaramiento es una secuencia de proteínas de enmascaramiento. La proteína de fusión se diseña de modo que la secuencia de proteínas de enmascaramiento fusionada al extremo amino terminal de la proteína de interés sea susceptible para la escisión específica en la unión entre los dos. La eliminación de la secuencia de proteína desenmascara así el amino terminal de la proteína de interés y la semivida de la proteína liberada se rige de este modo por el amino terminal prediseñado. La proteína de fusión puede diseñarse para la escisión específica *in vivo*, por ejemplo, mediante una endoproteasa de célula hospedadora o para la escisión específica en un sistema *in vitro* en el que se puede escindir después del aislamiento a partir de una célula productora (que carece de la capacidad para escindir la proteína de fusión). En consecuencia, la secuencia de proteínas de enmascaramiento puede escindirse por una endoproteasa, que es preferentemente una endoproteasa endógena de una célula de mamífero. Las endoproteasas adecuadas incluyen, entre otros, endoproteasas de serina (p. ej., subtilisinas y furinas) como se describe, por ejemplo, por Creemers, *et al.* (1998, *Semin. Cell Dev. Biol.* 9 (1): 3-10), endopeptidasas proteasomales como se describe, por ejemplo, por Zwickl, *et al.* (2000, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10 (2): 242-250), vía de procesamiento de proteasas relacionadas con el CMH clase I como se describe, por ejemplo, por Stolze *et al.* (2000, *Nat. Immunol.* 1 413-418) y peptidasas señal como se describe, por ejemplo, por Dalbey, *et al.* (1997, *Protein Sci.* 6 (6): 1129-1138). La secuencia de proteínas de enmascaramiento puede comprender una secuencia de péptido señal. Las secuencias de péptidos señal adecuadas se describen, por ejemplo, por Nothwehr *et al.* (1990., *Bioessays* 12 (10): 479-484), Izard, *et al.* (1994, *Mol. Microbial.* 13 (5): 765-773), Menne, *et al.* (2000, *Bioinformatics.* 16 (8): 741-742) y Ladunga (2000, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (1): 13-18). Adecuadamente, un sitio de escisión de endoproteasa se interpone entre la secuencia de la proteína de enmascaramiento y el segundo antígeno.

Un segundo antígeno o antígeno modificado con una secuencia de enmascaramiento unida se puede preparar convenientemente mediante la fusión de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de proteínas de enmascaramiento cadena arriba de otra secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno, que corresponde al antígeno diana de interés y que incluye un aminoácido desestabilizador en su extremo amino terminal. El codón para el aminoácido amino terminal del antígeno de interés está adecuadamente ubicado inmediatamente adyacente al extremo 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de enmascaramiento.

El antígeno parental puede modificarse para incluir o de otro modo asociarse con un aceptor de ubiquitina que es una molécula que contiene preferentemente al menos un residuo apropiadamente posicionado desde el N-terminal del antígeno para ser capaz de unirse por moléculas de ubiquitina. Tales residuos tienen preferentemente un grupo amino épsilon, tal como lisina. El análisis físico demuestra que múltiples residuos de lisina funcionan como sitios aceptores de ubiquitina (King *et al.*, 1996, *Mol. Biol. Cell* 7: 1343-1357; King *et al.*, 1996, *Science* 274: 1652-1659). Ejemplos de otros aceptores de ubiquitina incluyen ARN polimerasa del virus *lacI* o Sindis. La ubiquitinación en el extremo N-terminal de la proteína orienta selectivamente de manera específica la proteína para la degradación por medio de la vía ubiquitina-proteosoma.

Se contemplan otras señales de procesamiento de proteínas que desestabilizan un antígeno de interés y permiten la degradación intracelular potenciada. Estos otros métodos pueden no necesariamente estar mediados por la vía de la ubiquitina, pero de otro modo pueden permitir la degradación de las proteínas en el citoplasma por medio de proteosomas. Por ejemplo, pueden utilizarse otras señales de procesamiento intracelulares que regulan la velocidad o velocidades de degradación de proteínas intracelulares incluyendo, entre otros, las descritas por Bohley *et al.* (1996, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 377: 425-435). Tales señales de procesamiento incluyen aquellas que permiten la fosforilación de la proteína diana (Yaglom *et al.*, 1996, *Mol. Cell. Biol.* 16: 3679-3684; Yaglom *et al.*, 1995, *Mol. Cell Biol.* 15: 731-741). Se describe la modificación de un antígeno parental que permite la arginilación post-traducciona (Ferber *et al.* 1987, *Nature* 326: 808-811; Bohley *et al.*, 1991, *Biomed. Biochim. Acta* 50: 343-346) de la proteína que puede potenciar su velocidad o velocidades de degradación intracelular. Ciertas características estructurales de las proteínas se pueden utilizar para poder influir en las velocidades más altas de recambio de proteína intracelular, incluyendo la hidrofobicidad de la superficie de proteína, los agrupamientos de residuos hidrófobos en la proteína (Sadis *et al.*, 1995, *Mol. Cell. Biol.* 15: 4086-4094), ciertos motivos de pentapéptidos hidrófobos en el extremo carboxi terminal (C-terminal) de la proteína (p. ej., ARINV (SEQ ID NO: 25), como se encuentra en el extremo C-terminal de la ornitina descarboxilasa (Ghoda *et al.*, 1992, *Mol. Cell Biol.* 12: 2178-2185; Li, *et al.*, 1994, *Mol. Cell Biol.* 14: 87-92), o AANDENYALAA (SEQ ID NO: 26), como se encuentra en las etiquetas de los extremos C-terminales de los polipéptidos aberrantes (Keiler *et al.*, 1996, *Science* 271: 990-993), o regiones PEST (regiones ricas en prolina (P), ácido glutámico (E), serina (S) y treonina (T), que están opcionalmente flanqueadas por aminoácidos que comprenden cadenas laterales electropositivas (Rogers *et al.* 1986, *Science* 234 (4774): 364-368;

1988, *J. Biol. Chem.* 263: 19833-19842). Además, ciertos motivos se han identificado en proteínas que parecen necesarias y, posiblemente, suficientes para lograr la rápida degradación intracelular. Tales motivos incluyen la región RXALGXIXN (SEQ ID NO 27) (en la que X = cualquier aminoácido) en ciclinas (Glotzer *et al.*, 1991, *Nature* 349: 132-138) y el motivo KTKRNYSD (SEQ ID NO: 28) en isocitrato liasa (Ordiz *et al.*, 1996, *FEBS Lett.* 385: 43-46).

Se describe la degradación celular potenciada de un antígeno parental que se puede producir por la incorporación en ese antígeno de sitios de escisión de la proteasa conocidos. Por ejemplo, la proteína beta-amiloide puede escindirse por una beta- y gamma-secretasa (Iizuka *et al.* 1996, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218: 238-242) y el factor X de coagulación dependiente de vitamina K de dos cadenas puede escindirse por endoproteasa o endoproteasas dependientes de calcio en el hígado (Wallin *et al.*, 1994, *Thromb. Res.* 73: 395-403).

En la presente invención, el antígeno parental se conjuga con una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma, para producir un segundo antígeno o antígeno modificado cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el antígeno parental. En una realización preferente de este tipo, la ubiquitina o un fragmento biológicamente activo se fusiona, o de otro modo se conjuga, al segundo antígeno. Adecuadamente, la ubiquitina es de origen mamífero, más preferentemente de origen humano u otro primate. En una realización preferente de este tipo, la ubiquitina comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2. En una realización alternativa, la ubiquitina comprende dos o más copias de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

En una realización, la proteína de fusión ubiquitina-antígeno se produce adecuadamente por la unión covalente de un antígeno que corresponde al antígeno diana a una ubiquitina o a un fragmento biológicamente activo de la misma. La unión covalente se puede efectuar por cualquier medio adecuado conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, los conjugados de proteína se pueden preparar mediante la vinculación de las proteínas entre sí utilizando reactivos bifuncionales. Los reactivos bifuncionales pueden ser homobifuncionales o heterobifuncionales.

Los reactivos homobifuncionales son moléculas con al menos dos grupos funcionales idénticos. Los grupos funcionales del reactivo reaccionan generalmente con uno de los grupos funcionales en una proteína, normalmente un grupo amino. Los ejemplos de reactivos homobifuncionales incluyen glutaraldehído y diimidatos. Un ejemplo del uso de glutaraldehído como un agente de reticulación se describe por Poznansky *et al.* (1984, *Science*, 223: 1304-1306). El uso de diimidatos como un agente de reticulación se describe por ejemplo por Wang, *et al.* (1977, *Biochemistry*, 16: 2937-2941). Aunque es posible utilizar reactivos homobifuncionales con el fin de formar un antígeno modificado para su uso de acuerdo con la invención, el personal calificado en la materia apreciará que es difícil unir diferentes proteínas de una manera ordenada con estos reactivos. En este sentido, en el intento de vincular una primera proteína con una segunda proteína por medio de un reactivo homobifuncional, no se puede impedir la vinculación de la primera proteína entre sí y de la segunda entre sí. Los reactivos de reticulación heterobifuncionales son, por lo tanto, preferentes porque se puede controlar la secuencia de reacciones, y combinar proteínas a voluntad. De este modo, los reactivos heterobifuncionales proporcionan un método más sofisticado para vincular dos proteínas. Estos reactivos requieren una de las moléculas a unir, en lo sucesivo denominada miembro B, para poseer un grupo reactivo no encontrado en el otro, en lo sucesivo denominado miembro A, o bien requieren que uno de los dos grupos funcionales se bloquee o de otro modo reduzca en gran medida la reactividad mientras que el otro grupo se hace reaccionar con el socio A. En un proceso típico de dos etapas para formar heteroconjugados, el miembro A se hace reaccionar con el reactivo heterobifuncional para formar una molécula de miembro A derivatizado. Si el grupo funcional sin reaccionar del agente de reticulación se bloquea, se desprotege a continuación. Después de la desprotección, el miembro B se acopla al miembro A derivatizado para formar el conjugado. Los grupos amino primarios en el miembro A se hacen reaccionar con un grupo carboxilato o imidato activado en el agente de reticulación en la etapa de derivatización. Un tiol reactivo o un tiol bloqueado y activado en el otro extremo del agente de reticulación se hacen reaccionar con un grupo electrófilo o con un tiol reactivo, respectivamente, sobre el miembro B. Cuando el agente de reticulación posee un tiol reactivo, el electrófilo sobre el miembro B será preferentemente un grupo tiol bloqueado y activado, una maleimida, o un carbonilo halometileno (p. ej., bromoacetilo o yodoacetilo). Debido a que las macromoléculas biológicas no contienen de forma natural tales electrófilos, han de añadirse al miembro B mediante una reacción de derivatización separada. Cuando el agente de reticulación posee un tiol bloqueado y activado, el tiol sobre el miembro B con el que reacciona puede ser nativo en relación con el miembro B.

Un ejemplo de un reactivo heterobifuncional es N-succinimidil 3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (véase, por ejemplo Carlsson *et al.*, 1978, *Biochem. J.*, 173: 723-737). Otros reactivos heterobifuncionales para vincular proteínas incluyen, por ejemplo succinimidil 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (Yoshitake *et al.*, 1979, *Eur. J. Biochem.*, 101: 395-399), 2-iminotiolano (IT) (Jue *et al.*, 1978, *Biochemistry*, 17: 5399-5406), y anhídrido S-acetil mercaptosuccínico (SAMSA) (Klotz y Heiney, 1962, *Arch. Biochem. Biophys.*, 96: 605-612). Los tres reaccionan preferentemente con aminas primarias (p. ej., cadenas laterales de lisina) para formar un grupo amida o amidina que vincula un tiol a la molécula derivatizada (p. ej., un antígeno heterólogo) por medio de un brazo espaciador de conexión corta, de uno a tres átomos de carbono de longitud. Los ejemplos de reactivos heterobifuncionales que comprenden grupos reactivos que tienen un doble enlace que reacciona con un grupo tiol incluyen SMCC mencionados anteriormente, succinimidil m-maleimidobenzoato, succinimidil 3-

(maleimido)propionato, sulfosuccinimidil 4-(p-maleimidofenil)butirato, sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometilciclohexano-1-carboxilato y éster de maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS). En una realización preferente, MBS se utiliza para producir el conjugado. Otros reactivos heterobifuncionales para la formación de conjugados de dos proteínas se describen, por ejemplo, por Rodwell *et al.* en la patente de Estados Unidos n.º 4.671.958 y por Moreland *et al.* en la patente de Estados Unidos. n.º 5.241.078.

Una proteína de fusión ubiquitina-antígeno puede expresarse adecuadamente por un polinucleótido quimérico sintético que comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula cadena abajo y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. El segundo polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula inmediatamente adyacente cadena abajo y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. El segundo polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula cadena arriba y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. El segundo polinucleótido puede comprender una primera secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana, y que se vincula inmediatamente adyacente cadena arriba y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma. Preferentemente, pero no exclusivamente, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la ubiquitina comprende la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 1.

Se desvela una construcción sintética (o vector de expresión), que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno modificado como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, en el que dicho polinucleótido se vincula operativamente a un polinucleótido regulador. Un polinucleótido que codifica el antígeno modificado puede construirse a partir de cualquier polinucleótido parental adecuado que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana de interés. El polinucleótido parental es adecuadamente un gen natural. No obstante, es posible que el polinucleótido parental no tenga un origen natural pero se ha modificado por ingeniería genética utilizando técnicas recombinantes.

El polinucleótido regulador comprende de manera adecuada secuencias de control transcripcionales y/o traduccionales, que generalmente serán apropiadas para la célula hospedadora utilizada para la expresión del polinucleótido que codifica el antígeno. Normalmente, las secuencias de control reguladoras transcripcionales y traduccionales incluyen, entre otras, una secuencia promotora, una región 5' no codificante, una región reguladora en *cis*, tal como un sitio de unión funcional para la proteína reguladora transcripcional o proteína reguladora traduccional, un marco abierto de lectura cadena arriba, un sitio de inicio transcripcional, un sitio de inicio traduccional, y/o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia líder, un codón de terminación, un sitio de tope traduccional y una región 3' no traducida. El uso de promotores constitutivos o inducibles como se conoce en la materia se contempla por la invención. Los promotores pueden ser promotores de origen natural, o promotores híbridos que combinan elementos de más de un promotor. Las secuencias promotoras pueden ser nativas para la célula hospedadora a introducir o pueden derivarse de una fuente alternativa, en la que la región es funcional en la célula hospedadora.

La construcción sintética descrita en la presente memoria puede comprender también una secuencia no traducida 3'. Una secuencia no traducida 3' se refiere a aquella porción de un gen que comprende un segmento de ADN que contiene una señal de poliadenilación y cualquier otra señal reguladora capaz de efectuar el procesamiento de ARNm o expresión génica. La señal de poliadenilación se caracteriza por efectuar la adición de trectos de ácido poliadenílico al extremo 3' del precursor de ARNm. Las señales de poliadenilación se reconocen comúnmente por la presencia de homología en la forma canónica 5' AATAAA-3' aunque las variaciones no son infrecuentes. La secuencia de ADN reguladora no traducida 3' incluye preferentemente de aproximadamente 50 a 1.000 pares de bases de nucleótidos y puede contener secuencias de terminación transcripcionales y traduccionales en adición a una señal de poliadenilación y cualquier otra señal reguladora capaz de efectuar el procesamiento de ARNm o la expresión génica.

El vector de expresión puede contener además un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de selección son bien conocidos en la materia y variarán con la célula hospedadora utilizada.

El vector de expresión también puede incluir un miembro de fusión (normalmente proporcionado por el vector de expresión) de manera que el polipéptido recombinante para su uso en la invención se expresa como un polipéptido de fusión con dicho miembro de fusión. La principal ventaja de los miembros de fusión es que ayudan a la identificación y/o purificación de dicho polipéptido de fusión. Con el fin de expresar dicho polipéptido de fusión, es necesario ligar un polinucleótido que codifica un antígeno para su uso de acuerdo con la invención en el vector de expresión de modo que los marcos de lectura traduccionales del miembro de fusión y del polinucleótido coincidan. Ejemplos bien conocidos de miembros de fusión incluyen, entre otros, glutatión-S-transferasa (GST), porción Fc de IgG humana, proteína de unión a maltosa (PUM) y hexahistidina (HIS₆), que son particularmente útiles para el

aislamiento del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad. Para los fines de purificación del polipéptido de fusión mediante cromatografía de afinidad, matrices relevantes para la cromatografía de afinidad son resinas conjugadas con glutatión, amilosa, y níquel o cobalto, respectivamente. Muchas de tales matrices están disponibles en forma de "kit", tales como el sistema QIAexpress™ (Qiagen) útil con miembros de fusión (HIS₆) y el sistema de purificación de Pharmacia GST. El polinucleótido recombinante puede expresarse en el vector comercial pFLAG como se describe más completamente en lo sucesivo. Otro miembro de fusión bien conocido en la materia es la proteína verde fluorescente (PVF). Este miembro de fusión sirve como una "etiqueta" fluorescente que permite que el polipéptido de fusión se identifique por microscopía de fluorescencia o por citometría de flujo. La etiqueta PVF es útil al evaluar la localización subcelular del polipéptido de fusión, o para el aislamiento de células que expresan el polipéptido de fusión. Los métodos de citometría de flujo, tales como clasificación de células activadas por fluorescencia (CCAF) son particularmente útiles en esta última aplicación. Los miembros de fusión pueden tener también sitios de escisión de proteasa, tales como para el factor X_a o trombina, que permiten que la proteasa relevante digiera parcialmente el polipéptido de fusión descrito en la presente memoria y de ese modo libere el polipéptido recombinante de ello. El polipéptido liberado puede entonces aislarse del miembro de fusión por separación cromatográfica subsiguiente. Los miembros de fusión descritos en la presente memoria también incluyen dentro de su alcance "etiquetas de epítomos", que son habitualmente secuencias cortas de péptidos para las que un anticuerpo específico está disponible. Ejemplos bien conocidos de etiquetas de epítomos para las que los anticuerpos monoclonales específicos son fácilmente disponibles incluyen c-Myc, hemaglutinina presente en el virus de la gripe y etiquetas FLAG.

La etapa de introducir en la célula hospedadora el polinucleótido recombinante se puede efectuar por cualquier método adecuado, incluyendo transfección y transformación, la elección de las cuales dependerá de la célula hospedadora empleada. Tales métodos son bien conocidos por los expertos en la materia.

Los polipéptidos recombinantes descritos en la presente invención pueden producirse por el cultivo de una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene ácidos nucleicos que codifican un polipéptido, fragmento biológicamente activo, variante o derivado descrito en la presente memoria. Las condiciones apropiadas para la expresión de la proteína variarán con la elección del vector de expresión y la célula hospedadora. Esto se determina fácilmente por un experto en la materia mediante experimentación rutinaria. Las células hospedadoras adecuadas para la expresión pueden ser procariotas o eucariotas. Una célula hospedadora preferente para la expresión de un polipéptido descrito en la presente memoria es una bacteria. La bacteria utilizada puede ser *Escherichia coli*. Alternativamente, la célula hospedadora puede ser una célula de insecto, tal como, por ejemplo, células SF9 que pueden utilizarse con un sistema de expresión de baculovirus.

La proteína recombinante puede prepararse convenientemente por un experto en la materia utilizando protocolos convencionales como se describe por ejemplo en Sambrook, *et al.*, *MOLECULAR CLONING. A LABORATORY MANUAL* (Cold Spring Harbor Press, 1989), en particular las secciones 16 y 17; Ausubel *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (John Wiley & Sons, Inc. 1994-1998), en particular los capítulos 10 y 16; y Coligan *et al.*, *CURRENT PROTOCOLS IN PROTEIN SCIENCE* (John Wiley & Sons, Inc. 1995-1997), en particular los capítulos 1, 5 y 6.

Alternativamente, el antígeno modificado puede sintetizarse utilizando síntesis de solución o síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el capítulo 9 de Atherton y Shephard (*supra*) y en Roberge *et al* (1995, *Science* 269: 202).

3.2 Producción de antígenos no modificados (primeros antígenos)

Un antígeno sin modificar, para su uso en la producción de composiciones inmunomoduladoras de la invención, se puede preparar por cualquier técnica adecuada. Por "*antígeno no modificado*" se entiende cualquier antígeno, ya sea natural o sintético que imita o conserva la degradación proteolítica intracelular del antígeno diana. En consecuencia, el antígeno no modificado puede aislarse de una fuente natural o puede prepararse mediante técnicas recombinantes como se conoce en la materia. Preferentemente, el antígeno no modificado se prepara en una forma recombinante como por ejemplo se ha descrito anteriormente para los antígenos modificados de la invención. Por ejemplo, un antígeno no modificado puede prepararse por un procedimiento que incluye las etapas de (a) proporcionar un polinucleótido que codifica un antígeno no modificado, que se vincula operativamente a un polinucleótido regulador; (b) introducir el polinucleótido en una célula hospedadora adecuada; (c) cultivar la célula hospedadora para expresar el polipéptido recombinante a partir de dicho polinucleótido; y (d) aislar el polipéptido recombinante.

Se desvela una construcción sintética que comprende un polinucleótido que codifica un antígeno no modificado como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, en el que dicho polinucleótido se vincula operativamente a un polinucleótido regulador. Un polinucleótido que codifica el antígeno no modificado se puede construir a partir de cualquier polinucleótido parental adecuado, que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana de interés. El polinucleótido parental es adecuadamente un gen natural. No obstante, es posible que el polinucleótido parental no sea de origen natural pero se ha modificado por ingeniería genética utilizando técnicas recombinantes.

4. Optimización de codones de polinucleótidos que codifican antígenos

La composición de codones de polinucleótidos que codifican antígenos puede alterarse para potenciar la expresión del antígeno en una célula o tejido particular. Dicha optimización de codones se basa en el reemplazo de los codones existentes en un polinucleótido parental con codones sinónimos que tienen una eficacia traduccional superior en una célula o tejido elegido. Puede utilizarse cualquier método adecuado de reemplazo de codones sinónimos con codones existentes. Por ejemplo, puede hacerse referencia a la publicación de la solicitud internacional n.º WO 96/09378 que utiliza dicha sustitución para proporcionar un método de expresión de proteínas de origen eucariota y vírico a niveles elevados en sistemas de cultivo celular de mamíferos *in vitro*. Una secuencia optimizada de codones se muestra en la base de datos n.º de acceso AX029304 (16 de septiembre de 2000). La composición de codones del polinucleótido puede modificarse para permitir la expresión selectiva del antígeno codificado así en una célula o tejido diana de elección utilizando métodos que se exponen con detalle en las publicaciones de solicitud internacional n.º WO 99/02694 y WO 00/42215. En este sentido, los presentes inventores fueron capaces de demostrar en el documento WO 99/02694 y en la solicitud de Estados Unidos en trámite n.º 09/479645 que existen diferencias sustanciales en la abundancia relativa de ARNs de transferencia isoaceptores particulares en diferentes células o tejidos de un organismo (p. ej., un mamífero) y que estos desarrollan un papel fundamental en la expresión de la proteína a partir de una secuencia de codificación con un uso o composición de codones dado. La modificación de los codones utilizados en transgenes diseñados para generar proteínas traducidas puede conducir a una expresión mucho más alta y selectiva de genes particulares en una célula o tejido de interés. Brevemente, el método se basa en la observación de que las eficacias traduccionales de codones diferentes varían entre diferentes células o tejidos. Tales diferencias pueden explotarse, junto con la composición de codones de un gen, para regularse y la expresión directa de una proteína o un fragmento funcional o epítipo de la misma a una célula particular o tipo de células, incluyendo las células en un tejido seleccionado. Los codones se seleccionan de modo que el codón sinónimo tiene una eficacia de traducción superior en una célula o tejido diana en relación a una o más células o tejidos.

Uno o más codones en un gen pueden sustituirse con el fin de orientar selectivamente la expresión del gen a células o tejidos particulares. Es preferible pero no necesario reemplazar todos los codones existentes de la molécula de ácidos nucleicos parental con codones sinónimos que tienen una eficacia traduccional superior en la célula o tejido diana en comparación con las otras células o tejidos. El aumento de la expresión puede lograrse incluso con un reemplazo parcial. Adecuadamente, la etapa de reemplazo afecta 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, más preferentemente 35 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o más de los codones existentes del polinucleótido parental. La diferencia en el nivel de proteína expresada en la célula diana o tejido deseado de un polinucleótido sintético, en relación con la expresada en las otras células o tejidos, depende del porcentaje de los codones existentes reemplazados con codones sinónimos y la diferencia en las eficacias traduccionales de los codones sinónimos en la célula o tejido diana, con relación a las otras células o tejidos.

Mediante la optimización del contenido de codón, de acuerdo con los procedimientos desvelados en el documento WO 99/02694 y en la solicitud en trámite de Estados Unidos n.º 09/479645, se ha demostrado que una proteína se puede expresar a partir de un polinucleótido sintético en una célula o tejido diana a niveles superiores a 10.000 veces más que los expresados en otra célula o tejido. Una molécula de ácidos nucleicos, que ha experimentado tal modificación de codón, se denomina en la presente memoria como "*optimizado*".

5. Construcciones sintéticas

Se desvela una construcción sintética para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende un primer polinucleótido que codifica un primer antígeno que corresponde al antígeno diana; y un segundo polinucleótido que codifica un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno. El primer polinucleótido y el segundo polinucleótido pueden vincularse operativamente a un polinucleótido regulador. Por ejemplo, el primer y segundo polinucleótidos pueden expresarse a partir de un único promotor. Alternativamente, el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido pueden vincularse operativamente a diferentes polinucleótidos reguladores. Por ejemplo, el primer y segundo polinucleótidos pueden expresarse a partir de diferentes promotores.

Se desvela asimismo un sistema de construcción sintética para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende una construcción sintética que comprende un primer polinucleótido, que codifica un primer antígeno correspondiente al antígeno diana, y que se vincula operativamente a un polinucleótido regulador; y otra construcción sintética que comprende un segundo polinucleótido que codifica un segundo antígeno, que corresponde a una forma modificada del antígeno diana, cuya velocidad de degradación proteolítica intracelular se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno, en el que dicho segundo polinucleótido se vincula operativamente a un polinucleótido regulador.

6. Administración de antígenos al citosol

Los antígenos modificados y antígenos no modificados desvelados en la presente memoria o polinucleótidos a partir de los cuales se expresan pueden vincularse, o asociarse de otro modo con una citolisina para potenciar la transferencia de los antígenos en el citosol de una célula diana para la administración a la vía a través del CMH clase I. Las citolisinas a modo de ejemplo incluyen compuestos de saponina, tales como complejos inmunoestimulantes (ISCs) que contienen saponina (véase, p. ej., Cox y Coulter, 1997, *Vaccine* 15 (3): 248-256 y la patente de Estados Unidos n.º 6.352.697), fosfolipasas (véase, p. ej., Camilli *et al.*, 1991, *J. Exp. Med.* 173: 751-754), toxinas formadoras de poros (p. ej., una alfa-toxina), citolisinas naturales de bacterias grampositivas, tales como listeriolisina O (LLO, p. ej., Mengaud *et al.*, 1988, *Infect. Immun.* 56: 766-772 y Portnoy *et al.*, 1992, *Infect. Immun.* 60: 2710-2717), estreptolisina O (SLO, p. ej., Palmer *et al.*, 1998, *Biochemistry* 37 (8): 2378-2383) y perfringolisina O (PFO, p. ej., Rossjohn *et al.*, *Cell* 89 (5): 685-692). Cuando la célula diana es fagosomal, las citolisinas activadas por ácido pueden utilizarse ventajosamente. Por ejemplo, la listeriolisina exhibe una mayor capacidad de formación de poros en un pH ligeramente ácido (las condiciones de pH en el fagosoma), facilitando de este modo la administración de contenidos de vacuolas (incluyendo fagosoma y endosoma) en el citoplasma (véase, p. ej., Portnoy *et al.*, *Infect. Immun.* 1992, 60: 2710-2717).

La citolisina se puede proporcionar junto con uno o ambos de los antígenos modificados y no modificados descritos en la presente memoria en forma de una única composición o puede proporcionarse como una composición separada. La citolisina puede fusionarse o de otro modo vincularse a uno o ambos de dichos antígenos, en los que la fusión o vinculación permite la administración del antígeno o antígenos al citosol de la célula diana. La citolisina y antígeno o antígenos pueden proporcionarse en forma de un vehículo de administración, tal como, entre otros, un liposoma o un vehículo de administración microbiana seleccionado entre virus, bacterias o levaduras. Adecuadamente, cuando el vehículo de administración es un vehículo de administración microbiana, el vehículo de administración es no virulento. El vehículo de administración puede ser una bacteria no virulenta, como se describe por ejemplo por Portnoy *et al.* en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.556, que comprende un primer polinucleótido que codifica una citolisina funcional no secretada vinculada operativamente a un polinucleótido regulador que expresa la citolisina en la bacteria, y un segundo polinucleótido que codifica uno o más de dichos antígenos diana. Las citolisinas no secretadas pueden proporcionarse mediante diversos mecanismos, p. ej., ausencia de una secuencia señal funcional, microbios incompetentes en la secreción, tales como microbios que tienen lesiones genéticas (p. ej., una mutación de secuencia señal funcional), o microbios envenenados, etc. Una amplia variedad de bacterias no virulentas no patógenas puede utilizarse; los microbios preferentes son cepas relativamente bien caracterizadas, particularmente cepas de laboratorio de *E. coli*, tales como MC4100, MC1061, DH5.alfa., etc. Otras bacterias que pueden modificarse por ingeniería genética para su uso en la invención incluyen cepas bien caracterizadas, no virulentas, no patógenas de *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Bacillus subtilis*, etc. Las bacterias pueden atenuarse por ser no replicativas, no integrativas en el genoma de la célula hospedadora, y/o no móviles inter o intracelularmente.

Los vehículos de administración descritos anteriormente se pueden utilizar para administrar uno o más antígenos descritos en la presente memoria en relación con prácticamente cualquier célula diana capaz de endocitosis del vehículo sujeto, incluyendo células fagocíticas, no fagocíticas, patógenas o enfermas. Las células animales diana a modo de ejemplo incluyen células epiteliales, células endoteliales, células musculares, células hepáticas, células pancreáticas, células neurales, fibroblastos, células tumorales, leucocitos, tales como macrófagos, neutrófilos, células B, células T, monocitos, etc. Cuando el vehículo de administración es un microbio, los métodos sujeto requieren generalmente la absorción microbiana por la célula diana y la posterior lisis en la vacuola de la célula diana (incluyendo fagosomas y endosomas). Si bien las células diana fagocíticas proporcionan generalmente la absorción microbiana y la lisis, para muchos tipos de células, es necesario proporcionar microbios (p. ej., bacterias) con un invasina para facilitar o mediar la absorción por la célula diana y una autolisina para facilitar o mediar la autólisis del microbio en la vacuola de la célula diana, como se describe por ejemplo por Portnoy *et al.* en la patente de Estados Unidos n.º 6.287.556.

7. Célula presentadora de antígeno

Se desvela una composición de materia para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, que comprende células presentadoras de antígeno que expresan una forma procesada del primer antígeno como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, y una forma procesada del segundo antígeno como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, para su presentación a las células T y modulación de las mismas. Las células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno se pueden preparar por un método que incluye poner en contacto células presentadoras de antígeno con (1) un primer antígeno como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, y (2) un segundo antígeno como se ha descrito anteriormente o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para permitir que dichos primer y segundo antígenos se internalicen por las células presentadoras de antígeno; y el cultivo de las células presentadoras de antígeno que contienen antígeno durante un tiempo y en condiciones suficientes para que el antígeno o antígenos se procesen para la presentación por las células presentadoras de antígeno. Las células presentadoras de antígeno pueden seleccionarse entre células dendríticas, macrófagos y células B. Las células presentadoras de antígeno pueden ser células dendríticas.

7.1 Fuentes de células dendríticas

Las células dendríticas pueden aislarse por métodos conocidos por los expertos en la materia. Adecuadamente, las células dendríticas de mamíferos y preferentemente humanas se utilizan de una fuente de tejido apropiado, que es adecuadamente sangre o médula ósea. Los precursores de células dendríticas, a partir de las cuales las células dendríticas inmaduras para su uso en la internalización de antígeno, como se describe en la presente memoria, están presentes en la sangre como células mononucleares de sangre periférica (CMSPs). Aunque la mayoría se obtienen con facilidad a partir de la sangre, las células precursoras pueden obtenerse también a partir de cualquier tejido en el que residen, incluyendo la médula ósea y tejido de bazo. Los precursores de sangre periférica pueden purificarse utilizando anticuerpos monoclonales, gradientes de densidad o centrifugación o cualquier combinación de estos. La frecuencia de circulación puede aumentarse *in vivo* utilizando un ligando flt-3. Cuando se cultivan en presencia de citoquinas, tales como una combinación de GM-CSF e IL-4 o IL-13, como se describe a continuación, las células precursoras no proliferantes dan lugar a células dendríticas inmaduras para su uso como se describe en la presente memoria.

Un método a modo de ejemplo para el cultivo de CMSPs pluripotenciales para producir células dendríticas inmaduras se describe por Albert *et al.* (publicación internacional WO 99/42564). A este respecto, los cultivos de células dendríticas inmaduras, es decir, células dendríticas fagocíticas de captura de antígeno, pueden obtenerse mediante el cultivo de las células precursoras no proliferantes (CMSPs) en presencia de citoquinas que promueven su diferenciación. Una combinación de GM-CSF e IL-4 produce cantidades significativas de células dendríticas inmaduras, es decir, células dendríticas fagocíticas de captura de antígeno o competente de internalización. Otras citoquinas que promueven la diferenciación de células precursoras en células dendríticas inmaduras incluyen, entre otros, IL-13.

La maduración de las células dendríticas requiere la adición al entorno celular, preferentemente el medio de cultivo, de una célula dendrítica, uno o más factores de maduración que pueden seleccionarse a partir del medio acondicionado de monocitos y/o factores incluyendo TNF- α , IL-6, IFN- α y IL-1. Alternativamente, una mezcla de células necróticas o lisado celular necrótico puede añadirse para inducir la maduración. La maduración puede inducirse *in vitro* utilizando adherencia sobre plástico, citoquinas, LPS, bacterias, ADN que contiene repeticiones de CpG, ARN o PolII, ligamento CD40, células necróticas. A este respecto, puede hacerse referencia a Steinman *et al.* (publicación internacional WO 97/29182) que describen métodos y composiciones para el aislamiento y la maduración de las células dendríticas.

Otros métodos para el aislamiento, expansión y/o maduración de las células dendríticas para los fines descritos en la presente memoria se describen por ejemplo por Takamizawa *et al.* (1997, *J Immunol*, 158 (5): 2134-2142), Thomas y Lipsky (1994, *J Immunol*, 153 (9): 4016-4028), O'Doherty *et al.* (1994, *Immunology*, 82 (3): 487-93), Fearnley *et al.* (1997, *Blood*, 89 (10): 3708-3716), Weissman *et al.* (1995, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 92 (3): 826-830), Freudenthal y Steinman (1990, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 87 (19): 7698-7702), Romani *et al.* (1996, *J Immunol Methods*, 196 (2): 137-151), Reddy *et al.* (1997, *Blood*, 90 (9): 3640-3646), Thurnher *et al.* (1997, *Exp Hematol*, 25 (3): 232-237), Caux *et al.* (1996, *J Exp Med*, 184 (2): 695-706; 1996, *Blood*, 87 (6): 2376-85), Luft *et al.* (1998, *Exp Hematol*, 26 (6): 489-500; 1998, *J Immunol*, 161 (4): 1947-53), Cella *et al.* (1999, *J Exp Med*, 189 (5): 821-829; 1997, *Nature*, 388 (644): 782-787; 1996, *J Exp Med*, 184 (2): 747-572), Ahonen *et al.* (1999, *Cell Immunol*, 197(1): 62-72) y Piemonti *et al.* (1999, *J Immunol*, 162 (11): 6473-6481).

Alternativamente, las estirpes celulares dendríticas inmortalizadas o transformadas se pueden producir utilizando oncogenes tales como *v-myc*, como se describe por ejemplo por Paglia *et al.* (1993, *J Exp Med*, 178 (6): 1983-1901).

7.2 Sensibilización del antígeno de las células presentadoras de antígeno

La cantidad de antígeno que se pone en contacto con células presentadoras de antígeno, que son preferentemente células dendríticas, se puede determinar empíricamente por los expertos en la materia. Las células presentadoras de antígeno (que son preferentemente células dendríticas), se incuban con el antígeno durante 1-2 horas a 37 °C. Para la mayoría de los antígenos, 10 μ g/ml a 1-10 millones de células dendríticas es adecuado para la sensibilización de las células dendríticas. Las células dendríticas inmaduras se pueden utilizar para la internalización del antígeno.

El antígeno o antígenos deben exponerse a las células presentadoras de antígeno durante un periodo suficiente de tiempo para que las células presentadoras de antígeno internalicen el antígeno o antígenos. El tiempo necesario para que las células internalicen y presenten el antígeno o antígenos procesados puede determinarse utilizando protocolos de pulsado y seguimiento en el que la exposición al antígeno o antígenos es seguido por un periodo de lavado. Una vez que se determina el tiempo mínimo necesario para que las células expresen el antígeno o antígenos procesados en su superficie, un protocolo puede utilizarse para preparar las células y el antígeno o antígenos para provocar respuestas inmunogénicas. Los expertos en la materia reconocerán a este respecto que el tiempo transcurrido para que una célula presentadora de antígeno fagocite o internalice un antígeno puede variar dependiendo del antígeno utilizado. La eficacia de sensibilización de las células presentadoras de antígeno puede determinarse por la evaluación de la actividad citotóxica de las células T *in vitro* o el uso de células presentadoras de

antígeno como dianas de LTC. Otros métodos conocidos por los profesionales en la materia, que pueden detectar la presencia de antígeno en la superficie de células presentadoras de antígeno después de la exposición a uno o más de los antígenos modificados y no modificados, también se contemplan.

5 Cuando las células presentadoras de antígenos son células dendríticas, tales células tienen la capacidad de presentar de manera eficiente una forma procesada del antígeno modificado y el antígeno no modificado en forma de péptidos en moléculas de CMH clase I y clase II. Los antígenos se adquieren por células dendríticas a través de la vía exógena por fagocitosis y, como resultado, moléculas a través del CMH clase II de carga eficiente. En consecuencia, los linfocitos T auxiliares CD4⁺ y LTC pueden activarse por las células dendríticas que presentan un antígeno modificado y opcionalmente no modificado en el contexto de CMH clase II. Estos linfocitos pueden proporcionar fuentes críticas de ayuda, para la generación de LTC CD8⁺ activo y en algunas circunstancias pueden sensibilizarse como LTC CD4⁺ con especificidad para el antígeno diana durante la respuesta aguda al antígeno, y para la generación de la memoria que se requiere para la resistencia y la vacunación a largo plazo. Además, el antígeno y la absorción de antígenos modificados y opcionalmente no modificados y la presentación por las células dendríticas, permite a estas células adaptar los péptidos que son apropiados para productos de CMH individuales, y aumenta el número de células presentadoras de antígeno estimuladoras especializadas. Además, las células dendríticas se pueden cargar con antígenos múltiples en múltiples CMHs para producir la estimulación policlonal u oligoclinal de las células T. De este modo, mediante el uso de los antígenos descritos en la presente memoria para cargar las moléculas a través del CMH clase I y clase II, se puede lograr una modulación de células T eficiente *in situ*.

8. Composiciones

Los antígenos modificados y antígenos no modificados descritos respectivamente en las secciones 3 y 4, la construcción sintética y el sistema de construcción sintética descritas en la sección 5, y las células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno descritas en la sección 7 (agentes terapéuticos/profilácticos) se pueden utilizar como principios activos para el tratamiento o profilaxis de varias afecciones asociadas con la presencia de un antígeno diana. Estos agentes terapéuticos/profilácticos se pueden administrar a un paciente, ya sea por sí mismos, o en composiciones en las que se mezclan con un portador y/o un diluyente o un adyuvante farmacéuticamente adecuado.

Se describe un método para estimular el sistema inmunitario de un paciente, y para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, por administración al paciente de un agente terapéutico o composición como se ha descrito anteriormente. Dicha estimulación se puede utilizar para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección que incluye, entre otros, una infección patógena (p. ej., vírica, bacteriana, fúngica, protozoaria). Alternativamente, la estimulación se puede utilizar para modular una respuesta inmunitaria a un autoantígeno (p. ej., asociado con la artritis reumatoide).

De este modo, se describe un método para el tratamiento y/o profilaxis de una enfermedad o afección, que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento una cantidad terapéuticamente/profilácticamente eficaz de una composición como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente. El método puede comprender administrar simultáneamente al paciente un antígeno no modificado como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, o un polinucleótido a partir del cual se expresa el antígeno no modificado, junto con un antígeno modificado como se ha descrito a grandes rasgos anteriormente, o un polinucleótido a partir del cual se expresa el antígeno modificado. El método puede comprender la coadministración a un paciente de un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno no modificado, y un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno modificado. El método puede comprender la coadministración a un paciente de dicho antígeno no modificado y un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno modificado. El método puede comprender la administración simultánea a un paciente de un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno no modificado, junto con dicho antígeno modificado. El método puede comprender la coadministración a un paciente de dicho antígeno no modificado y células presentadoras de antígenos que se han expuesto a dicho antígeno modificado, o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno modificado, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho antígeno modificado para su presentación a las células T y modulación de las mismas. El método puede comprender la administración simultánea a un paciente de células presentadoras de antígeno que se han expuesto a dicho antígeno modificado, o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno modificado, y a dicho antígeno no modificado, o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho antígeno no modificado, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada de dicho antígeno modificado y una forma procesada de dicho antígeno no modificado para su presentación a las células T y modulación de las mismas.

Dependiendo de las afecciones específicas que se tratan, los agentes terapéuticos/profilácticos pueden formularse y administrarse sistémicamente o localmente. Las técnicas para la formulación y administración pueden hallarse en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, Pa., última edición. Las vías adecuadas pueden, por ejemplo, incluir administración oral, rectal, transmucosal, o intestinal; administración parenteral, incluyendo intramuscular, subcutánea, inyecciones intramedulares, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, o intraocular. Para la inyección, los agentes terapéuticos descritos en

la presente memoria se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosal, los penetrantes apropiados para la barrera a permear se utilizan en la formulación. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la materia. La inyección intramuscular y subcutánea es apropiada, por ejemplo, para la administración de composiciones inmunogénicas, vacunas y vacunas de ADN.

Los agentes terapéuticos/profilácticos se pueden formular con facilidad utilizando portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la materia en dosificaciones adecuadas para la administración oral. Tales portadores permiten que los compuestos descritos en la presente memoria se formen en formas de dosificación, tales como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente a tratar. Estos portadores pueden seleccionarse entre azúcares, almidones, celulosa y sus derivados, malta, gelatina, talco, sulfato de calcio, aceites vegetales, aceites sintéticos, polioles, ácido alginico, soluciones tamponadas con fosfato, emulsionantes, solución salina isotónica, y agua exenta de pirógenos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso como se describe en la presente memoria incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para alcanzar su fin previsto. La dosis del agente administrado a un paciente debe ser suficiente para efectuar una respuesta beneficiosa en el paciente con el tiempo, tal como una reducción en los síntomas asociados con la afección. La cantidad del agente o agentes terapéuticos/profilácticos a administrar puede depender del sujeto a tratar inclusive de la edad, sexo, peso y estado general de salud del mismo. En este sentido, cantidades precisas de agente o agentes terapéuticos/profilácticos para la administración dependerán del juicio del profesional sanitario habilitado. Al determinar la cantidad eficaz del agente a administrar en el tratamiento o profilaxis de la afección, el médico puede evaluar los niveles tisulares de un antígeno diana, y la progresión de la enfermedad o afección. En cualquier caso, los expertos en la materia pueden determinar con facilidad dosificaciones adecuadas de los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria.

Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de los compuestos activos en forma soluble en agua. Adicionalmente, las suspensiones de los compuestos activos pueden prepararse como suspensiones por inyección oleosa apropiada. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Las preparaciones farmacéuticas para su uso oral se pueden obtener combinando los compuestos activos con un excipiente sólido, moliendo opcionalmente una mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, materiales de relleno, tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol, o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como pirrolidona de polivinilo reticulado, agar, o ácido alginico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio. Tales composiciones pueden prepararse por cualquiera de los métodos de farmacia pero todos los métodos incluyen la etapa de asociación de uno o más agentes terapéuticos como se ha descrito anteriormente con el portador que constituye uno o más ingredientes necesarios. En general, las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria pueden fabricarse de una manera conocida por sí misma, p. ej., por medio de procesos convencionales de mezclado, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, pueden utilizarse soluciones de azúcar concentradas, que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel carbopol, polietilenglicol, y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos o mezclas de disolventes adecuados. Colorantes o pigmentos pueden añadirse a los recubrimientos de comprimidos o grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Un medicamento que puede utilizarse por vía oral incluye cápsulas duras fabricadas de gelatina, así como cápsulas blandas, selladas fabricadas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos mezclados con un material de relleno, tal como lactosa, aglutinantes, tales como almidones y/o lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida, o polietilenglicoles líquidos. Además, pueden añadirse estabilizadores.

Las formas de dosificación de los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria pueden incluir también dispositivos de liberación controlada por inyección o implante diseñados específicamente para este fin u otras formas de implantes modificados para actuar adicionalmente de esta manera. La liberación controlada de un agente

descrito en la presente memoria se puede efectuar mediante el recubrimiento del mismo, por ejemplo, con polímeros hidrófobos que incluyen resinas acrílicas, ceras, alcoholes alifáticos superiores, ácidos polilácticos y poliglicólicos y ciertos derivados de celulosa, tales como hidroxipropilmetilcelulosa. Además, la liberación controlada puede efectuarse mediante el uso de otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas.

Los agentes terapéuticos descritos en la presente memoria pueden proporcionarse como sales con contraiones farmacéuticamente compatibles. Las sales farmacéuticamente compatibles pueden formarse con muchos ácidos, incluyendo, entre otros, ácido clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros protónicos que son las formas de base libre correspondientes.

Para cualquier compuesto utilizado en el método descrito en la presente memoria, la dosis eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluye la CI50 como se determina en un cultivo celular (p. ej., la concentración de un agente de ensayo, que logra una reducción medio máximo en un antígeno diana). Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los compuestos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, p. ej., para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la relación DL50/DE50. Resultan preferentes los compuestos que exhiben grandes índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estas pruebas de cultivo celular y estudios animales pueden utilizarse para formular un intervalo de dosificación para su uso en humanos. La dosificación de tales compuestos reside preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con escasa o nula toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden elegirse por el médico individual a la vista de la afección del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "*The Pharmacological Basis of Therapeutics*", cap. 1 p1).

La cantidad de dosificación y el intervalo se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma del compuesto o compuestos activos que son suficientes para mantener los efectos reductores de antígeno diana o efectos que mejoran la enfermedad o afección. Las dosificaciones habituales del paciente para el intervalo de la administración sistémica oscilan desde 1-2.000 mg/día, habitualmente de 1-250 mg/día, y normalmente de 10-150 mg/día. Expresado en términos de peso corporal del paciente, las dosificaciones normales oscilan desde 0,02-25 mg/kg/día, habitualmente de 0,02-3 mg/kg/día, normalmente de 0,2-1,5 mg/kg/día. Expresado en términos de superficie corporal del paciente, las dosificaciones habituales oscilan desde 0,5-1.200 mg/m²/día, habitualmente desde 0,5-150 mg/m²/día, normalmente de 5-100 mg/m²/día.

Alternativamente, se puede administrar el agente en forma de una manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, por medio de inyección del compuesto directamente en un tejido, a menudo en una formulación de liberación prolongada o sostenida. Además, se puede administrar el agente en un sistema de administración de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico de tejido. Los liposomas se orientarán selectivamente y se absorberán selectivamente por el tejido.

Considerando lo anteriormente expuesto, se apreciará que los agentes descritos en la presente memoria puedan utilizarse como composiciones inmunomoduladoras terapéuticas o profilácticas o vacunas. En consecuencia, se desvela la producción de composiciones inmunomoduladoras que contienen como compuestos activos uno o más de los agentes terapéuticos/profilácticos descritos en la presente memoria. Cualquier procedimiento adecuado se contempla para producir tales vacunas. Procedimientos a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, los descritos en NEW GENERATION VACCINES (1997, Levine *et al.*, Marcel Dekker, Inc. Nueva York, Basel Hong Kong).

Se desvela el uso de composiciones de ácidos nucleicos para los fines de vacunación o inmunomodulación. En este sentido, una construcción sintética se puede utilizar para inmunizar a un paciente, cuya construcción incluye un polinucleótido que codifica un antígeno modificado desvelado en la presente memoria, y/o un polinucleótido que codifica un antígeno no modificado desvelado en la presente memoria, en el que dicho polinucleótido o polinucleótidos se conectan operativamente a una o secuencias más reguladoras que dirigen la expresión de dicho polinucleótido o polinucleótidos en dicho paciente.

Normalmente, tales construcciones o vectores se derivan de secuencias de ADN víricas, tales como adenovirus, virus adenoasociados, virus del herpes simple y retrovirus. Vectores de inmunomoduladores adecuados actualmente disponibles para el experto pueden encontrarse, por ejemplo, en Wu y Ataai (2000, *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2): 205-208), Vigna y Naldini (2000, *J. Gene Med.* 2 (5): 308-316), Kay, *et al.* (2001, *Nat. Med.* 7 (1): 33-40), Athanasopoulos, *et al.* (2000, *Int. J. Mol. Med.* 6 (4): 363-375) y Walther y Stein (2000, *Drugs* 60 (2): 249-271).

La administración de la construcción inmunomoduladora a un paciente, preferentemente un paciente humano, puede incluir la administración por medio de la ingesta oral directa, inyección sistémica, o administración a los tejidos o

células seleccionados, o indirectamente por medio de la administración a las células aisladas procedentes del paciente o de un donante compatible. La construcción inmunomoduladora puede administrarse por vía intradérmica.

La administración de dicha construcción inmunomoduladora a las células o tejidos del paciente o dicho donante compatible se puede facilitar mediante el bombardeo con microproyectiles, transfección mediada por liposomas (p. ej., lipofectina o lipofectamina), electroporación, fosfato cálcico o transfección mediada por dextrano DEAE, por ejemplo. Una discusión de los métodos de administración adecuados se puede hallar en el capítulo 9 de *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (Eds. Ausubel *et al.*; John Wiley & Sons Inc., 1997 edición), por ejemplo.

La etapa de introducir la construcción inmunomoduladora en una célula o tejido diana será diferente dependiendo del uso y de las especies previstas, y puede involucrar uno o más de los vectores no víricos y víricos, liposomas catiónicos, retrovirus y adenovirus, tales como, por ejemplo, se describe en Mulligan, R.C., (1993). Tales métodos pueden incluir, por ejemplo:

A. Aplicación local del vector de expresión mediante inyección (Wolff *et al.*, 1990), implante quirúrgico, instilación o cualquier otro medio. Este método también se puede utilizar en combinación con la aplicación local mediante inyección, implante quirúrgico, instilación o cualquier otro medio, de células sensibles a la proteína codificada por el vector de expresión a fin de aumentar la eficacia de dicho tratamiento. Este método también se puede utilizar en combinación con la aplicación local mediante inyección, implante quirúrgico, instilación o cualquier otro medio, de otro factor o factores requeridos para la actividad de dicha proteína.

B. Administración sistémica general por inyección de ADN, (Calabretta *et al.*, 1993), o ARN, solo o en combinación con liposomas (Zhu *et al.*, 1993), cápsides víricas o nanopartículas (Bertling *et al.*, 1991) o cualquier otro mediador de administración. La orientación selectiva mejorada puede lograrse vinculando el vector polinucleotídico/de expresión a una molécula de direccionamiento (el llamado enfoque de "bala mágica" que emplea, por ejemplo, una molécula de unión a antígeno), o por aplicación local mediante inyección, implantación quirúrgica o cualquier otro medio, de otro factor o factores requeridos para la actividad de la proteína codificada por dicho vector de expresión, o de células sensibles a dicha proteína.

C. Inyección o implante o administración por cualquier medio de las células que se han modificado *ex vivo* por transfección (por ejemplo, en presencia de fosfato de calcio: Chen *et al.*, 1987, o de lípidos catiónicos y poliaminas: Rose *et al.*, 1991), infección, inyección, electroporación (Shigekawa *et al.*, 1988) o de cualquier otra manera a fin de aumentar la expresión de dicho polinucleótido en esas células. La modificación puede ser mediada por el plásmido, bacteriófago, cósmido, vectores víricos (tales como adenoviral o retroviral; Mulligan, 1993; Miller, 1992; Salmons. *et al.*, 1993) u otros vectores, u otros agentes de modificación, tales como liposomas (Zhu *et al.*, 1993), cápsides víricas o nanopartículas (Bertling *et al.*, 1991), o cualquier otro mediador de modificación. El uso de células como vehículo de administración para genes o productos génicos se ha descrito por Barr *et al.*, 1991 y por Dhawan *et al.*, 1991. Las células tratadas se pueden administrar en combinación con cualquier nutriente, factor de crecimiento, matriz u otro agente que promueva su supervivencia en el sujeto tratado.

Las composiciones inmunomoduladoras descritas en la presente memoria pueden contener un diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable, tal como agua, solución salina tamponada con fosfato y solución salina. También pueden incluir un adyuvante como es bien conocido en la materia. Los adyuvantes adecuados incluyen, entre otros: sustancias tensioactivas, tales como hexadecilamina, octadecilamina, ésteres de aminoácidos de octadecilo, lisolecitina, bromuro de dimetildioctadecilamonio, N,N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxietil-propanodiamina), metoxihexadecilglicerol, y polioles plurónicos; poliaminas, tales como pirano, sulfato de dextrano, poli IC, carbopol; péptidos, tales como dipéptido de muramilo y derivados, dimetilglicina, tuftsina; emulsiones de aceite; y geles minerales, tales como fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre; linfoquinas, QuilA y complejos inmunoestimulantes (ISCOMs).

Las células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno modificado, y opcionalmente sensibilizadas con antígeno no modificado, descritas en la presente memoria y los linfocitos T específicos de antígeno generados con estas células presentadoras de antígenos se pueden utilizar como compuestos activos en composiciones inmunomoduladoras para aplicaciones profilácticas o terapéuticas. Las células sensibilizadas, que son preferentemente células dendríticas maduras, se pueden inyectar por cualquier método que provoca una respuesta inmunitaria en un animal singénico o ser humano. Preferentemente, las células presentadoras de antígeno se inyectan de nuevo en el mismo animal o ser humano del cual se obtuvo las células/tejidos fuente. El sitio de inyección puede ser subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular, intradérmico o intravenoso. El número de células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno reinyectadas de nuevo en el animal o ser humano en necesidad de tratamiento puede variar en función, entre otras cosas, del antígeno y tamaño del individuo. Este número puede oscilar por ejemplo entre aproximadamente 10^4 y 10^8 , y más preferentemente entre aproximadamente 10^6 y 10^7 células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno (p. ej., células dendríticas). Las células presentadoras de antígeno se deben administrar en un portador farmacéuticamente aceptable, que es no tóxico para las células y el individuo. Tal portador puede ser el medio de crecimiento en el que se cultivaron las células

presentadoras de antígeno, o cualquier medio de tamponamiento adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato.

Las células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno descritas en la presente memoria también se podrían utilizar para generar grandes cantidades de LTC CD8⁺ o CD4⁺, para la transferencia adoptiva a individuos inmunodeprimidos que son incapaces de incrementar respuestas inmunitarias normales. Por ejemplo, TLC CD8⁺ específico del antígeno puede transferirse adoptivamente para fines terapéuticos en individuos aquejados por infección por VIH (Koup *et al.*, 1991, *J. Exp. Med.*, 174: 1593-1600; Carmichael *et al.*, 1993, *J. Exp. Med.*, 177: 249-256; y Johnson *et al.*, 1992, *J. Exp. Med.*, 175: 961-971), malaria (Hill *et al.*, 1992, *Nature*, 360: 434-439) y tumores malignos, tales como melanoma (Van der Brogen *et al.*, 1991, *Science*, 254: 1643-1647; y Young y Steinman, 1990, *J. Exp. Med.*, 171: 1315-1332).

La composición inmunomoduladora descrita en la presente memoria puede ser adecuada para el tratamiento o profilaxis de un cáncer. Los cánceres que pueden ser tratados adecuadamente de acuerdo con las prácticas descritas incluyen cánceres asociados con una infección vírica, tales como cáncer cervical (p. ej., infección por virus del papiloma) y linfoma de Burkitt (p. ej., infección por virus de Epstein Barr). Otros cánceres asociados a virus incluyen, entre otros, leucemia asociada a HTLV1, linfoma de Hodgkins (VEB), cáncer anal, cáncer de piel (VPH), carcinoma hepatocelular (VHB) y sarcoma de Kaposi (HVB8).

La composición inmunomoduladora descrita puede ser adecuada para el tratamiento o profilaxis de una infección vírica, bacteriana o parasitaria. Las infecciones víricas contempladas incluyen, entre otros, infecciones causadas por VIH, hepatitis, gripe, virus de la encefalitis japonesa, virus de Epstein-Barr y virus sincitial respiratorio. Las infecciones bacterianas incluyen, entre otros, las causadas por especies *Neisseria*, especies *Meningococcal*, especies *Haemophilus*, especies *Salmonella*, especies *Streptococcal*, especies *Legionella* y especies *Mycobacterium*. Las infecciones parasitarias incluyen, entre otras, las causadas por especies *Plasmodium*, especies *Schistosoma*, especies *Leishmania*, especies *Trypanosoma*, especies *Toxoplasma* y especies *Giardia*.

La efectividad de la inmunización se puede evaluar utilizando cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, pruebas de lisis de LTC se pueden emplear utilizando esplenocitos estimulados o células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) en células infectadas por virus recubiertos con péptido o recombinantes utilizando células diana etiquetadas ⁵¹Cr. Tales pruebas se pueden realizar utilizando, por ejemplo células de primate, ratón o humanas (Allen *et al.*, 2000, *J. Immunol.* 164 (9): 4968-4978 también Woodberry *et al.*, *Infra*). Alternativamente, la eficacia de la inmunización puede controlarse utilizando una o más técnicas incluyendo, entre otros, tinción con tetrámero HLA clase I de CMSPs frescas y estimuladas (véase, por ejemplo, Allen *et al.*, *supra*), pruebas de proliferación (Allen *et al.*, *supra*), pruebas de ELISPOT y tinción intracelular de citoquinas (Allen *et al.*, *supra*), ensayos de ELISA para las respuestas de células B lineales; y membranas Western de una muestra de células que expresan los polinucleótidos sintéticos. Particularmente relevante será el perfil de citoquinas de células T activadas por antígeno, y más particularmente la producción y secreción de IFN γ , IL-2, IL-4, IL5, IL-10, TGF y TNF α .

9 Métodos para evaluar la inmunomodulación

La capacidad de un individuo para responder a antígenos exógenos o específicos de la enfermedad (p. ej., antígenos víricos y antígenos de cáncer) puede ser evaluar si esas células sensibilizadas para atacar tales antígenos aumentan en número, actividad y capacidad para detectar y destruir aquellos antígenos. La fuerza de la respuesta inmunitaria se mide mediante ensayos convencionales, incluyendo: medición directa de los linfocitos de sangre periférica por medios conocidos en la materia; ensayos de citotoxicidad de linfocitos citolíticos naturales (véase, p. ej., Provinciali M. *et al.* (1992, *J. Immunol. Meth.* 155: 19-24), pruebas de proliferación celular (véase, p. ej., Vollenweider, I. y Groseurth, P.J. (1992, *J. Immunol. Meth.* 149: 133-135), inmunoensayos de células inmunitarias y subconjuntos (véase, p. ej., Loeffler, D. A., *et al.* (1992, *Cytom.* 13: 169-174) Rivoltini, L., *et al.* (1992, *Can. Immunol. Immunother.* 34: 241-251); o ensayos cutáneos para la inmunidad mediada por células (véase, p. ej., Chang, A.E. *et al.* (1993, *Cancer Res.* 53: 1043-1050).

La actividad citotóxica de los linfocitos T, y en particular, la capacidad de los linfocitos T citotóxicos para ser inducidos por células presentadoras de antígeno, puede evaluarse mediante cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, una muestra que comprende linfocitos T a ensayar para la actividad citotóxica se obtiene y los linfocitos T se exponen entonces a células presentadoras de antígeno sensibilizadas con antígeno, que se han provocado para presentar el antígeno. Después de un periodo de tiempo apropiado, que puede determinarse mediante la evaluación de la actividad citotóxica de una población de control de los linfocitos T que son conocidos por ser capaces de inducirse para convertirse en células citotóxicas, los linfocitos T que deben evaluarse se ensayan para la actividad citotóxica en una prueba citotóxica convencional. Tales pruebas pueden incluir, entre otros, la prueba de LTC de liberación de cromo conocida en la materia.

El método de evaluación de la actividad LTC es particularmente útil para evaluar la capacidad de un individuo para generar una respuesta citotóxica contra células que expresan antígenos tumorales o víricos. En consecuencia, este método es útil para evaluar la capacidad de un individuo para incrementar una respuesta inmunitaria contra un cáncer o virus.

Para que la invención pueda entenderse fácilmente y llevarse a la práctica, realizaciones preferentes particulares se describirán ahora por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

EJEMPLO 1

Inmunización con ADN y estirpes celulares en ratones

Los ratones hembra BALB/c y C57BL/6 libres de patógenos específicos, de 6 a 8 semanas, se adquirieron del Centro de Recursos Animal (Perth, Australia) y se mantuvieron en condiciones de limpieza en una ratonera convencional.

Los ratones hembra BALB/c y C57 BL/6, de 6 a 8 semanas de edad, se inmunizaron mediante bombardeo de partículas con perlas de oro recubiertas de ADN (2 µg de ADN/dosis) utilizando el sistema de administración de pistola genética de Helios accionada con helio (Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EE.UU.). El ADN (1,0 µg) se acopló a 0,5 mg de partículas de oro con un diámetro de 1,0 µm, tal como se recomienda por el fabricante. Los microportadores recubiertos de ADN se administraron en la epidermis abdominal a un ajuste de presión de helio de 400 psi.

Una estirpe celular EL-4, C2³⁶, transducida con virus del papiloma humano (VPH) 16 E7, y la línea celular parental (EL-4) se mantuvieron en medio RPMI-1640 completo más suero bovino fetal al 10 % (CSL, Melbourne, Australia).

EJEMPLO 2

Reemplazos de codones en el HPV6bL1, E7 y los genes de ubiquitina

El HPV6bL1, HPV6b-E7 y las secuencias del gen ubiquitina humana se modificaron para sustituir los codones preferentes con codones raramente utilizados, de acuerdo con los métodos descritos previamente¹². Un polinucleótido que codifica HPV6bL1 truncado de 33 aminoácidos C-terminal se fabricó como una construcción modificada de codones (H6L1Δ) (SEQ ID NO: 9) y también con codones nativos (6L1Δ) (SEQ ID NO: 7).

Un gen de fusión HPV6bL1-E7 (H6L1E7.1) (SEQ ID NO: 11) se construyó mediante la adición a H6L1Δ de una secuencia modificada de codones correspondiente a los aminoácidos 2-50 de la proteína E7 HPV6b. H6L1E7.2 (SEQ ID NO: 13) se construyó de manera similar mediante la adición de un polinucleótido que codifica los aminoácidos 49-98 de E7 de HPV6b, y H6L1-H16E7 (SEQ ID NO: 19) se construyó mediante la adición de un polinucleótido que corresponde al epítipo de LTC H-2 D^b mínimo de HPV16 (RAHYNIVTF). La construcción modificada de codones L2 de BPV1 (SEQ ID NO: 23), denominada HBL2, se ha descrito previamente¹².

Una construcción de fusión ubiquitina-HL1-16E7 (SEQ ID NO: 15) se produjo mediante la adición de una secuencia que codifica un monómero de ubiquitina 5' en la construcción del gen L1-16E7. Los genes modificados de codones de la secuencia deseada se sintetizaron por Operon (Alameda, California, EE.UU.), y todas las secuencias se verificaron por secuenciación Big Dye Terminator. Las secuencias para las siete innovadoras construcciones de vacunas de polinucleótidos modificados de codones utilizadas en la presente memoria se depositaron ante GenBank bajo los números de acceso AF322411-5 (SEQ ID NO: 9, 11, 13, 15, respectivamente) y AF323508-9 (SEQ ID NO: 17 y 19, respectivamente).

EJEMPLO 3

Construcciones de plásmidos

Los cebadores se diseñaron para permitir la clonación de construcciones de genes en plásmidos de expresión eucariota. Todos los cebadores se codifican para un sitio de restricción *EcoRI* o *KpnI* de flanco en su extremo N-terminal, y para 18-24 nucleótidos del gen correspondiente. Se utilizaron para amplificar las secuencias de genes VP por PCR. Los productos de PCR amplificados se cortaron con enzimas de restricción *KpnI* y *EcoRI* y se ligaron al vector de expresión pCDNA3 de mamífero que contiene el virus del simio 40 (SV40) (Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) para producir los plásmidos de expresión correspondientes.

EJEMPLO 4

Medición de las respuestas de anticuerpos

La medición de la IgG específica de PSV total en suero se realizó por ELISA de captura, como se ha descrito previamente³⁷. Para medir el anticuerpo L1 de HPV6b contra epítomos lineales, PSVs de L1 HPV6b se desnaturalizaron por reducción alcalina (tampón Na₂CO₃ 0,2 M, pH 10,6, ditiotritol 0,01 M)³⁸ y se recubrieron directamente sobre placas de ELISA en una concentración de 20 µg/ml. Para la prueba de anticuerpos L2 (véase el

Ejemplo 11, a continuación), las placas ELISA se recubrieron con 50 µl de proteína BPVL2 recombinante de etiqueta His purificada en una concentración de 10 µg/ml en tampón carbonato 50 mM, pH. 9,6. Para la prueba de anticuerpo específico de E7, las células Cos-1 (véase el Ejemplo 6, a continuación) se transfectaron con pCDNA3E7³⁹ durante 48 horas. Los lisados celulares se prepararon en NP-40 al 0,5 %, Tris-HCl 0,1 M (pH. 8,5). Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se llevó a cabo utilizando métodos convencionales. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Los sueros se aplicaron de forma diluida 1:100 en TFS con leche en polvo sin grasa al 0,5 %. El anticuerpo secundario fue anti-ratón conjugado con peroxidasa (Sigma, St Louis, Missouri, EE.UU.), y se detectó mediante ECL.

EJEMPLO 5

La modificación de codones genera una mayor inmunogenicidad

Para investigar el efecto de la modificación de codones sobre la inmunogenicidad de una vacuna polinucleotídica de la proteína L1 de la cápside del virus del papiloma humano 6 (HPV6), se construyeron plásmidos para expresar L1 de HPV6b, utilizando la secuencia de nucleótidos nativa (p6L1Δ) (SEQ ID NO: 7) o una secuencia modificada para codificar la misma proteína primaria L1, utilizando codones que se encuentran habitualmente en los genes humanos altamente expresados (pH6L1Δ) (SEQ ID NO: 9). Ambas construcciones de genes L1 se truncaron por 33 tripletes de codones en el extremo C-terminal. Esto eliminó una región que codifica las señales de ubicación nuclear de L1¹⁶, lo que permite la adición de secuencias que codifican epítopos de células T definidas a partir de proteínas no estructurales del virus del papiloma (VP) para el efecto terapéutico, mientras que preserva la capacidad de la proteína L1 para formar partículas similares a virus (PSVs)¹⁷.

Los plásmidos se purificaron utilizando un kit Plasmid Mega de Qiagen (Qiagen, Chatsworth, California, EE.UU.) y se disolvieron en solución salina tamponada con fosfato (STF) a una concentración de 1 µg/µl.

Se detectó un anticuerpo conformacional contra HPV6b después de una única inmunización con pH6L1Δ (SEQ ID NO: 9), se administró por vía intracutánea en perlas de oro, y el título de anticuerpo aumentó después de una inmunización adicional (véase la Figura 1a). También se observó un reactivo de anticuerpo con una proteína L1 de HPV6b desnaturalizada, incluso un menor título que el reactivo de anticuerpo con PSVs a HPV6b (véase la Figura 1b). En contraste, no se encontró un anticuerpo específico para PSVs de HPV6b o para L1 de HPV6b desnaturalizado después de la inmunización con el gen L1 modificado sin codones p6L1Δ (SEQ ID NO: 7) (Figuras 1a y 1b). De este modo, una vacuna de polinucleótido de L1 modificada con codones fue significativamente más inmunogénica que el gen nativo, y se indujo predominantemente anticuerpos a epítopos conformacionales del virus. Se obtuvieron también datos similares con plásmidos nativos (SEQ ID NO: 3) y modificados con codones (SEQ ID NO: 5) que expresan una proteína L1 de HPV6b de longitud completa.

Estudios anteriores con vacunas de polinucleótidos de L1 de VP han demostrado que las vacunas no modificadas de codones son relativamente no inmunogénicas, conforme a los hallazgos actuales. La inmunización repetida intranasal de IgG en sueros de ratones inducida por una vacuna de polinucleótidos de L1 de HPV16 y respuestas de IgA vaginales estaban apenas por encima del antecedente, aunque se observó una cierta proliferación celular T y liberación de citoquinas T en los esplenocitos de animales inmunizados expuestos a partículas del antígeno de PSV a L1¹³. La inmunización intravaginal de conejos con ADN de L1 de HPV6b requirió que la toxina del cólera indujera algunos de los anticuerpos de IgA específicos de PSVs en las secreciones vaginales, mientras que los animales inmunizados por vía intramuscular con la misma construcción no tenían anticuerpos específicos de L1 en suero detectable por ELISA y tenían anticuerpos con bajo título por inmunoelectrotransferencia¹⁴. Las vacunas de polinucleótidos de L1 de CRPV son, en contraste con el VPH, inmunogénicas, ya sea administradas por inyección im³² o por vía intradérmica³³. Mientras CRPV es generalmente similar en el uso de codones con respecto a otros genes de VP, el gen L1 de CRPV es relativamente rico en GC con un contenido de GC que se acerca al consenso del genoma de mamíferos (consenso humano 52,5 %; CRPV 47,7 %; HPV6 42,5 %), y varios codones relativamente utilizados con poca frecuencia en los genes de mamíferos son significativamente menos comunes en L1 de CRPV que en BPV1, HPV6 o HPV16 (Tabla 1). Presumiblemente, uno o más de estos codones están mal traducidos en los tipos de células en los que se requiere la expresión de L1 para la inducción de anticuerpos *in vivo*. Adicionalmente, las secuencias de ARN internas inhibitoras a la traducción de genes L1 de VP 34 podrían ser menos inhibitoras en CRPV que en otros genomas de VP.

EJEMPLO 6

Inmunidad humoral en ratones inmunizados con polinucleótidos híbridos L1-E7 quiméricos

Para inducir respuestas inmunitarias que podrían ser terapéuticas, así como profilácticas para la infección por VP, las vacunas quiméricas de polinucleótidos se construyeron mediante la incorporación del gen de la cápside L1 (pH6L1Δ) (SEQ ID NO: 9) con segmentos de E7 (SEQ ID NO: 11 y 13), una proteína no estructural de VP encontrada abundantemente en las células infectadas, se añadió al extremo C-terminal. Los ratones inmunizados con cada una de estas vacunas quiméricas de polinucleótidos de L1 modificadas con codones desarrollaron altos niveles de anticuerpo específico del virus (véase la Figura 1c y 1d). La inducción de la inmunidad específica de E7

por las vacunas quiméricas L1-E7 se sometió a ensayo utilizando células Cos-1 transfectadas con HPV6bE7 como fuente de proteína E7 de HPV6b. La inmunorreactividad con una proteína de 14 kD, que se presupone que era E7, se observó en ratones inmunizados con vacunas quiméricas de polinucleótido L1 que incorporaron la región N- o C-terminal de HPV6bE7 (pH6L1E7.1 o pH6L1E7.2, SEQ ID NO: 11 y 13, respectivamente) (véase la Figura 1f). Como era de esperar, no se apreció reactividad con HPV6bE7 en el suero de ratones inmunizados con pH6L1Δ (SEQ ID NO: 9), o de ratones no inmunizados.

EJEMPLO 7

Inmunidad mediada por células en ratones inmunizados con polinucleótidos híbridos L1-E7 quiméricos

Cuando la intervención terapéutica para VP parece requerir respuestas inmunitarias mediadas por células a las proteínas de VP, a continuación, se midió la inducción de respuestas inmunitarias celulares por las vacunas de polinucleótidos. En primer lugar, se examinó la inducción de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR) en la proteína de la cápside L1. La reacción HTR se ensayó mediante una prueba de tumefacción de la oreja, como se ha descrito previamente⁴⁰, utilizando PSVs L1 de HPV6b purificadas¹¹ como antígeno de desafío. Las respuestas HTR específicas de L1 se observaron para inducirse por la inmunización con pH6L1Δ modificado de codones (SEQ ID NO: 9), y también por las vacunas quiméricas L1 E7 modificadas de codones pH6L1E7.1 y pH6L1E7.2 (SEQ ID NO: 11 y 13, respectivamente), pero no por pH6L1Δ no modificado de codones (SEQ ID NO: 7) o por el vector pCDNA3 (véase la Figura 2a).

La respuesta de linfocito T citotóxico (LTC) inducida a un epítipo de LTC restringido por H-2^b dominante de E7 de HPV16, incorporado en la construcción quimérica modificada de codones pH6L1-16E7 (SEQ ID NO: 19), se descubrió que era relativamente pobre (véase la Figura 2b).

EJEMPLO 8

La ubiquitinación de 6L1 mejora la respuesta de LTC

Para determinar si la ubiquitinación del producto del gen 6L1 modificado de codones podría mejorar la respuesta de LTC, se fabricó una vacuna en la que se insertó una única copia del gen de la ubiquitina, en el marco 5' al gen L1-E7 quimérico modificado de codones (SEQ ID NO: 17).

Los esplenocitos se prepararon a partir de animales inmunizados y la actividad de LTC se evaluó después de una reestimulación *in vitro* de 3 días con rIL-2 (Sigma), y el péptido RAHYNIVTF, como se ha descrito previamente⁴⁴. Las pruebas se realizaron por triplicado, y la liberación espontánea ⁵¹Cr de los diversos objetivos no excedió el 15 %.

Una prueba de ELISPOT modificada⁴¹ se utilizó para detectar células T CD8+ específicas de E7 de HPV16. Las placas de filtración (96 pocillos) (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE.UU.) se recubrieron con 10 µg/ ml de anticuerpo rata anti-IFN-γ de ratón (clon R4-6A2, Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.) en 50 µl de TFS. Después de la incubación durante la noche a 4 °C, los pocillos se lavaron y se bloquearon con medio de cultivo que contenía suero fetal bovino al 10 %. 1 x 10⁶ células de bazo y de ganglios linfáticos aisladas frescas se añadieron al pocillo, junto con 20 U/ml de IL-2. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas con o sin 1 µg/ml de epítipo de LTC H-2D^b específico de E7 de HPV16 E7 (E7, aminoácidos 49-57). Después del cultivo, la placa se lavó y luego fue seguido de incubación con 5 µg/ml de anticuerpo IFN-γ biotinilado (clon XMG1.2, PharMingen, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE.UU.) en 50 µl en TFS a 4 °C durante la noche. Después de lavarse seis veces, se añadieron 1,25 µg/ml de avidina-fosfatasa alcalina (Sigma) en 50 µl de TFS y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se desarrollaron manchas mediante la adición de 50 µl de solución de 5-bromo-4-cloro-3-3-indolilo fosfato/nitroazul de tetrazolio (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana, EE.UU.) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Las manchas se contaron utilizando un microscopio de disección.

La vacuna que contiene ubiquitina, en contraste con la construcción sin ubiquitina, indujo una respuesta de células T CD8 específica de E7 significativa (véase la Figura 2b).

EJEMPLO 9

La respuesta de LTC tras la ubiquitinación es protectora del hospedador

Los ratones se estimularon con un tumor que expresa E7, con el fin de evaluar si la respuesta LTC mejorada observada fue protectora del hospedador. Los ratones se estimularon SC con 2 x 10⁶ células/ células tumorales TC-1 de ratón⁴², del pescuezo, y el peso tumoral se registró 10 días después de la estimulación, como se ha descrito previamente⁴³.

Como puede apreciarse en la Figura 2c, los ratones inmunizados con H6L1-16E7 conjugado con ubiquitina (SEQ ID NO: 17) mostraron una reducción significativa en el peso del tumor, en comparación con los animales inmunizados con la misma construcción sin ubiquitina. Estos datos confirmaron que la respuesta celular inducida fue, de hecho,

protectora del hospedador. De interés, la construcción quimérica conjugada con ubiquitina indujo niveles mínimamente bajos de anticuerpos específicos de VPH (consulte la Figura 1e) en comparación con la construcción sin ubiquitina. Una vacuna de polinucleótido mixta que comprende L1-E7 modificado de codones con y sin ubiquitina se fabricó, por lo tanto, para establecer si la mezcla transmitiría las propiedades de ambos inmunógenos. Los ratones se inmunizaron con la mezcla adquirida tanto del anticuerpo conformacional como no conformacional de L1 (Figura 3 a, b) y desarrollaron células CD8⁺ secretoras de IFN- γ en los ganglios linfáticos y el bazo (Figura 3c), y se protegieron contra la estimulación del tumor (datos no mostrados), confirmando que la respuesta inmunitaria a la vacuna de polinucleótido mixta era como sería de esperar de la respuesta en cada una de las dos partes.

EJEMPLO 10

La vacuna de polinucleótido HPV6bL1 induce anticuerpos neutralizantes

Para confirmar que los diversas construcciones de vacuna L1 modificadas que inducen cada una un anticuerpo neutralizante de VP, se sometieron a ensayo sueros en un ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HAI) mostrados para correlacionarse con la neutralización del virus¹⁸. El método se utilizó como se ha descrito previamente¹⁸. Los sueros de ratones inmunizados con cada una de las construcciones modificadas de codones y quiméricas modificadas de codones mostraron una fuerte actividad HAI (véase la Figura 4), mientras que no se encontró actividad HAI en los sueros de ratones inmunizados con el gen L1 no modificado.

EJEMPLO 11

Anticuerpos anti-BPV1 en ratones inmunizados con una vacuna de polinucleótido L2

Para confirmar un gen de VP cuya inmunogenicidad de una vacuna de polinucleótido podría potenciarse por modificación de codones, se inmunizaron ratones con una vacuna de polinucleótido L2 de BPV1 modificada de codones (SEQ ID NO: 23) o no modificada de codones (SEQ ID NO: 21), o con un gen de fusión L2-HPV16E7 de BPV1, también modificado o sin modificado de codones.

Los ratones se inmunizaron con anticuerpos anti-BPV1 desarrollados con HBL2 (SEQ ID NO: 23) y HBL2E7 modificados de codones, mientras que esto no ocurrió con los ratones inmunizados con un gen L2 no modificado de codones (SEQ ID NO: 21) (véase la Figura 5), lo que confirma que la inmunogenicidad del gen L2 también se mejoró por la modificación de codones.

TABLAS

TABLA 1

<u>Los codones se utilizaron significativamente con menos frecuencia en genes L1 de CRPV que en L1 de VP poco inmunogénicos como vacunas de ADN.</u>				
Codón	Ocurencias en L1			Uso de consenso de mamífero/1.000 codones ¹
	CRPV	HPV6	BPV1	
TTG (Leu)	2	10	7	12,3
TTA (Leu)	3	14	8	7,2
AAT (Asn)	2	4	4	17,1
CGT (Arg)	1	4	2	4,6
1: Los codones que codifican Leu producen 98 de 1.000, Asn 37 de 1.000, y Arg 56 de 1.000 codones cuando se promedian a través de la base de datos GenBank de mamíferos				

Bibliografía

1. Wallin, K.L. *et al.* Type-specific persistence of human papillomavirus DNA before the development of invasive cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 341, 1633-1638 (1999).
2. Kirnbauer, R., Booy, F., Cheng, N., Lowy, D.R. & Schiller, J.T. Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 12180-12184 (1992).
3. Zhou, J., Sun, X.Y., Stenzel, D.J. & Frazer, I.H. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology* 185, 251-257 (1991).
4. Christensen, N.D., Reed, C.A., Cladel, N.M., Han, R. & Kreider, J.W. Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* 70, 960-965 (1996).
5. Carter, J.J. *et al.* Comparison of human papillomavirus types 16, 18, and 6 capsid antibody responses following incident infection. *J. Infect. Dis.* 181, 1911-1919 (2000).

6. Dillner, J. *et al.* Antibodies against linear and conformational epitopes of human papillomavirus type 16 that independently associate with incident cervical cancer. *Int. J. Cancer* 60, 377-382 (1995).
- 5 7. Kimbauer, R. *et al.* A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *JNCI* 86, 494-499 (1994).
8. Frazer, I.H. *et al.* Potential strategies utilised by papillomavirus to evade host immunity. *Immunol. Rev.* 168, 131-142 (1999).
- 10 9. Han, R. *et al.* DNA vaccination prevents and/or delays carcinoma development of papillomavirus-induced skin papillomas on rabbits. *J. Virol.* 74, 9712-9716 (2000).
10. Christensen, N.D., Cladel, N.M., Reed, C.A. & Han, R. Rabbit oral papillomavirus complete genome sequence and immunity following genital infection [In Process Citation]. *Virology* 269, 451-461 (2000).
- 15 11. Zhang, L.F. *et al.* HPV6b virus like particles are potent immunogens without adjuvant in man. *Vaccine* 18, 1051-1058 (2000).
12. Zhou, J., Liu, W.J., Peng, S.W., Sun, X.Y. & Frazer, I.H. Papillomavirus capsid protein expression level depends on the match between codon usage and tRNA availability. *J. Virol.* 73, 4972-4982 (1999).
- 20 13. Dupuy, C., Buzoni-Gatel, D., Touzé, A., Bout, D. & Coursaget, P. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles or with the HPV-16 L1 gene elicits specific cytotoxic T lymphocytes in vaginal draining lymph nodes. *J. Virol.* 73, 9063-9071 (1999).
- 25 14. Schreckenberger, C. *et al.* Induction of an HPV 6bL1-specific mucosal IgA response by DNA immunization. *Vaccine* 19, 227-233 (2000).
15. Hines, J.F., Ghim, S.J. & Jenson, A.B. Prospects for human papillomavirus vaccine development: emerging HPV vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 11, 57-61 (1998).
- 30 16. Zhou, J. *et al.* Identification of the nuclear localization signal of human papillomavirus type 16 L1 protein. *Virology* 185, 625-632 (1991).
17. Muller, M. *et al.* Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* 234, 93-111 (1997).
- 35 18. Roden, R.B.S. *et al.* Papillomavirus L1 capsids agglutinate mouse erythrocytes through a proteinaceous receptor. *J. Virol.* 69, 5147-5151 (1995).
19. Zur Megede, J. *et al.* Increased expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 gag gene. *J. Virol.* 74, 2628-2635 (2000).
- 40 20. Nagata, T., Uchijima, M., Yoshida, A., Kawashima, M. & Koide, Y. Codon optimization effect on translational efficiency of DNA vaccine in mammalian cells: analysis of plasmid DNA encoding a CTL epitope derived from microorganisms. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 445-451 (1999).
- 45 21. Andre, S. *et al.* Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol.* 72, 1497-1503 (1998).
22. Haas, J., Park, E.C. & Seed, B. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Curr. Biol.* 6, 315-324 (1996).
- 50 23. Barry, M.A. & Johnston, S.A. Biological features of genetic immunization. *Vaccine* 15, 788-791 (1997).
24. Donnelly, J.J. *et al.* Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *J. Infect. Dis.* 173, 314-320 (1996).
- 55 25. Sundaram, P., Xiao, W. & Brandsma, J.L. Particle-mediated delivery of recombinant expression vectors to rabbit skin induces high-titered polyclonal antisera (and circumvents purification of a protein immunogen). *Nucleic Acids Res.* 24, 1375-1377 (1996).
- 60 26. Schwartz, S. Cis-acting negative RNA elements on papillomavirus late mRNAs. *Semin. Virol.* 8, 291-300 (1998).
27. Tindle, R.W. Human papillomavirus vaccines for cervical cancer. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 643-650 (1996).
- 65

28. Marais,D., Passmore,J.A., Maclean,J., Rose,R. & Williamson,A.L. *A recombinant human papillomavirus (HPV) type 16 L1-vaccinia virus murine challenge model demonstrates cell-mediated immunity against HPV virus-like particles.* *J. Gen. Virol.* 80, 2471-2475 (1999).

29. De Bruijn,M.L.H. *et al.* *L1-specific protection from tumor challenge elicited by HPV16 virus-like particles.* *Virology* 250, 371-376 (1998).

30. Michalek,M.T., Grant,E.P., Gramm,C., Goldberg,A.L. & Rock,K.L. *A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation.* *Nature* 363, 552-554 (1993).

31. Xiang,R. *et al.* *An autologous oral DNA vaccine protects against murine melanoma.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5492-5497 (2000).

32. Tobery,T.W. & Siliciano,R.F. *Targeting of HIV-1 antigens for rapid intracellular degradation enhances cytotoxic T lymphocyte (CTL) recognition and the induction of de novo CTL responses in vivo after immunization.* *J. Exp. Med.* 185, 909-920 (1997).

33. Wu,Y.Q. & Kipps,T.J. *Deoxyribonucleic acid vaccines encoding antigens with rapid proteasome-dependent degradation are highly efficient inducers of cytolytic T lymphocytes.* *J. Immunol.* 159, 6037-6043 (1997).

34. Tuting,T., Storkus,W.J. & Falo,L.D., Jr. *DNA immunization targeting the skin: molecular control of adaptive immunity.* *J. Invest Dermatol.* 111, 183-188 (1998).

35. Fu,T.M. *et al.* *Induction of MHC class I-restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens.* *Vaccine* 16, 1711-1717 (1998).

36. Tindle, R.W. *et al.* *A vaccine conjugate of 'ISCAR' immunocarrier and peptide epitopes of the E7 cervical cancer-associated protein of human papillomavirus type 16 elicits specific Th1- and Th2-type responses in immunized mice in the absence of oil-based adjuvants.* *Clin. Exp. Immunol.* 101, 265-271 (1995).

37. Peng,S.W., Frazer,I.H., Fernando,G.J. & Zhou,J. *Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway.* *Virology* 240, 147-157 (1998).

38. Favre,M., Breitburd,F., Croissant, O. & Orth,G. *Structural polypeptides of rabbit,bovine, and human papillomaviruses.* *J. Virol.* 15, 1239-1247 (1975).

39. Barnard,P. & McMillan,N.A.J. *The human papillomavirus E7 oncoprotein abrogates signaling mediated by interferon- α .* *Virology* 259, 305-313 (1999).

40. De Moerloose,P.A., Frazer,I.H., Sewell,W.A., Collins,E.J. & Mackay,I.R. *Cell-mediated immunity to hepatitis B virus antigens in mice: correlation of in vivo and in vitro assays.* *Clin. Exp. Immunol.* 64, 285-294 (1986).

41. Miyahira, Y. *et al.* *Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay.* *Journal of Immunological Methods* 181, 45-54 (1995).

42. Lin,K.Y. *et al.* *Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen.* *Cancer Res.* 56, 21-26 (1996).

43. Fernando,G.J.P., Stewart,T.J., Tindle,R.W. & Frazer,I.H. *Th2-type CD4+ cells neither enhance nor suppress antitumor CTL activity in a mouse tumor model.* *J. Immunol.* 161, 2421-2427 (1998).

44. Frazer,I.H. *et al.* *Split tolerance to a viral antigen expressed in thymic epithelium and keratinocytes.* *Eur. J. Immunol.* 28, 2791-2800 (1998).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The University of Queensland (todos los estados designados, excepto Estados Unidos) Ian, Frazer (solamente Estados Unidos)

<120> Nuevas composiciones y usos de las mismas

<130> Ubiquitina

<140> Aún no asignada

<141> 18-04-2002

<150> AU PR4468/01

<151> 18-04-2001

<160> 28

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 231

<212> ADN

<213> Humano

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (231)

<223>

<400> 1

atg	cag	atc	ttc	gtg	aag	act	ctg	act	ggg	aag	acc	atc	acc	ctc	gag	48
Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu	
1				5					10					15		

gtg	gag	ccc	agt	gac	acc	atc	gag	aat	gtc	aag	gca	aag	atc	caa	gat	96
Val	Glu	Pro	Ser	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Ile	Gln	Asp	
			20					25					30			

aag	gaa	ggc	att	cct	cct	gat	cag	cag	agg	ttg	atc	ttt	gcc	gga	aaa	144
Lys	Glu	Gly	Ile	Pro	Pro	Asp	Gln	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Ala	Gly	Lys	
		35					40					45				

cag	ctg	gaa	gat	ggg	cgt	acc	ctg	tct	gac	tac	aac	atc	cag	aaa	gag	192
Gln	Leu	Glu	Asp	Gly	Arg	Thr	Leu	Ser	Asp	Tyr	Asn	Ile	Gln	Lys	Glu	
	50					55					60					

tcc	acc	ttg	cac	ctg	gta	ctc	cgt	ctc	aga	ggg	ggg	tga				231
Ser	Thr	Leu	His	Leu	Val	Leu	Arg	Leu	Arg	Gly	Gly					
65					70					75						

<210> 2

<211> 76

<212> PRT

<213> Humano

<400> 2

Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu
1				5					10					15	

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20 25 30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35 40 45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50 55 60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly
65 70 75

<210> 3
<211> 1503
<212> ADN
<213> Papilomavirus humano de tipo 6b

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1503)
<223>

<400> 3

atg tgg cgg cct agc gac agc aca gta tat gtg cct cct cct aac cct 48
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1 5 10 15

gta tcc aaa gtt gtt gcc acg gat gct tat gtt act cgc acc aac ata 96
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
20 25 30

ttt tat cat gcc agc agt tct aga ctt ctt gca gtg gga cat cct tat 144
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
35 40 45

ttt tcc ata aaa cgg gct aac aaa act gtt gtg cca aag gtg tca gga 192
Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
50 55 60

tat caa tac agg gta ttt aag gtg gtg tta cca gat cct aac aaa ttt 240
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65 70 75 80

gca ttg cct gac tcg tct ctt ttc gat ccc aca aca caa cgt tta gta 288
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
85 90 95

tgg gca tgc aca ggc cta gag gtg ggc agg gga cag cca tta ggt gtg 336
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
100 105 110

ggt gta agt gga cat cct ttc cta aat aaa tat gat gat gtt gaa aat 384
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
115 120 125

ES 2 634 256 T3

tca ggg agt ggt ggt aac cct gga cag gat aac agg gtt aat gta ggt Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly 130 135 140	432
atg gat tat aaa caa aca caa tta tgc atg gtt gga tgt gcc ccc cct Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro 145 150 155 160	480
ttg ggc gag cat tgg ggt aaa ggt aaa cag tgt act aat aca cct gta Leu Gly Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val 165 170 175	528
cag gct ggt gac tgc ccg ccc tta gaa ctt att acc agt gtt ata cag Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln 180 185 190	576
gat ggc gat atg gtt gac aca ggc ttt ggt gct atg aat ttt gct gat Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp 195 200 205	624
ttg cag acc aat aaa tca gat gtt cct att gac ata tgt ggc act aca Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr 210 215 220	672
tgt aaa tat cca gat tat tta caa atg gct gca gac cca tat ggt gat Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp 225 230 235 240	720
aga tta ttt ttt ttt cta cgg aag gaa caa atg ttt gcc aga cat ttt Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe 245 250 255	768
ttt aac agg gct ggc gag gtg ggg gaa cct gtg cct gat aca ctt ata Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile 260 265 270	816
att aag ggt agt gga aat cgc acg tct gta ggg agt agt ata tat gtt Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val 275 280 285	864
aac acc ccg agc ggc tct ttg gtg tcc tct gag gca caa ttg ttt aat Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn 290 295 300	912
aag cca tat tgg cta caa aaa gcc cag gga cat aac aat ggt att tgt Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys 305 310 315 320	960
tgg ggt aat caa ctg ttt gtt act gtg gta gat acc aca cgc agt acc Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr 325 330 335	1008
aac atg aca tta tgt gca tcc gta act aca tct tcc aca tac acc aat Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn 340 345 350	1056
tct gat tat aaa gag tac atg cgt cat gtg gaa gag tat gat tta caa Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln 355 360 365	1104
ttt att ttt caa tta tgt agc att aca ttg tct gct gaa gta atg gcc Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala 1152	

370	375	380	
tat att cac aca atg aat ccc tct gtt ttg gaa gac tgg aac ttt ggg			1200
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly			
385	390	395	400
tta tct cct ccc cca aat ggt aca tta gaa gat acc tat agg tat gtg			1248
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val			
	405	410	415
cag tca cag gcc att acc tgt caa aag ccc act cct gaa aag gaa aag			1296
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys			
	420	425	430
cca gat ccc tat aag aac ctt agt ttt tgg gag gtt aat tta aaa gaa			1344
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu			
	435	440	445
aag ttt tct agt gaa ttg gat cag tat cct ttg gga cgc aag ttt ttg			1392
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu			
	450	455	460
tta caa agt gga tat agg gga cgg tcc tct att cgt aca ggt gtt aag			1440
Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys			
	465	470	475
cgc cct gct gtt tcc aaa gcc tct gct gcc cct aaa cgt aag cgc gcc			1488
Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala			
	485	490	495
aaa act aaa agg taa			1503
Lys Thr Lys Arg			
	500		

<210> 4
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus humano de tipo 6b

<400> 4

Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1 5 10 15
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
20 25 30
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
35 40 45
Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
50 55 60
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65 70 75 80

ES 2 634 256 T3

Ala	Leu	Pro	Asp	Ser	Ser	Leu	Phe	Asp	Pro	Thr	Thr	Gln	Arg	Leu	Val	85	90	95
Trp	Ala	Cys	Thr	Gly	Leu	Glu	Val	Gly	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	100	105	110
Gly	Val	Ser	Gly	His	Pro	Phe	Leu	Asn	Lys	Tyr	Asp	Asp	Val	Glu	Asn	115	120	125
Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Asn	Pro	Gly	Gln	Asp	Asn	Arg	Val	Asn	Val	Gly	130	135	140
Met	Asp	Tyr	Lys	Gln	Thr	Gln	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Cys	Ala	Pro	Pro	145	150	155
Leu	Gly	Glu	His	Trp	Gly	Lys	Gly	Lys	Gln	Cys	Thr	Asn	Thr	Pro	Val	165	170	175
Gln	Ala	Gly	Asp	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr	Ser	Val	Ile	Gln	180	185	190
Asp	Gly	Asp	Met	Val	Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Asn	Phe	Ala	Asp	195	200	205
Leu	Gln	Thr	Asn	Lys	Ser	Asp	Val	Pro	Ile	Asp	Ile	Cys	Gly	Thr	Thr	210	215	220
Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met	Ala	Ala	Asp	Pro	Tyr	Gly	Asp	225	230	235
Arg	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Arg	Lys	Glu	Gln	Met	Phe	Ala	Arg	His	Phe	245	250	255
Phe	Asn	Arg	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Ile	260	265	270
Ile	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	275	280	285
Asn	Thr	Pro	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn	290	295	300
Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu	Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	305	310	315
Trp	Gly	Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	325	330	335

ES 2 634 256 T3

Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
340 345 350

Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
355 360 365

Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
370 375 380

Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
385 390 395 400

Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
405 410 415

Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
420 425 430

Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
435 440 445

Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
450 455 460

Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys
465 470 475 480

Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala
485 490 495

Lys Thr Lys Arg
500

<210> 5
<211> 1503
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1503)
<223>

<400> 5

atg tgg cgc ccc agc gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1 5 10 15

48

ES 2 634 256 T3

gtg tcc aag gtg gtg gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile 20 25 30	96
ttc tac cac gcc agc agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr 35 40 45	144
ttc ttc atc aag cgc gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly 50 55 60	192
tac cag tac agg gtg ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe 65 70 75 80	240
gcc ctg ccc gac tcc tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val 85 90 95	288
tgg gcc tgc acc ggc ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val 100 105 110	336
ggc gtg agc ggc cac ccc ttc ctg aac aag tac gac gac gtg gag aac Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn 115 120 125	384
tcc ggg agc ggc ggc aac ccc ggc cag gac aac agg gtg aac gtg ggc Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly 130 135 140	432
atg gac tac aag cag acc cag ctg tgc atg gtg ggc tgt gcc ccc ccc Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro 145 150 155 160	480
ctg tgc gag cac tgg ggc aag ggc aag cag tgt acc aac acc ccc gtg Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val 165 170 175	528
cag gcc ggc gac tgc ccc ccc ctg gag ctg atc acc agc gtg atc cag Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln 180 185 190	576
gac ggc gac atg gtg gac acc ggc ttc ggc gcc atg aac ttc gcc gac Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp 195 200 205	624
ctg cag acc aac aag tcc gac gtg ccc atc gac atc tgt ggc acc acc Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr 210 215 220	672
tgt aag tac ccc gac tac ctg cag atg gcc gcc gac ccc tac ggc gac Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp 225 230 235 240	720
agg ctg ttc ttc ttc ctg cgc aag gag cag atg ttc gcc agg cac ttc Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe 245 250 255	768
ttc aac agg gcc ggc gag gtg ggc gag ccc gtg ccc gac acc ctg atc Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile	816

260	265	270	
atc aag ggc agc ggc aac cgc acc tcc gtg ggg agc agc atc tac gtg Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val 275 280 285			864
aac acc ccc agc ggc tcc ctg gtg tcc tcc gag gcc cag ctg ttc aac Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn 290 295 300			912
aag ccc tac tgg ctg cag aag gcc cag ggc cac aac aac ggc atc tgt Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys 305 310 315 320			960
tgg ggc aac cag ctg ttc gtg acc gtg gtg gac acc acc cgc agc acc Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr 325 330 335			1008
aac atg acc ctg tgt gcc tcc gtg acc acc tcc tcc acc tac acc aac Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn 340 345 350			1056
tcc gac tac aag gag tac atg cgc cac gtg gag gag tac gac ctg cag Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln 355 360 365			1104
ttc atc ttc cag ctg tgt agc atc acc ctg tcc gcc gag gtg atg gcc Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala 370 375 380			1152
tac atc cac acc atg aac ccc tcc gtg ctg gag gac tgg aac ttc ggg Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly 385 390 395 400			1200
ctg tcc ccc ccc ccc aac ggc acc ctg gag gac acc tac agg tac gtg Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val 405 410 415			1248
cag tcc cag gcc atc acc tgt cag aag ccc acc ccc gag aag gag aag Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys 420 425 430			1296
ccc gac ccc tac aag aac ctg agc ttc tgg gag gtg aac ctg aag gag Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu 435 440 445			1344
aag ttc tcc agc gag ctg gac cag tac ccc ctg ggc cgc aag ttc ctg Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu 450 455 460			1392
ctg cag agc ggc tac agg ggc cgc tcc tcc atc cgc acc ggc gtg aag Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys 465 470 475 480			1440
cgc ccc gcc gtg tcc aag gcc tcc gcc gcc ccc aag cgc aag cgc gcc Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala 485 490 495			1488
aag acc aag agg taa Lys Thr Lys Arg 500			1503

ES 2 634 256 T3

<210> 6
<211> 500
<212> PRT
<213> Sintético

5

<400> 6

```

Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1          5          10          15

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

Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
35          40          45

Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
50          55          60

Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65          70          75          80

Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
85          90          95

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
100         105         110

Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
115         120         125

Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
130         135         140

Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
145         150         155         160

Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
165         170         175

Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
180         185         190

Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
195         200         205

Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
210         215         220

```

ES 2 634 256 T3

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

ES 2 634 256 T3

Leu Gln Ser Gly Tyr Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys
465 470 475 480

Arg Pro Ala Val Ser Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala
485 490 495

Lys Thr Lys Arg
500

<210> 7
<211> 1404
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1404)
<223>

<400> 7

atg tgg cgg cct agc gac agc aca gta tat gtg cct cct cct aac cct	48
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro	
1 5 10 15	
gta tcc aaa gtt gtt gcc acg gat gct tat gtt act cgc acc aac ata	96
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile	
20 25 30	
ttt tat cat gcc agc agt tct aga ctt ctt gca gtg gga cat cct tat	144
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr	
35 40 45	
ttt tcc ata aaa cgg gct aac aaa act gtt gtg cca aag gtg tca gga	192
Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly	
50 55 60	
tat caa tac agg gta ttt aag gtg gtg tta cca gat cct aac aaa ttt	240
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe	
65 70 75 80	
gca ttg cct gac tcg tct ctt ttc gat ccc aca aca caa cgt tta gta	288
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val	
85 90 95	
tgg gca tgc aca ggc cta gag gtg ggc agg gga cag cca tta ggt gtg	336
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val	
100 105 110	
ggt gta agt gga cat cct ttc cta aat aaa tat gat gat gtt gaa aat	384
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn	
115 120 125	
tca ggg agt ggt ggt aac cct gga cag gat aac agg gtt aat gta ggt	432
Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly	
130 135 140	
atg gat tat aaa caa aca caa tta tgc atg gtt gga tgt gcc ccc cct	480
Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro	

ES 2 634 256 T3

145											150											155											160											
ttg ggc gag cat	165	tgg ggt aaa ggt	170	aaa cag tgt act aat aca cct gta	528																																							
Leu Gly Glu His	Trp Gly Lys Gly Lys	Gln Cys Thr Asn Thr	Pro Val																																									
cag gct ggt gac	180	tgc ccg ccc tta gaa ctt att acc agt gtt ata cag	576																																									
Gln Ala Gly Asp	Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln																																											
gat ggc gat atg gtt gac aca ggc ttt ggt gct atg aat ttt gct gat	624																																											
Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp																																												
ttg cag acc aat aaa tca gat gtt cct att gac ata tgt ggc act aca	672																																											
Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr																																												
tgt aaa tat cca gat tat tta caa atg gct gca gac cca tat ggt gat	720																																											
Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp																																												
aga tta ttt ttt ttt cta cgg aag gaa caa atg ttt gcc aga cat ttt	768																																											
Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe																																												
ttt aac agg gct ggc gag gtg ggg gaa cct gtg cct gat aca ctt ata	816																																											
Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile																																												
att aag ggt agt gga aat cgc acg tct gta ggg agt agt ata tat gtt	864																																											
Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val																																												
aac acc ccg agc ggc tct ttg gtg tcc tct gag gca caa ttg ttt aat	912																																											
Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn																																												
aag cca tat tgg cta caa aaa gcc cag gga cat aac aat ggt att tgt	960																																											
Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys																																												
tgg ggt aat caa ctg ttt gtt act gtg gta gat acc aca cgc agt acc	1008																																											
Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr																																												
aac atg aca tta tgt gca tcc gta act aca tct tcc aca tac acc aat	1056																																											
Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn																																												
tct gat tat aaa gag tac atg cgt cat gtg gaa gag tat gat tta caa	1104																																											
Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln																																												
ttt att ttt caa tta tgt agc att aca ttg tct gct gaa gta atg gcc	1152																																											
Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala																																												
tat att cac aca atg aat ccc tct gtt ttg gaa gac tgg aac ttt ggg	1200																																											
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly																																												

```

tta tgc cct ccc cca aat ggt aca tta gaa gat acc tat agg tat gtg      1248
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
                                405                                410                                415

cag tca cag gcc att acc tgt caa aag ccc act cct gaa aag gaa aag      1296
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
                                420                                425                                430

cca gat ccc tat aag aac ctt agt ttt tgg gag gtt aat tta aaa gaa      1344
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
                                435                                440                                445

aag ttt tct agt gaa ttg gat cag tat cct ttg gga cgc aag ttt ttg      1392
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
                                450                                455                                460

tta caa agt taa
Leu Gln Ser
465

```

<210> 8
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Sintético

5

```

<400> 8
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1                                5                                10                                15

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

Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
35                                40                                45

Phe Ser Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
50                                55                                60

Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65                                70                                75                                80

Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
85                                90                                95

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
100                               105                               110

Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
115                               120                               125

Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
130                               135                               140

```

ES 2 634 256 T3

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

ES 2 634 256 T3

Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
385 390 395 400

Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
405 410 415

Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
420 425 430

Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
435 440 445

Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
450 455 460

Leu Gln Ser
465

<210> 9
<211> 1404
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1404)
<223>

<400> 9
atg tgg cgc ccc agc gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc 48
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1 5 10 15
gtg tcc aag gtg gtg gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc 96
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
20 25 30
ttc tac cac gcc agc agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac 144
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
35 40 45
ttc ttc atc aag cgc gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc 192
Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
50 55 60
tac cag tac agg gtg ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc 240
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65 70 75 80
gcc ctg ccc gac tcc tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg 288
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
85 90 95
tgg gcc tgc acc ggc ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg 336
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val

ES 2 634 256 T3

100					105					110						
ggc	gtg	agc	ggc	ca ^c	ccc	ttc	ctg	aac	aag	tac	gac	gac	gtg	gag	aac	384
Gly	Val	Ser	Gly	His	Pro	Phe	Leu	Asn	Lys	Tyr	Asp	Asp	Val	Glu	Asn	
		115					120					125				
tcc	ggg	agc	ggc	ggc	aac	ccc	ggc	cag	gac	aac	agg	gtg	aac	gtg	ggc	432
Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Asn	Pro	Gly	Gln	Asp	Asn	Arg	Val	Asn	Val	Gly	
	130					135					140					
atg	gac	tac	aag	cag	acc	cag	ctg	tgc	atg	gtg	ggc	tgt	gcc	ccc	ccc	480
Met	Asp	Tyr	Lys	Gln	Thr	Gln	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Cys	Ala	Pro	Pro	
145					150					155					160	
ctg	tgc	gag	cac	tgg	ggc	aag	ggc	aag	cag	tgt	acc	aac	acc	ccc	gtg	528
Leu	Cys	Glu	His	Trp	Gly	Lys	Gly	Lys	Gln	Cys	Thr	Asn	Thr	Pro	Val	
				165					170					175		
cag	gcc	ggc	gac	tgc	ccc	ccc	ctg	gag	ctg	atc	acc	agc	gtg	atc	cag	576
Gln	Ala	Gly	Asp	Cys	Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr	Ser	Val	Ile	Gln	
			180					185					190			
gac	ggc	gac	atg	gtg	gac	acc	ggc	ttc	ggc	gcc	atg	aac	ttc	gcc	gac	624
Asp	Gly	Asp	Met	Val	Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Asn	Phe	Ala	Asp	
		195					200					205				
ctg	cag	acc	aac	aag	tcc	gac	gtg	ccc	atc	gac	atc	tgt	ggc	acc	acc	672
Leu	Gln	Thr	Asn	Lys	Ser	Asp	Val	Pro	Ile	Asp	Ile	Cys	Gly	Thr	Thr	
	210					215					220					
tgt	aag	tac	ccc	gac	tac	ctg	cag	atg	gcc	gcc	gac	ccc	tac	ggc	gac	720
Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Leu	Gln	Met	Ala	Ala	Asp	Pro	Tyr	Gly	Asp	
225					230					235					240	
agg	ctg	ttc	ttc	ttc	ctg	cgc	aag	gag	cag	atg	ttc	gcc	agg	cac	ttc	768
Arg	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Arg	Lys	Glu	Gln	Met	Phe	Ala	Arg	His	Phe	
				245					250					255		
ttc	aac	agg	gcc	ggc	gag	gtg	ggg	gag	ccc	gtg	ccc	gac	acc	ctg	atc	816
Phe	Asn	Arg	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Ile	
			260					265					270			
atc	aag	ggc	agc	ggc	aac	cgc	acc	tcc	gtg	ggg	agc	agc	atc	tac	gtg	864
Ile	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	
		275					280					285				
aac	acc	ccc	agc	ggc	tcc	ctg	gtg	tcc	tcc	gag	gcc	cag	ctg	ttc	aac	912
Asn	Thr	Pro	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn	
	290					295					300					
aag	ccc	tac	tgg	ctg	cag	aag	gcc	cag	ggc	cac	aac	aac	ggc	atc	tgt	960
Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu	Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	
305					310					315					320	
tgg	ggc	aac	cag	ctg	ttc	gtg	acc	gtg	gtg	gac	acc	acc	cgc	agc	acc	1008
Trp	Gly	Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	
				325					330					335		
aac	atg	acc	ctg	tgt	gcc	tcc	gtg	acc	acc	tcc	tcc	acc	tac	acc	aac	1056
Asn	Met	Thr	Leu	Cys	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Asn	
			340					345					350			

ES 2 634 256 T3

tcc gac tac aag gag tac atg cgc cac gtg gag gag tac gac ctg cag	1104
Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln	
355 360 365	
ttc atc ttc cag ctg tgt agc atc acc ctg tcc gcc gag gtg atg gcc	1152
Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala	
370 375 380	
tac atc cac acc atg aac ccc tcc gtg ctg gag gac tgg aac ttc ggg	1200
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly	
385 390 395 400	
ctg tcc ccc ccc ccc aac ggc acc ctg gag gac acc tac agg tac gtg	1248
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val	
405 410 415	
cag tcc cag gcc atc acc tgt cag aag ccc acc ccc gag aag gag aag	1296
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys	
420 425 430	
ccc gac ccc tac aag aac ctg agc ttc tgg gag gtg aac ctg aag gag	1344
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu	
435 440 445	
aag ttc tcc agc gag ctg gac cag tac ccc ctg ggc cgc aag ttc ctg	1392
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu	
450 455 460	
ctg cag agc taa	1404
Leu Gln Ser	
465	

<210> 10
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Sintético

5

<400> 10

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

ES 2 634 256 T3

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110

Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
 115 120 125

Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
 130 135 140

Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
 145 150 155 160

Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
 165 170 175

Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
 180 185 190

Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
 195 200 205

Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
 210 215 220

Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
 225 230 235 240

Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
 245 250 255

Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
 260 265 270

Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
 275 280 285

Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn
 290 295 300

Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
 305 310 315 320

Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
 325 330 335

ES 2 634 256 T3

Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
340 345 350

Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
355 360 365

Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
370 375 380

Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
385 390 395 400

Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
405 410 415

Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
420 425 430

Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
435 440 445

Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
450 455 460

Leu Gln Ser
465

<210> 11
<211> 1554
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1554)
<223>

<400> 11

atg tgg cgc ccc agc gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc	48
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro	
1 5 10 15	
gtg tcc aag gtg gtg gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc	96
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile	
20 25 30	
ttc tac cac gcc agc agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac	144
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr	
35 40 45	
ttc ttc atc aag cgc gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc	192
Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly	

ES 2 634 256 T3

50	55	60	
tac cag tac agg gtg ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc			240
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe			
65	70	75	80
gcc ctg ccc gac tcc tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg			288
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val			
	85	90	95
tgg gcc tgc acc ggc ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg			336
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val			
	100	105	110
ggc gtg agc ggc cac ccc ttc ctg aac aag tac gac gac gtg gag aac			384
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn			
	115	120	125
tcc ggg agc ggc ggc aac ccc ggc cag gac aac agg gtg aac gtg ggc			432
Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly			
	130	135	140
atg gac tac aag cag acc cag ctg tgc atg gtg ggc tgt gcc ccc ccc			480
Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro			
	145	150	155
ctg tgc gag cac tgg ggc aag ggc aag cag tgt acc aac acc ccc gtg			528
Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val			
	165	170	175
cag gcc ggc gac tgc ccc ccc ctg gag ctg atc acc agc gtg atc cag			576
Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln			
	180	185	190
gac ggc gac atg gtg gac acc ggc ttc ggc gcc atg aac ttc gcc gac			624
Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp			
	195	200	205
ctg cag acc aac aag tcc gac gtg ccc atc gac atc tgt ggc acc acc			672
Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr			
	210	215	220
tgt aag tac ccc gac tac ctg cag atg gcc gcc gac ccc tac ggc gac			720
Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp			
	225	230	235
agg ctg ttc ttc ttc ctg cgc aag gag cag atg ttc gcc agg cac ttc			768
Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe			
	245	250	255
ttc aac agg gcc ggc gag gtg ggc gag ccc gtg ccc gac acc ctg atc			816
Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile			
	260	265	270
atc aag ggc agc ggc aac cgc acc tcc gtg ggc agc agc atc tac gtg			864
Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val			
	275	280	285
aac acc ccc agc ggc tcc ctg gtg tcc tcc gag gcc cag ctg ttc aac			912
Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn			
	290	295	300

ES 2 634 256 T3

aag ccc tac tgg ctg cag aag gcc cag ggc cac aac aac ggc atc tgt	960
Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys	
305 310 315 320	
tgg ggc aac cag ctg ttc gtg acc gtg gtg gac acc acc cgc agc acc	1008
Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr	
325 330 335	
aac atg acc ctg tgt gcc tcc gtg acc acc tcc tcc acc tac acc aac	1056
Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn	
340 345 350	
tcc gac tac aag gag tac atg cgc cac gtg gag gag tac gac ctg cag	1104
Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln	
355 360 365	
ttc atc ttc cag ctg tgt agc atc acc ctg tcc gcc gag gtg atg gcc	1152
Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala	
370 375 380	
tac atc cac acc atg aac ccc tcc gtg ctg gag gac tgg aac ttc ggg	1200
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly	
385 390 395 400	
ctg tcc ccc ccc ccc aac ggc acc ctg gag gac acc tac agg tac gtg	1248
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val	
405 410 415	
cag tcc cag gcc atc acc tgt cag aag ccc acc ccc gag aag gag aag	1296
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys	
420 425 430	
ccc gac ccc tac aag aac ctg agc ttc tgg gag gtg aac ctg aag gag	1344
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu	
435 440 445	
aag ttc tcc agc gag ctg gac cag tac ccc ctg ggc cgc aag ttc ctg	1392
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu	
450 455 460	
ctg cag agc cat ggc agg acc gtg acc ctg aag gac atc gtg ctg gac	1440
Leu Gln Ser His Gly Arg Thr Val Thr Leu Lys Asp Ile Val Leu Asp	
465 470 475 480	
ctg cag ccc ccc gac ccc gtg ggg ctg cac tgc tac gag cag ctg gtg	1488
Leu Gln Pro Pro Asp Pro Val Gly Leu His Cys Tyr Glu Gln Leu Val	
485 490 495	
gac agc tcc gag gac gag gtg gac gag gtg gac ggc cag gac tcc cag	1536
Asp Ser Ser Glu Asp Glu Val Asp Glu Val Asp Gly Gln Asp Ser Gln	
500 505 510	
ccc ctg aag cag cac taa	1554
Pro Leu Lys Gln His	
515	

<210> 12
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Sintético

ES 2 634 256 T3

<400> 12

```

Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1          5          10          15

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

Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
          35          40          45

Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
          50          55          60

Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
65          70          75          80

Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
          85          90          95

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
          100          105          110

Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
          115          120          125

Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
          130          135          140

Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
145          150          155          160

Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
          165          170          175

Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
          180          185          190

Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
          195          200          205

Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
          210          215          220

Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
225          230          235          240

```

ES 2 634 256 T3

Arg	Leu	Phe	Phe	Leu	Arg	Lys	Glu	Gln	Met	Phe	Ala	Arg	His	Phe	
			245					250					255		
Phe	Asn	Arg	Ala	Gly	Glu	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Ile
			260					265					270		
Ile	Lys	Gly	Ser	Gly	Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val
		275					280					285			
Asn	Thr	Pro	Ser	Gly	Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn
	290					295					300				
Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu	Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys
305					310					315					320
Trp	Gly	Asn	Gln	Leu	Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr
				325					330					335	
Asn	Met	Thr	Leu	Cys	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Asn
			340					345					350		
Ser	Asp	Tyr	Lys	Glu	Tyr	Met	Arg	His	Val	Glu	Glu	Tyr	Asp	Leu	Gln
		355					360					365			
Phe	Ile	Phe	Gln	Leu	Cys	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Ala
	370					375					380				
Tyr	Ile	His	Thr	Met	Asn	Pro	Ser	Val	Leu	Glu	Asp	Trp	Asn	Phe	Gly
385					390					395					400
Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	Tyr	Arg	Tyr	Val
				405					410					415	
Gln	Ser	Gln	Ala	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Pro	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys
			420					425					430		
Pro	Asp	Pro	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ser	Phe	Trp	Glu	Val	Asn	Leu	Lys	Glu
		435					440					445			
Lys	Phe	Ser	Ser	Glu	Leu	Asp	Gln	Tyr	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Phe	Leu
	450					455					460				
Leu	Gln	Ser	His	Gly	Arg	Thr	Val	Thr	Leu	Lys	Asp	Ile	Val	Leu	Asp
465					470					475					480
Leu	Gln	Pro	Pro	Asp	Pro	Val	Gly	Leu	His	Cys	Tyr	Glu	Gln	Leu	Val
				485					490					495	

ES 2 634 256 T3

Asp Ser Ser Glu Asp Glu Val Asp Glu Val Asp Gly Gln Asp Ser Gln
500 505 510

Pro Leu Lys Gln His
515

<210> 13
<211> 1554
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1554)
<223>

<400> 13

atg tgg cgc ccc agc gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc	48
Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro	
1 5 10 15	
gtg tcc aag gtg gtg gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc	96
Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile	
20 25 30	
ttc tac cac gcc agc agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac	144
Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr	
35 40 45	
ttc ttc atc aag cgc gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc	192
Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly	
50 55 60	
tac cag tac agg gtg ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc	240
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe	
65 70 75 80	
gcc ctg ccc gac tcc tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg	288
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val	
85 90 95	
tgg gcc tgc acc ggc ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg	336
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val	
100 105 110	
ggc gtg agc ggc cac ccc ttc ctg aac aag tac gac gac gtg gag aac	384
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn	
115 120 125	
tcc ggg agc ggc ggc aac ccc ggc cag gac aac agg gtg aac gtg ggc	432
Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly	
130 135 140	
atg gac tac aag cag acc cag ctg tgc atg gtg ggc tgt gcc ccc ccc	480
Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro	
145 150 155 160	

ES 2 634 256 T3

ctg tgc gag cac tgg ggc aag ggc aag cag tgt acc aac acc ccc gtg Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val 165 170 175	528
cag gcc ggc gac tgc ccc ccc ctg gag ctg atc acc agc gtg atc cag Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln 180 185 190	576
gac ggc gac atg gtg gac acc ggc ttc ggc gcc atg aac ttc gcc gac Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp 195 200 205	624
ctg cag acc aac aag tcc gac gtg ccc atc gac atc tgt ggc acc acc Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr 210 215 220	672
tgt aag tac ccc gac tac ctg cag atg gcc gcc gac ccc tac ggc gac Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp 225 230 235 240	720
agg ctg ttc ttc ttc ctg cgc aag gag cag atg ttc gcc agg cac ttc Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe 245 250 255	768
ttc aac agg gcc ggc gag gtg ggc gag ccc gtg ccc gac acc ctg atc Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile 260 265 270	816
atc aag ggc agc ggc aac cgc acc tcc gtg ggc agc agc atc tac gtg Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val 275 280 285	864
aac acc ccc agc ggc tcc ctg gtg tcc tcc gag gcc cag ctg ttc aac Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn 290 295 300	912
aag ccc tac tgg ctg cag aag gcc cag ggc cac aac aac ggc atc tgt Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys 305 310 315 320	960
tgg ggc aac cag ctg ttc gtg acc gtg gtg gac acc acc cgc agc acc Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr 325 330 335	1008
aac atg acc ctg tgt gcc tcc gtg acc acc tcc tcc acc tac acc aac Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn 340 345 350	1056
tcc gac tac aag gag tac atg cgc cac gtg gag gag tac gac ctg cag Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln 355 360 365	1104
ttc atc ttc cag ctg tgt agc atc acc ctg tcc gcc gag gtg atg gcc Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala 370 375 380	1152
tac atc cac acc atg aac ccc tcc gtg ctg gag gac tgg aac ttc ggc Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly 385 390 395 400	1200
ctg tcc ccc ccc ccc aac ggc acc ctg gag gac acc tac agg tac gtg Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val	1248

ES 2 634 256 T3

405										410					415					
cag	tcc	cag	gcc	atc	acc	tgt	cag	aag	ccc	acc	ccc	gag	aag	gag	aag		1296			
Gln	Ser	Gln	Ala	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Pro	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys					
			420					425					430							
ccc	gac	ccc	tac	aag	aac	ctg	agc	ttc	tgg	gag	gtg	aac	ctg	aag	gag		1344			
Pro	Asp	Pro	Tyr	Lys	Asn	Leu	Ser	Phe	Trp	Glu	Val	Asn	Leu	Lys	Glu					
		435					440					445								
aag	ttc	tcc	agc	gag	ctg	gac	cag	tac	ccc	ctg	ggc	cgc	aag	ttc	ctg		1392			
Lys	Phe	Ser	Ser	Glu	Leu	Asp	Gln	Tyr	Pro	Leu	Gly	Arg	Lys	Phe	Leu					
	450					455					460									
ctg	cag	agc	cat	ggg	cac	ttc	cag	atc	gtg	acc	tgt	tgc	tgt	ggc	tgt		1440			
Leu	Gln	Ser	His	Gly	His	Phe	Gln	Ile	Val	Thr	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys					
465					470					475					480					
gac	agc	aac	gtg	cgc	ctg	gtg	gtg	cag	tgt	acc	gag	acc	gac	atc	agg		1488			
Asp	Ser	Asn	Val	Arg	Leu	Val	Val	Gln	Cys	Thr	Glu	Thr	Asp	Ile	Arg					
			485					490						495						
gag	gtg	cag	cag	ctg	ctg	ctg	ggc	acc	ctg	aac	atc	gtg	tgt	ccc	atc		1536			
Glu	Val	Gln	Gln	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Leu	Asn	Ile	Val	Cys	Pro	Ile					
			500					505					510							
tgc	gcc	ccc	aag	acc	taa												1554			
Cys	Ala	Pro	Lys	Thr																
		515																		

<210> 14
 <211> 517
 <212> PRT
 <213> Sintético

<400> 14

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

ES 2 634 256 T3

Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110
 Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
 115 120 125
 Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
 130 135 140
 Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
 165 170 175
 Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
 180 185 190
 Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
 195 200 205
 Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
 210 215 220
 Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
 225 230 235 240
 Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
 245 250 255
 Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
 260 265 270
 Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
 275 280 285
 Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn
 290 295 300
 Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys
 305 310 315 320
 Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr
 325 330 335
 Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn
 340 345 350

ES 2 634 256 T3

Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln
355 360 365

Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala
370 375 380

Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly
385 390 395 400

Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val
405 410 415

Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys
420 425 430

Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu
435 440 445

Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu
450 455 460

Leu Gln Ser His Gly His Phe Gln Ile Val Thr Cys Cys Cys Gly Cys
465 470 475 480

Asp Ser Asn Val Arg Leu Val Val Gln Cys Thr Glu Thr Asp Ile Arg
485 490 495

Glu Val Gln Gln Leu Leu Leu Gly Thr Leu Asn Ile Val Cys Pro Ile
500 505 510

Cys Ala Pro Lys Thr
515

<210> 15
<211> 1728
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. 1728)
<223>

<400> 15

atg cag atc ttc gtg aag acc ctg acc ggg aag acc atc acc ctg gag
Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

48

gtg gag ccc tcc gac acc atc gag aac gtg aag gcc aag atc cag gac Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp	96
20 25 30	
aag gag ggc atc ccc ccc gac cag cag agg ctg atc ttc gcc ggc aag Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys	144
35 40 45	
cag ctg gag gac ggc cgc acc ctg tcc gac tac aac atc cag aag gag Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu	192
50 55 60	
tcc acc ctg cac ctg gtg ctg agg ctg cgc ggc gcc tgg cgc ccc agc Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala Trp Arg Pro Ser	240
65 70 75 80	
gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc gtg tcc aag gtg gtg Asp Ser Thr Val Tyr 85 Val Pro Pro Pro Asn Pro Val Ser Lys Val Val	288
90 95	
gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc ttc tac cac gcc agc Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr His Ala Ser	336
100 105 110	
agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac ttc ttc atc aag cgc Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Phe Ile Lys Arg	384
115 120 125	
gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc tac cag tac agg gtg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly Tyr Gln Tyr Arg Val	432
130 135 140	
ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc gcc ctg ccc gac tcc Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Ala Leu Pro Asp Ser	480
145 150 155 160	
tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg tgg gcc tgc acc ggc Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Thr Gly	528
165 170 175	
ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg ggc gtg agc ggc cac Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val Gly Val Ser Gly His	576
180 185 190	
ccc ttc ctg aac aag tac gac gac gtg gag aac tcc ggg agc ggc ggc Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn Ser Gly Ser Gly Gly	624
195 200 205	
aac ccc ggc cag gac aac agg gtg aac gtg ggc atg gac tac aag cag Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly Met Asp Tyr Lys Gln	672
210 215 220	
acc cag ctg tgc atg gtg ggc tgt gcc ccc ccc ctg tgc gag cac tgg Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro Leu Cys Glu His Trp	720
225 230 235 240	
ggc aag ggc aag cag tgt acc aac acc ccc gtg cag gcc ggc gac tgc Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val Gln Ala Gly Asp Cys	768
245 250 255	
ccc ccc ctg gag ctg atc acc agc gtg atc cag gac ggc gac atg gtg Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val	816

ES 2 634 256 T3

260										265										270										
gac	acc	ggc	ttc	ggc	gcc	atg	aac	ttc	gcc	gac	ctg	cag	acc	aac	aag															864
Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Asn	Phe	Ala	Asp	Leu	Gln	Thr	Asn	Lys															
		275					280					285																		
tcc	gac	gtg	ccc	atc	gac	atc	tgt	ggc	acc	acc	tgt	aag	tac	ccc	gac															912
Ser	Asp	Val	Pro	Ile	Asp	Ile	Cys	Gly	Thr	Thr	Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp															
		290					295					300																		
tac	ctg	cag	atg	gcc	gcc	gac	ccc	tac	ggc	gac	agg	ctg	ttc	ttc	ttc															960
Tyr	Leu	Gln	Met	Ala	Ala	Asp	Pro	Tyr	Gly	Asp	Arg	Leu	Phe	Phe	Phe															
		305				310					315																			
ctg	cgc	aag	gag	cag	atg	ttc	gcc	agg	cac	ttc	ttc	aac	agg	gcc	ggc															1008
Leu	Arg	Lys	Glu	Gln	Met	Phe	Ala	Arg	His	Phe	Phe	Asn	Arg	Ala	Gly															
				325					330						335															
gag	gtg	ggg	gag	ccc	gtg	ccc	gac	acc	ctg	atc	atc	aag	ggc	agc	ggc															1056
Glu	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Ile	Ile	Lys	Gly	Ser	Gly															
			340						345						350															
aac	cgc	acc	tcc	gtg	ggg	agc	agc	atc	tac	gtg	aac	acc	ccc	agc	ggc															1104
Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	Asn	Thr	Pro	Ser	Gly															
		355						360							365															
tcc	ctg	gtg	tcc	tcc	gag	gcc	cag	ctg	ttc	aac	aag	ccc	tac	tgg	ctg															1152
Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn	Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu															
		370					375								380															
cag	aag	gcc	cag	ggc	cac	aac	aac	ggc	atc	tgt	tgg	ggc	aac	cag	ctg															1200
Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	Trp	Gly	Asn	Gln	Leu															
		385				390					395				400															
ttc	gtg	acc	gtg	gtg	gac	acc	acc	cgc	agc	acc	aac	atg	acc	ctg	tgt															1248
Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Met	Thr	Leu	Cys															
				405							410				415															
gcc	tcc	gtg	acc	acc	tcc	tcc	acc	tac	acc	aac	tcc	gac	tac	aag	gag															1296
Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Asn	Ser	Asp	Tyr	Lys	Glu															
				420											430															
tac	atg	cgc	cac	gtg	gag	gag	tac	gac	ctg	cag	ttc	atc	ttc	cag	ctg															1344
Tyr	Met	Arg	His	Val	Glu	Glu	Tyr	Asp	Leu	Gln	Phe	Ile	Phe	Gln	Leu															
		435						440							445															
tgt	agc	atc	acc	ctg	tcc	gcc	gag	gtg	atg	gcc	tac	atc	cac	acc	atg															1392
Cys	Ser	Ile	Thr	Leu	Ser	Ala	Glu	Val	Met	Ala	Tyr	Ile	His	Thr	Met															
		450					455								460															
aac	ccc	tcc	gtg	ctg	gag	gac	tgg	aac	ttc	ggg	ctg	tcc	ccc	ccc	ccc															1440
Asn	Pro	Ser	Val	Leu	Glu	Asp	Trp	Asn	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro															
						470									480															
aac	ggc	acc	ctg	gag	gac	acc	tac	agg	tac	gtg	cag	tcc	cag	gcc	atc															1488
Asn	Gly	Thr	Leu	Glu	Asp	Thr	Tyr	Arg	Tyr	Val	Gln	Ser	Gln	Ala	Ile															
				485											495															
acc	tgt	cag	aag	ccc	acc	ccc	gag	aag	gag	aag	ccc	gac	ccc	tac	aag															1536
Thr	Cys	Gln	Lys	Pro	Thr	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Pro	Asp	Pro	Tyr	Lys															
				500											510															

ES 2 634 256 T3

```

aac ctg agc ttc tgg gag gtg aac ctg aag gag aag ttc tcc agc gag      1584
Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ser Glu
      515                      520                      525

ctg gac cag tac ccc ctg ggc cgc aag ttc ctg ctg cag agc ggc tac      1632
Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Gly Tyr
      530                      535                      540

agg ggc cgc tcc tcc atc cgc acc ggc gtg aag cgc ccc gcc gtg tcc      1680
Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys Arg Pro Ala Val Ser
      545                      550                      555                      560

aag gcc tcc gcc gcc ccc aag cgc aag cgc gcc aag acc aag agg taa      1728
Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala Lys Thr Lys Arg
      565                      570                      575

```

<210> 16
 <211> 575
 <212> PRT
 <213> Sintético

5

```

<400> 16
Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1          5          10          15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
          20          25          30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
          35          40          45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
          50          55          60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala Trp Arg Pro Ser
65          70          75          80

Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro Val Ser Lys Val Val
          85          90          95

Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr His Ala Ser
          100          105          110

Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Phe Ile Lys Arg
          115          120          125

Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly Tyr Gln Tyr Arg Val
          130          135          140

Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Ala Leu Pro Asp Ser
145          150          155          160

```

ES 2 634 256 T3

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

ES 2 634 256 T3

Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met Thr Leu Cys
405 410 415

Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn Ser Asp Tyr Lys Glu
420 425 430

Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu
435 440 445

Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala Tyr Ile His Thr Met
450 455 460

Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Ser Pro Pro Pro
465 470 475 480

Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Gln Ser Gln Ala Ile
485 490 495

Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys Pro Asp Pro Tyr Lys
500 505 510

Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ser Glu
515 520 525

Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Gly Tyr
530 535 540

Arg Gly Arg Ser Ser Ile Arg Thr Gly Val Lys Arg Pro Ala Val Ser
545 550 555 560

Lys Ala Ser Ala Ala Pro Lys Arg Lys Arg Ala Lys Thr Lys Arg
565 570 575

<210> 17
<211> 1677
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1677)
<223>

<400> 17

atg	cag	atc	ttc	gtg	aag	acc	ctg	acc	ggg	aag	acc	atc	acc	ctg	gag	48
Met	Gln	Ile	Phe	Val	Lys	Thr	Leu	Thr	Gly	Lys	Thr	Ile	Thr	Leu	Glu	
1				5					10					15		
gtg	gag	ccc	tcc	gac	acc	atc	gag	aac	gtg	aag	gcc	aag	atc	cag	gac	96
Val	Glu	Pro	Ser	Asp	Thr	Ile	Glu	Asn	Val	Lys	Ala	Lys	Ile	Gln	Asp	

ES 2 634 256 T3

20	25	30	
aag gag ggc atc ccc ccc gac cag cag agg ctg atc ttc gcc ggc aag Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys 35 40 45			144
cag ctg gag gac ggc cgc acc ctg tcc gac tac aac atc cag aag gag Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu 50 55 60			192
tcc acc ctg cac ctg gtg ctg agg ctg cgc ggc gcc tgg cgc ccc agc Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala Trp Arg Pro Ser 65 70 75 80			240
gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc gtg tcc aag gtg gtg Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro Val Ser Lys Val Val 85 90 95			288
gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc ttc tac cac gcc agc Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr His Ala Ser 100 105 110			336
agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac ttc ttc atc aag cgc Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Phe Ile Lys Arg 115 120 125			384
gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc tac cag tac agg gtg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly Tyr Gln Tyr Arg Val 130 135 140			432
ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc gcc ctg ccc gac tcc Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Ala Leu Pro Asp Ser 145 150 155 160			480
tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg tgg gcc tgc acc ggc Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Thr Gly 165 170 175			528
ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg ggc gtg agc ggc cac Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val Gly Val Ser Gly His 180 185 190			576
ccc ttc ctg aac aag tac gac gac gtg gag aac tcc ggg agc ggc ggc Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn Ser Gly Ser Gly Gly 195 200 205			624
aac ccc ggc cag gac aac agg gtg aac gtg ggc atg gac tac aag cag Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly Met Asp Tyr Lys Gln 210 215 220			672
acc cag ctg tgc atg gtg ggc tgt gcc ccc ccc ctg tgc gag cac tgg Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro Leu Cys Glu His Trp 225 230 235 240			720
ggc aag ggc aag cag tgt acc aac acc ccc gtg cag gcc ggc gac tgc Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val Gln Ala Gly Asp Cys 245 250 255			768
ccc ccc ctg gag ctg atc acc agc gtg atc cag gac ggc gac atg gtg Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln Asp Gly Asp Met Val 260 265 270			816

gac acc ggc ttc ggc gcc atg aac ttc gcc gac ctg cag acc aac aag Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp Leu Gln Thr Asn Lys 275 280 285	864
tcc gac gtg ccc atc gac atc tgt ggc acc acc tgt aag tac ccc gac Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr Cys Lys Tyr Pro Asp 290 295 300	912
tac ctg cag atg gcc gcc gac ccc tac ggc gac agg ctg ttc ttc ttc Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp Arg Leu Phe Phe Phe 305 310 315 320	960
ctg cgc aag gag cag atg ttc gcc agg cac ttc ttc aac agg gcc ggc Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe Phe Asn Arg Ala Gly 325 330 335	1008
gag gtg ggg gag ccc gtg ccc gac acc ctg atc atc aag ggc agc ggc Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile Ile Lys Gly Ser Gly 340 345 350	1056
aac cgc acc tcc gtg ggg agc agc atc tac gtg aac acc ccc agc ggc Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val Asn Thr Pro Ser Gly 355 360 365	1104
tcc ctg gtg tcc tcc gag gcc cag ctg ttc aac aag ccc tac tgg ctg Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn Lys Pro Tyr Trp Leu 370 375 380	1152
cag aag gcc cag ggc cac aac aac ggc atc tgt tgg ggc aac cag ctg Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys Trp Gly Asn Gln Leu 385 390 395 400	1200
ttc gtg acc gtg gtg gac acc acc cgc agc acc aac atg acc ctg tgt Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr Asn Met Thr Leu Cys 405 410 415	1248
gcc tcc gtg acc acc tcc tcc acc tac acc aac tcc gac tac aag gag Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn Ser Asp Tyr Lys Glu 420 425 430	1296
tac atg cgc cac gtg gag gag tac gac ctg cag ttc atc ttc cag ctg Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln Phe Ile Phe Gln Leu 435 440 445	1344
tgt agc atc acc ctg tcc gcc gag gtg atg gcc tac atc cac acc atg Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala Tyr Ile His Thr Met 450 455 460	1392
aac ccc tcc gtg ctg gag gac tgg aac ttc ggg ctg tcc ccc ccc ccc Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly Leu Ser Pro Pro Pro 465 470 475 480	1440
aac ggc acc ctg gag gac acc tac agg tac gtg cag tcc cag gcc atc Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val Gln Ser Gln Ala Ile 485 490 495	1488
acc tgt cag aag ccc acc ccc gag aag gag aag ccc gac ccc tac aag Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys Pro Asp Pro Tyr Lys 500 505 510	1536
aac ctg agc ttc tgg gag gtg aac ctg aag gag aag ttc tcc agc gag Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu Lys Phe Ser Ser Glu 515 520 525 530 535 540 545 550	1584

ES 2 634 256 T3

```

515              520              525
ctg gac cag tac ccc ctg ggc cgc aag ttc ctg ctg cag agc cag gcc      1632
Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu Leu Gln Ser Gln Ala
530              535              540

gag ccc gac cgc gcc cac tac aac atc gtc acc ttc aaa aaa taa      1677
Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Lys Lys
545              550              555

```

<210> 18
 <211> 558
 <212> PRT
 <213> Sintético

<400> 18

```

Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1              5              10              15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp
20              25              30

Lys Glu Gly Ile Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys
35              40              45

Gln Leu Glu Asp Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu
50              55              60

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Ala Trp Arg Pro Ser
65              70              75              80

Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro Val Ser Lys Val Val
85              90              95

Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile Phe Tyr His Ala Ser
100              105              110

Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr Phe Phe Ile Lys Arg
115              120              125

Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly Tyr Gln Tyr Arg Val
130              135              140

Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe Ala Leu Pro Asp Ser
145              150              155              160

Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val Trp Ala Cys Thr Gly
165              170              175

```

ES 2 634 256 T3

Leu	Glu	Val	Gly	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	Gly	Val	Ser	Gly	His	180	185	190	
Pro	Phe	Leu	Asn	Lys	Tyr	Asp	Asp	Val	Glu	Asn	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	195	200	205	
Asn	Pro	Gly	Gln	Asp	Asn	Arg	Val	Asn	Val	Gly	Met	Asp	Tyr	Lys	Gln	210	215	220	
Thr	Gln	Leu	Cys	Met	Val	Gly	Cys	Ala	Pro	Pro	Leu	Cys	Glu	His	Trp	225	230	235	240
Gly	Lys	Gly	Lys	Gln	Cys	Thr	Asn	Thr	Pro	Val	Gln	Ala	Gly	Asp	Cys	245	250	255	
Pro	Pro	Leu	Glu	Leu	Ile	Thr	Ser	Val	Ile	Gln	Asp	Gly	Asp	Met	Val	260	265	270	
Asp	Thr	Gly	Phe	Gly	Ala	Met	Asn	Phe	Ala	Asp	Leu	Gln	Thr	Asn	Lys	275	280	285	
Ser	Asp	Val	Pro	Ile	Asp	Ile	Cys	Gly	Thr	Thr	Cys	Lys	Tyr	Pro	Asp	290	295	300	
Tyr	Leu	Gln	Met	Ala	Ala	Asp	Pro	Tyr	Gly	Asp	Arg	Leu	Phe	Phe	Phe	305	310	315	320
Leu	Arg	Lys	Glu	Gln	Met	Phe	Ala	Arg	His	Phe	Phe	Asn	Arg	Ala	Gly	325	330	335	
Glu	Val	Gly	Glu	Pro	Val	Pro	Asp	Thr	Leu	Ile	Ile	Lys	Gly	Ser	Gly	340	345	350	
Asn	Arg	Thr	Ser	Val	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Val	Asn	Thr	Pro	Ser	Gly	355	360	365	
Ser	Leu	Val	Ser	Ser	Glu	Ala	Gln	Leu	Phe	Asn	Lys	Pro	Tyr	Trp	Leu	370	375	380	
Gln	Lys	Ala	Gln	Gly	His	Asn	Asn	Gly	Ile	Cys	Trp	Gly	Asn	Gln	Leu	385	390	395	400
Phe	Val	Thr	Val	Val	Asp	Thr	Thr	Arg	Ser	Thr	Asn	Met	Thr	Leu	Cys	405	410	415	
Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Thr	Asn	Ser	Asp	Tyr	Lys	Glu	420	425	430	

ES 2 634 256 T3

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

<210> 19
 <211> 1452
 <212> ADN
 <213> Sintético

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1452)
 <223>

<400> 19

atg tgg cgc ccc agc gac agc acc gtg tac gtg ccc ccc ccc aac ccc 48
 Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
 1 5 10 15
 gtg tcc aag gtg gtg gcc acc gac gcc tac gtg acc cgc acc aac atc 96
 Val Ser Lys Val Val Ala Thr Asp Ala Tyr Val Thr Arg Thr Asn Ile
 20 25 30
 ttc tac cac gcc agc agc tcc agg ctg ctg gcc gtg ggc cac ccc tac 144
 Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
 35 40 45
 ttc ttc atc aag cgc gcc aac aag acc gtg gtg ccc aag gtg tcc ggc 192
 Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
 50 55 60

ES 2 634 256 T3

tac cag tac agg gtg ttc aag gtg gtg ctg ccc gac ccc aac aag ttc	240
Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe	
65 70 75 80	
gcc ctg ccc gac tcc tcc ctg ttc gac ccc acc acc cag cgc ctg gtg	288
Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val	
85 90 95	
tgg gcc tgc acc ggc ctg gag gtg ggc agg ggc cag ccc ctg ggc gtg	336
Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val	
100 105 110	
ggc gtg agc ggc cac ccc ttc ctg aac aag tac gac gac gtg gag aac	384
Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn	
115 120 125	
tcc ggg agc ggc ggc aac ccc ggc cag gac aac agg gtg aac gtg ggc	432
Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly	
130 135 140	
atg gac tac aag cag acc cag ctg tgc atg gtg ggc tgt gcc ccc ccc	480
Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro	
145 150 155 160	
ctg tgc gag cac tgg ggc aag ggc aag cag tgt acc aac acc ccc gtg	528
Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Val	
165 170 175	
cag gcc ggc gac tgc ccc ccc ctg gag ctg atc acc agc gtg atc cag	576
Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln	
180 185 190	
gac ggc gac atg gtg gac acc ggc ttc ggc gcc atg aac ttc gcc gac	624
Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp	
195 200 205	
ctg cag acc aac aag tcc gac gtg ccc atc gac atc tgt ggc acc acc	672
Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr	
210 215 220	
tgt aag tac ccc gac tac ctg cag atg gcc gcc gac ccc tac ggc gac	720
Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp	
225 230 235 240	
agg ctg ttc ttc ttc ctg cgc aag gag cag atg ttc gcc agg cac ttc	768
Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe	
245 250 255	
ttc aac agg gcc ggc gag gtg ggc gag ccc gtg ccc gac acc ctg atc	816
Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile	
260 265 270	
atc aag ggc agc ggc aac cgc acc tcc gtg ggc agc agc atc tac gtg	864
Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val	
275 280 285	
aac acc ccc agc ggc tcc ctg gtg tcc tcc gag gcc cag ctg ttc aac	912
Asn Thr Pro Ser Gly Ser Leu Val Ser Ser Glu Ala Gln Leu Phe Asn	
290 295 300	
aag ccc tac tgg ctg cag aag gcc cag ggc cac aac aac ggc atc tgt	960
Lys Pro Tyr Trp Leu Gln Lys Ala Gln Gly His Asn Asn Gly Ile Cys	

ES 2 634 256 T3

305	310	315	320	
tgg ggc aac cag ctg ttc gtg acc gtg gtg gac acc acc cgc agc acc	1008			
Trp Gly Asn Gln Leu Phe Val Thr Val Val Asp Thr Thr Arg Ser Thr				
325 330 335				
aac atg acc ctg tgt gcc tcc gtg acc acc tcc tcc acc tac acc aac	1056			
Asn Met Thr Leu Cys Ala Ser Val Thr Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Asn				
340 345 350				
tcc gac tac aag gag tac atg cgc cac gtg gag gag tac gac ctg cag	1104			
Ser Asp Tyr Lys Glu Tyr Met Arg His Val Glu Glu Tyr Asp Leu Gln				
355 360 365				
ttc atc ttc cag ctg tgt agc atc acc ctg tcc gcc gag gtg atg gcc	1152			
Phe Ile Phe Gln Leu Cys Ser Ile Thr Leu Ser Ala Glu Val Met Ala				
370 375 380				
tac atc cac acc atg aac ccc tcc gtg ctg gag gac tgg aac ttc ggg	1200			
Tyr Ile His Thr Met Asn Pro Ser Val Leu Glu Asp Trp Asn Phe Gly				
385 390 395 400				
ctg tcc ccc ccc ccc aac ggc acc ctg gag gac acc tac agg tac gtg	1248			
Leu Ser Pro Pro Pro Asn Gly Thr Leu Glu Asp Thr Tyr Arg Tyr Val				
405 410 415				
cag tcc cag gcc atc acc tgt cag aag ccc acc ccc gag aag gag aag	1296			
Gln Ser Gln Ala Ile Thr Cys Gln Lys Pro Thr Pro Glu Lys Glu Lys				
420 425 430				
ccc gac ccc tac aag aac ctg agc ttc tgg gag gtg aac ctg aag gag	1344			
Pro Asp Pro Tyr Lys Asn Leu Ser Phe Trp Glu Val Asn Leu Lys Glu				
435 440 445				
aag ttc tcc agc gag ctg gac cag tac ccc ctg ggc cgc aag ttc ctg	1392			
Lys Phe Ser Ser Glu Leu Asp Gln Tyr Pro Leu Gly Arg Lys Phe Leu				
450 455 460				
ctg cag agc cag gcc gag ccc gac cgc gcc cac tac aac atc gtc acc	1440			
Leu Gln Ser Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr				
465 470 475 480				
ttc aaa aaa taa	1452			
Phe Lys Lys				

<210> 20
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Sintético

<400> 20

Met Trp Arg Pro Ser Asp Ser Thr Val Tyr Val Pro Pro Pro Asn Pro
1 5 10 15

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

ES 2 634 256 T3

Phe Tyr His Ala Ser Ser Ser Arg Leu Leu Ala Val Gly His Pro Tyr
 35 40 45
 Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asn Lys Thr Val Val Pro Lys Val Ser Gly
 50 55 60
 Tyr Gln Tyr Arg Val Phe Lys Val Val Leu Pro Asp Pro Asn Lys Phe
 65 70 75 80
 Ala Leu Pro Asp Ser Ser Leu Phe Asp Pro Thr Thr Gln Arg Leu Val
 85 90 95
 Trp Ala Cys Thr Gly Leu Glu Val Gly Arg Gly Gln Pro Leu Gly Val
 100 105 110
 Gly Val Ser Gly His Pro Phe Leu Asn Lys Tyr Asp Asp Val Glu Asn
 115 120 125
 Ser Gly Ser Gly Gly Asn Pro Gly Gln Asp Asn Arg Val Asn Val Gly
 130 135 140
 Met Asp Tyr Lys Gln Thr Gln Leu Cys Met Val Gly Cys Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Leu Cys Glu His Trp Gly Lys Gly Lys Gln Cys Thr Asn Thr Pro Val
 165 170 175
 Gln Ala Gly Asp Cys Pro Pro Leu Glu Leu Ile Thr Ser Val Ile Gln
 180 185 190
 Asp Gly Asp Met Val Asp Thr Gly Phe Gly Ala Met Asn Phe Ala Asp
 195 200 205
 Leu Gln Thr Asn Lys Ser Asp Val Pro Ile Asp Ile Cys Gly Thr Thr
 210 215 220
 Cys Lys Tyr Pro Asp Tyr Leu Gln Met Ala Ala Asp Pro Tyr Gly Asp
 225 230 235 240
 Arg Leu Phe Phe Phe Leu Arg Lys Glu Gln Met Phe Ala Arg His Phe
 245 250 255
 Phe Asn Arg Ala Gly Glu Val Gly Glu Pro Val Pro Asp Thr Leu Ile
 260 265 270
 Ile Lys Gly Ser Gly Asn Arg Thr Ser Val Gly Ser Ser Ile Tyr Val
 275 280 285

ES 2 634 256 T3

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

<210> 21
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Papilomavirus bovino de tipo 1

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (1404)
 <223>

ES 2 634 256 T3

<400> 21

atg agt gca cga aaa agg gtg aaa cgt gca aat gtc tat gac ctg tac	48
Met Ser Ala Arg Lys Arg Val Lys Arg Ala Asn Val Tyr Asp Leu Tyr	
1 5 10 15	
agg act tgc aag caa gcg ggc acc tgt cca cca gat gtg ata cct aag	96
Arg Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys Pro Pro Asp Val Ile Pro Lys	
20 25 30	
gta gaa ggt gac act ata gca gac aag att tta aaa tta gga ggc ctt	144
Val Glu Gly Asp Thr Ile Ala Asp Lys Ile Leu Lys Leu Gly Gly Leu	
35 40 45	
gca att tat ctg ggg ggc cta ggt att gga aca tgg tct aca gga aga	192
Ala Ile Tyr Leu Gly Gly Leu Gly Ile Gly Thr Trp Ser Thr Gly Arg	
50 55 60	
gtg gct gca gga gga tca cct agg tat gta ccc tta aga acc tct gga	240
Val Ala Ala Gly Gly Ser Pro Arg Tyr Val Pro Leu Arg Thr Ser Gly	
65 70 75 80	
tcc act aca agc ctg gca tct gta gga tcc agg gct ggt gca gcc act	288
Ser Thr Thr Ser Leu Ala Ser Val Gly Ser Arg Ala Gly Ala Ala Thr	
85 90 95	
ggc act cgc agc agc atc aca gga atc ccc ctt gac acc cta gaa act	336
Gly Thr Arg Ser Ser Ile Thr Gly Ile Pro Leu Asp Thr Leu Glu Thr	
100 105 110	
att ggg gct ctt cgt cct gga gct tat gaa gac act gtg ctc cca gag	384
Ile Gly Ala Leu Arg Pro Gly Ala Tyr Glu Asp Thr Val Leu Pro Glu	
115 120 125	
gcc cct gct att gtc acc cct gat gct gta cct gcg gac aca ggg ata	432
Ala Pro Ala Ile Val Thr Pro Asp Ala Val Pro Ala Asp Thr Gly Ile	
130 135 140	
gat ggc ctt tct ata ggc act gac tct tcc act gaa act tta atc aca	480
Asp Gly Leu Ser Ile Gly Thr Asp Ser Ser Thr Glu Thr Leu Ile Thr	
145 150 155 160	
ttg tta gag cct gag ggt cct gaa gac gtg gca gtc tta gag ctg caa	528
Leu Leu Glu Pro Glu Gly Pro Glu Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Gln	
165 170 175	
cct cta gac cat gca aat tgg caa gtt agc aat gct gtt cat cag ggc	576
Pro Leu Asp His Ala Asn Trp Gln Val Ser Asn Ala Val His Gln Gly	
180 185 190	
tct gca tac cac gcc cct ctg cag ctg cag tcc tcc att gca gaa aca	624
Ser Ala Tyr His Ala Pro Leu Gln Leu Gln Ser Ser Ile Ala Glu Thr	
195 200 205	
tct gga cta gaa aat att ttt gta gga ggg gct ggg tta ggg gat aca	672
Ser Gly Leu Glu Asn Ile Phe Val Gly Gly Ala Gly Leu Gly Asp Thr	
210 215 220	
ggc gga gag aac ata gag ctc aca ttt ttt ggt tcc cca cgc aca agt	720
Gly Gly Glu Asn Ile Glu Leu Thr Phe Phe Gly Ser Pro Arg Thr Ser	

ES 2 634 256 T3

225	230	235	240	
acc ccc cgt aac ctg cct caa act gca cgg ggc atc ttg aac tgg ttt				768
Thr Pro Arg Asn Leu Pro Gln Thr Ala Arg Gly Ile Leu Asn Trp Phe	245	250	255	
agc aaa aga tac tac aca caa ata ccc aca gaa gac cct gat gtc ttt				816
Ser Lys Arg Tyr Tyr Thr Gln Ile Pro Thr Glu Asp Pro Asp Val Phe	260	265	270	
tca tca cag aca ttt tca aac cca gtg tat gat cct gag cct gca gtg				864
Ser Ser Gln Thr Phe Ser Asn Pro Val Tyr Asp Pro Glu Pro Ala Val	275	280	285	
cta aaa ggt ccc agt ggc cgt gtg ggg cta agc caa gtg tat agg cct				912
Leu Lys Gly Pro Ser Gly Arg Val Gly Leu Ser Gln Val Tyr Arg Pro	290	295	300	
gac tat att gaa aca cgg ggt ggg ggt cag gtg ggc cca cag ctg cat				960
Asp Tyr Ile Glu Thr Arg Gly Gly Gly Gln Val Gly Pro Gln Leu His	305	310	315	320
gtc agg tac tcc tta agc act atc aca gaa gat gtg gaa gcc ata cct				1008
Val Arg Tyr Ser Leu Ser Thr Ile Thr Glu Asp Val Glu Ala Ile Pro	325	330	335	
ata gca gtt gat gaa gac aca caa ggg cta gca ttt ctt cct tta cat				1056
Ile Ala Val Asp Glu Asp Thr Gln Gly Leu Ala Phe Leu Pro Leu His	340	345	350	
gaa gaa cca ggg gac ttt gaa gaa att gag cta gat gat tta ggt gaa				1104
Glu Glu Pro Gly Asp Phe Glu Glu Ile Glu Leu Asp Asp Leu Gly Glu	355	360	365	
gag cac gcc ttg ctc ccc aag tca tct act gca cct att ggt agt gga				1152
Glu His Ala Leu Leu Pro Lys Ser Ser Thr Ala Pro Ile Gly Ser Gly	370	375	380	
gtt cgt agg gcg ctc att cca ggt caa ggc ttc agt gca aca cgg ccc				1200
Val Arg Arg Ala Leu Ile Pro Gly Gln Gly Phe Ser Ala Thr Arg Pro	385	390	395	400
aca ggt gtg gta acc tat ggc tca cct gac atg tac cct gct agc cct				1248
Thr Gly Val Val Thr Tyr Gly Ser Pro Asp Met Tyr Pro Ala Ser Pro	405	410	415	
gtt ggc cct gac tcg aca tcc cct agc cta gtt att gat gac aac aca				1296
Val Gly Pro Asp Ser Thr Ser Pro Ser Leu Val Ile Asp Asp Asn Thr	420	425	430	
aca aca cca ata atc att att gat ggc cac aca gtg gat ctg tat agc				1344
Thr Thr Pro Ile Ile Ile Ile Asp Gly His Thr Val Asp Leu Tyr Ser	435	440	445	
aat aac tat agc ttg cat ccc tcc ttg ttg agg aaa aga aaa aaa cgg				1392
Asn Asn Tyr Ser Leu His Pro Ser Leu Leu Arg Lys Arg Lys Lys Arg	450	455	460	
aaa cat gcc taa				1404
Lys His Ala				
465				

ES 2 634 256 T3

<210> 22
 <211> 467
 <212> PRT
 <213> Papilomavirus bovino de tipo 1

5

<400> 22

```

Met Ser Ala Arg Lys Arg Val Lys Arg Ala Asn Val Tyr Asp Leu Tyr
1          5          10          15

Arg Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys Pro Pro Asp Val Ile Pro Lys
          20          25          30

Val Glu Gly Asp Thr Ile Ala Asp Lys Ile Leu Lys Leu Gly Gly Leu
          35          40          45

Ala Ile Tyr Leu Gly Gly Leu Gly Ile Gly Thr Trp Ser Thr Gly Arg
          50          55          60

Val Ala Ala Gly Gly Ser Pro Arg Tyr Val Pro Leu Arg Thr Ser Gly
65          70          75          80

Ser Thr Thr Ser Leu Ala Ser Val Gly Ser Arg Ala Gly Ala Ala Thr
          85          90          95

Gly Thr Arg Ser Ser Ile Thr Gly Ile Pro Leu Asp Thr Leu Glu Thr
          100          105          110

Ile Gly Ala Leu Arg Pro Gly Ala Tyr Glu Asp Thr Val Leu Pro Glu
          115          120          125

Ala Pro Ala Ile Val Thr Pro Asp Ala Val Pro Ala Asp Thr Gly Ile
          130          135          140

Asp Gly Leu Ser Ile Gly Thr Asp Ser Ser Thr Glu Thr Leu Ile Thr
145          150          155          160

Leu Leu Glu Pro Glu Gly Pro Glu Asp Val Ala Val Leu Glu Leu Gln
          165          170          175

Pro Leu Asp His Ala Asn Trp Gln Val Ser Asn Ala Val His Gln Gly
          180          185          190

Ser Ala Tyr His Ala Pro Leu Gln Leu Gln Ser Ser Ile Ala Glu Thr
          195          200          205

Ser Gly Leu Glu Asn Ile Phe Val Gly Gly Ala Gly Leu Gly Asp Thr
210          215          220

```

ES 2 634 256 T3

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

Lys His Ala
465

<210> 23
<211> 1410
<212> ADN
<213> Sintético

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1410)
<223>

<400> 23

atg agc gcc cgc aag aga gtg aag cgc gcc agc gcc tac gac ctg tac	48
Met Ser Ala Arg Lys Arg Val Lys Arg Ala Ser Ala Tyr Asp Leu Tyr	
1 5 10 15	
agg acc tgc aag cag gcc ggc aca tgt cca cca gat gtg atc cga aag	96
Arg Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys Pro Pro Asp Val Ile Arg Lys	
20 25 30	
gtg gag ggc gac acc atc gcc gac aag atc ctg aag ttc ggc ggc ctg	144
Val Glu Gly Asp Thr Ile Ala Asp Lys Ile Leu Lys Phe Gly Gly Leu	
35 40 45	
gcc atc tac ctg ggc ggc ctg ggc atc gga aca tgg tct acc ggc agg	192
Ala Ile Tyr Leu Gly Gly Leu Gly Ile Gly Thr Trp Ser Thr Gly Arg	
50 55 60	
gtg gcc gcc ggc ggc tca cca agg tac acc cca ctg cgc acc gcc ggc	240
Val Ala Ala Gly Gly Ser Pro Arg Tyr Thr Pro Leu Arg Thr Ala Gly	
65 70 75 80	
tcc acc tcc tcc ctg gcc tcc atc gga tcc aga gcc gtg acc gcc ggc	288
Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Ile Gly Ser Arg Ala Val Thr Ala Gly	
85 90 95	
acc cgc ccc tcc atc ggc gcg ggc atc cct ctg gac acc ctg gaa act	336
Thr Arg Pro Ser Ile Gly Ala Gly Ile Pro Leu Asp Thr Leu Glu Thr	
100 105 110	
ctt ggg gcc ctg cgc cct ggc gtg tac gag gac acc gtg ctg ccc gaa	384
Leu Gly Ala Leu Arg Pro Gly Val Tyr Glu Asp Thr Val Leu Pro Glu	
115 120 125	
gcc cct gcc atc gtg acc cct gac gcc gtg cct gca gac tcc ggc ctg	432
Ala Pro Ala Ile Val Thr Pro Asp Ala Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu	
130 135 140	
gac gcc ctg tcc atc ggc aca gac tcc tcc acc gag acc ctg atc acc	480
Asp Ala Leu Ser Ile Gly Thr Asp Ser Ser Thr Glu Thr Leu Ile Thr	
145 150 155 160	
ctg ctg gag cct gag ggc ccc gaa gac ata gcc gtg ctg gaa ctc cag	528
Leu Leu Glu Pro Glu Gly Pro Glu Asp Ile Ala Val Leu Glu Leu Gln	
165 170 175	
ccc ctg gac cgc cca acc tgg cag gtg agc aat gct gtg cac cag tcc	576
Pro Leu Asp Arg Pro Thr Trp Gln Val Ser Asn Ala Val His Gln Ser	

180																185						190						
tct	gcc	tac	cac	gcc	cct	ctc	cag	ctg	caa	tcc	tcc	atc	gcc	gag	aca	624												
Ser	Ala	Tyr	His	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gln	Ser	Ser	Ile	Ala	Glu	Thr													
			195			200			205																			
tct	ggt	tta	gaa	aat	att	ttt	gta	gga	ggc	tcg	ggt	tta	ggg	gat	acc	672												
Ser	Gly	Leu	Glu	Asn	Ile	Phe	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Thr													
			210			215			220																			
ggc	ggc	gag	aac	atc	gag	ctg	acc	tac	ttc	ggc	tcc	ccc	cgc	acc	agc	720												
Gly	Gly	Glu	Asn	Ile	Glu	Leu	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Ser													
			225			230			235			240																
acc	ccc	cgc	tcc	atc	gcc	tcc	aag	tcc	cgc	ggc	atc	ctg	aac	tgg	ttc	768												
Thr	Pro	Arg	Ser	Ile	Ala	Ser	Lys	Ser	Arg	Gly	Ile	Leu	Asn	Trp	Phe													
			245			250			255																			
agc	aag	cgg	tac	tac	acc	cag	gtg	ccc	acc	gaa	gat	ccc	gaa	gtg	ttc	816												
Ser	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Thr	Gln	Val	Pro	Thr	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Phe													
			260			265			270																			
tcc	tcc	cag	acc	ttc	gcc	aac	ccc	ctg	tac	gag	gcc	gag	ccc	gcc	gtg	864												
Ser	Ser	Gln	Thr	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Tyr	Glu	Ala	Glu	Pro	Ala	Val													
			275			280			285																			
ctg	aag	ggc	cct	agc	ggc	cgc	gtg	ggc	ctg	tcc	cag	gtg	tac	aag	cct	912												
Leu	Lys	Gly	Pro	Ser	Gly	Arg	Val	Gly	Leu	Ser	Gln	Val	Tyr	Lys	Pro													
			290			295			300																			
gat	acc	ctg	acc	aca	cgt	agc	ggc	aca	gag	gtg	ggc	ccc	cag	ctg	cat	960												
Asp	Thr	Leu	Thr	Thr	Arg	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Gly	Pro	Gln	Leu	His													
			305			310			315			320																
gtg	agg	tac	tcc	ctg	tcc	acc	atc	cat	gag	gat	gtg	gag	gct	atc	ccc	1008												
Val	Arg	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	His	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Ile	Pro													
			325			330			335																			
tac	acc	gtg	gat	gag	aac	acc	cag	ggc	ctg	gcc	ttc	gtg	ccc	ctg	cat	1056												
Tyr	Thr	Val	Asp	Glu	Asn	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	Phe	Val	Pro	Leu	His													
			340			345			350																			
gag	gag	cag	gcc	ggc	ttc	gag	gag	atc	gag	ctc	gac	gat	ttc	agc	gag	1104												
Glu	Glu	Gln	Ala	Gly	Phe	Glu	Glu	Ile	Glu	Leu	Asp	Asp	Phe	Ser	Glu													
			355			360			365																			
acc	cat	cgc	ctg	ctg	ccc	cag	aac	acc	tcc	tcc	acc	ccc	gtg	ggc	agc	1152												
Thr	His	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Gly	Ser													
			370			375			380																			
ggc	gtg	cgc	aga	agc	ctg	atc	cct	acc	cga	gag	ttc	agc	gcc	acc	cgg	1200												
Gly	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Ile	Pro	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Arg													
			385			390			395			400																
cct	acc	ggc	gtg	gtg	acc	tac	ggc	tcc	ccc	gac	acc	tac	tcc	gct	agc	1248												
Pro	Thr	Gly	Val	Val	Thr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Asp	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ser													
			405			410			415																			
ccc	gtg	acc	gac	cct	gat	tct	acc	tct	cct	agc	ctg	gtg	atc	gac	gac	1296												
Pro	Val	Thr	Asp	Pro	Asp	Ser	Thr	Ser	Pro	Ser	Leu	Val	Ile	Asp	Asp													
			420			425			430																			

ES 2 634 256 T3

```

acc acc acc acc ccc atc atc atc atc gac ggc cac aca gtg gat ctg      1344
Thr Thr Thr Thr Pro Ile Ile Ile Ile Asp Gly His Thr Val Asp Leu
      435                      440                      445

tac agc agc aac tac acc ctg cat ccc tcc ctg ctg agg aag cgc aag      1392
Tyr Ser Ser Asn Tyr Thr Leu His Pro Ser Leu Leu Arg Lys Arg Lys
      450                      455                      460

aag cgc aag cat gcc taa      1410
Lys Arg Lys His Ala
465

```

<210> 24
 <211> 469
 <212> PRT
 <213> Sintético

5

```

<400> 24
Met Ser Ala Arg Lys Arg Val Lys Arg Ala Ser Ala Tyr Asp Leu Tyr
1                      5                      10                      15

Arg Thr Cys Lys Gln Ala Gly Thr Cys Pro Pro Asp Val Ile Arg Lys
                      20                      25                      30

Val Glu Gly Asp Thr Ile Ala Asp Lys Ile Leu Lys Phe Gly Gly Leu
35                      40                      45

Ala Ile Tyr Leu Gly Gly Leu Gly Ile Gly Thr Trp Ser Thr Gly Arg
50                      55                      60

Val Ala Ala Gly Gly Ser Pro Arg Tyr Thr Pro Leu Arg Thr Ala Gly
65                      70                      75                      80

Ser Thr Ser Ser Leu Ala Ser Ile Gly Ser Arg Ala Val Thr Ala Gly
85                      90                      95

Thr Arg Pro Ser Ile Gly Ala Gly Ile Pro Leu Asp Thr Leu Glu Thr
100                      105                      110

Leu Gly Ala Leu Arg Pro Gly Val Tyr Glu Asp Thr Val Leu Pro Glu
115                      120                      125

Ala Pro Ala Ile Val Thr Pro Asp Ala Val Pro Ala Asp Ser Gly Leu
130                      135                      140

Asp Ala Leu Ser Ile Gly Thr Asp Ser Ser Thr Glu Thr Leu Ile Thr
145                      150                      155                      160

Leu Leu Glu Pro Glu Gly Pro Glu Asp Ile Ala Val Leu Glu Leu Gln
165                      170                      175

```

ES 2 634 256 T3

Pro	Leu	Asp	Arg	Pro	Thr	Trp	Gln	Val	Ser	Asn	Ala	Val	His	Gln	Ser	180	185	190	
Ser	Ala	Tyr	His	Ala	Pro	Leu	Gln	Leu	Gln	Ser	Ser	Ile	Ala	Glu	Thr	195	200	205	
Ser	Gly	Leu	Glu	Asn	Ile	Phe	Val	Gly	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Asp	Thr	210	215	220	
Gly	Gly	Glu	Asn	Ile	Glu	Leu	Thr	Tyr	Phe	Gly	Ser	Pro	Arg	Thr	Ser	225	230	235	240
Thr	Pro	Arg	Ser	Ile	Ala	Ser	Lys	Ser	Arg	Gly	Ile	Leu	Asn	Trp	Phe	245	250	255	
Ser	Lys	Arg	Tyr	Tyr	Thr	Gln	Val	Pro	Thr	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Phe	260	265	270	
Ser	Ser	Gln	Thr	Phe	Ala	Asn	Pro	Leu	Tyr	Glu	Ala	Glu	Pro	Ala	Val	275	280	285	
Leu	Lys	Gly	Pro	Ser	Gly	Arg	Val	Gly	Leu	Ser	Gln	Val	Tyr	Lys	Pro	290	295	300	
Asp	Thr	Leu	Thr	Thr	Arg	Ser	Gly	Thr	Glu	Val	Gly	Pro	Gln	Leu	His	305	310	315	320
Val	Arg	Tyr	Ser	Leu	Ser	Thr	Ile	His	Glu	Asp	Val	Glu	Ala	Ile	Pro	325	330	335	
Tyr	Thr	Val	Asp	Glu	Asn	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	Phe	Val	Pro	Leu	His	340	345	350	
Glu	Glu	Gln	Ala	Gly	Phe	Glu	Glu	Ile	Glu	Leu	Asp	Asp	Phe	Ser	Glu	355	360	365	
Thr	His	Arg	Leu	Leu	Pro	Gln	Asn	Thr	Ser	Ser	Thr	Pro	Val	Gly	Ser	370	375	380	
Gly	Val	Arg	Arg	Ser	Leu	Ile	Pro	Thr	Arg	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Arg	385	390	395	400
Pro	Thr	Gly	Val	Val	Thr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Asp	Thr	Tyr	Ser	Ala	Ser	405	410	415	

ES 2 634 256 T3

Pro Val Thr Asp Pro Asp Ser Thr Ser Pro Ser Leu Val Ile Asp Asp
420 425 430

Thr Thr Thr Thr Pro Ile Ile Ile Ile Asp Gly His Thr Val Asp Leu
435 440 445

Tyr Ser Ser Asn Tyr Thr Leu His Pro Ser Leu Leu Arg Lys Arg Lys
450 455 460

Lys Arg Lys His Ala
465

- 5 <210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Motivo pentapeptídico hidrófobo de ornitina descarboxilasa
<400> 25

Ala Arg Ile Asn Val
1 5

- 15 <210> 26
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Motivo hidrófobo hallado en marcadores C terminales de polipéptidos aberrantes
<400> 26

Ala Ala Asn Asp Glu Asn Tyr Ala Leu Ala Ala
1 5 10

- 25 <210> 27
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Motivo de degradación intracelular rápida
- 35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2) .. (2)
<223> X= cualquier aminoácido
- 40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6) .. (6)
<223> X= cualquier aminoácido
- 45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (8) .. (8)
<223> X= cualquier aminoácido

<400> 27

Arg Xaa Ala Leu Gly Xaa Ile Xaa Asn
1 5

5

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Degradación intracelular rápida de ciclina

<400> 28

Lys Thr Lys Arg Asn Tyr Ser Ala Arg Asp
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un primer antígeno que corresponde a un antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, junto con un segundo antígeno que corresponde a una forma modificada del antígeno diana y que es un derivado del primer antígeno, en la que la velocidad de degradación proteolítica intracelular del segundo antígeno se aumenta, potencia o de otro modo eleva en relación con el primer antígeno, o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en la que el segundo antígeno comprende una señal de degradación intracelular que comprende una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma, en la que el primer antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria humoral al antígeno diana, en la que el segundo antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria celular al antígeno diana, y en la que dicha composición es adecuada para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra el antígeno diana.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha ubiquitina o fragmento biológicamente activo de la misma se fusiona, o de otro modo conjuga, con dicho segundo antígeno.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho primer antígeno conserva más de aproximadamente el 50 % de su estructura terciaria después de aproximadamente 3 minutos en condiciones intracelulares o similares a intracelulares.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la semivida intracelular de dicho primer antígeno es superior a aproximadamente 3 minutos.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la semivida intracelular de dicho segundo antígeno es inferior a aproximadamente 3 minutos.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el nivel de degradación proteolítica de dicho segundo antígeno es al menos aproximadamente 5 % superior al de dicho primer antígeno.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho antígeno diana corresponde a al menos una porción de una proteína estructural.
8. La composición de la reivindicación 7, en la que dicha proteína estructural es una proteína estructural de un organismo patógeno.
9. La composición de la reivindicación 7, en la que dicha proteína estructural es una proteína vírica.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho antígeno diana corresponde a al menos una porción de una proteína de la cápside vírica.
11. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha proteína de la cápside vírica es resultado de un virus cristalino.
12. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha proteína de la cápside vírica se selecciona entre las proteínas L1 y/o L2 del virus del papiloma, VP 1-3 de poliomavirus, VP 1-6 del virus de la lengua azul, antígeno de superficie de la hepatitis B, antígeno de superficie de la hepatitis C, las proteínas de la cápside de parvovirus, las proteínas de la cápside de partículas de levadura Ty, las proteínas de la cápside de retrovirus, las proteínas de la cápside de rotavirus, las proteínas de la cápside de coronavirus o las proteínas de la cápside de adenovirus.
13. La composición de la reivindicación 10, en la que dicha proteína de la cápside vírica es una proteína de la cápside del virus del papiloma.
14. La composición de la reivindicación 13, en la que dicha proteína de la cápside vírica se selecciona entre las proteínas de la cápside L1 y L2 de un virus del papiloma.
15. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende además un adyuvante.
16. La composición de la reivindicación 15, en la que dicho adyuvante administra dicho segundo antígeno a la vía del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I.
17. La composición de la reivindicación 15, en la que dicho adyuvante es un ISCOM, una listeriolisina o una citolisina, que media la administración de los antígenos al citosol de una célula diana.
18. La composición de la reivindicación 17, en la que dicha citolisina se vincula o asocia de otro modo con uno o con los dos de dichos antígenos.

19. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha composición comprende:

- un primer polinucleótido que codifica dicho primer antígeno;
- y
- un segundo polinucleótido que codifica dicho segundo antígeno;

en la que dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido se vinculan operativamente a un polinucleótido regulador común o a diferentes polinucleótidos reguladores.

20. La composición de la reivindicación 19, en la que dicho segundo polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana y que se vincula en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma.

21. La composición de la reivindicación 19 o 20, en la que dicho segundo polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana y que se vincula cadena abajo y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma.

22. La composición de la reivindicación 19 o 20, en la que dicho segundo polinucleótido comprende una primera secuencia de ácidos nucleicos que codifica un antígeno que corresponde al antígeno diana y que se vincula cadena arriba y en el marco de lectura con una segunda secuencia de ácidos nucleicos que codifica una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma.

23. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en la que dicho primer polinucleótido y/o dicho segundo polinucleótido se optimiza por codones para permitir una expresión potenciada de un antígeno así codificado en una célula diana.

24. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en la que dicho primer polinucleótido y/o dicho segundo polinucleótido se optimiza por codones para permitir una expresión superior del antígeno así codificado en una célula diana que en otra célula.

25. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24, en la que dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido están presentes en al menos una construcción sintética.

26. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en la que dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido están presentes en la misma construcción sintética.

27. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, en la que dicho primer polinucleótido y dicho segundo polinucleótido están presentes en diferentes construcciones sintéticas.

28. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 27, que comprende además un portador y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

29. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 28, que comprende además un adyuvante.

30. Una célula hospedadora que comprende la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 25 a 27.

31. Un método de producción de una composición para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana, comprendiendo el método la combinación

de un primer antígeno correspondiente al antígeno diana o un polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, con

un segundo antígeno o un polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, en el que el segundo antígeno corresponde a una forma modificada del antígeno diana y es un derivado del primer antígeno y en el que el segundo antígeno comprende una ubiquitina o un fragmento biológicamente activo de la misma,

en el que el primer antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria humoral al antígeno diana y el segundo antígeno es adecuado para provocar una respuesta inmunitaria celular al antígeno diana.

32. El método de la reivindicación 31, que comprende además la optimización de la composición de codones de un polinucleótido parental que codifica un antígeno seleccionado entre el grupo que consiste en el primer antígeno y el segundo antígeno para construir un polinucleótido optimizado por codones, mediante el cual la expresión del antígeno a partir del polinucleótido optimizado por codones en dicha al menos una célula receptora se aumenta, potencia o de otro modo eleva con relación a la de dicho polinucleótido parental.

33. El método de la reivindicación 32, en el que dicha optimización se realiza:

- seleccionando un primer codón del polinucleótido parental para reemplazarlo con un codón sinónimo, en el que el primer codón se selecciona sobre la base de que tiene una eficacia de traducción superior a la de dicho codón sinónimo en al menos dicha célula receptora, y
- reemplazando dicho primer codón con dicho codón sinónimo para construir dicho polinucleótido optimizado por codones.

34. El método de la reivindicación 32 o 33, en el que dicha optimización se realiza:

- seleccionando un primer codón del polinucleótido parental para reemplazarlo con un codón sinónimo que tiene una eficacia de traducción superior en dicha célula receptora que en otra célula; y
- reemplazando dicho primer codón con dicho codón sinónimo para formar dicho polinucleótido optimizado por codones.

35. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, que comprende además poner en contacto las células presentadoras de antígeno con el primer antígeno o con el polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno, y con el segundo antígeno o con el polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno, durante un tiempo y en condiciones suficientes para expresar una forma procesada del primer antígeno y una forma procesada del segundo antígeno para su presentación a las células T y modulación de las mismas.

36. El método de la reivindicación 35, en el que las células presentadoras de antígeno se seleccionan entre las células dendríticas, macrófagos y células B.

37. El método de la reivindicación 35, en el que las células presentadoras de antígeno son células dendríticas.

38. El método de la reivindicación 35, que comprende además combinar el primer antígeno o polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno y el segundo antígeno o polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno con un portador y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

39. El método de la reivindicación 35, que comprende además combinar el primer antígeno o polinucleótido a partir del cual se expresa el primer antígeno y el segundo antígeno o polinucleótido a partir del cual se expresa el segundo antígeno con un adyuvante.

40. El método de la reivindicación 35, en el que dichas células T son linfocitos T citotóxicos (LTC).

41. El método de la reivindicación 35, que comprende además el aislamiento de células presentadoras de antígeno de una población heterogénea de células.

42. Una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para su uso como medicamento.

43. Una composición según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 para su uso en la provocación de una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana.

44. Uso de una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra un antígeno diana o modular una respuesta inmunitaria, por lo que, tras la administración, dicho primer antígeno y dicho segundo antígeno se expresan conjuntamente en la misma célula receptora o se expresan por separado en diferentes células receptoras.

45. El uso de la reivindicación 44, en el que dicha célula o células receptoras se seleccionan entre una célula dendrítica, un macrófago o una célula B.

46. Uso de un primer antígeno según se define en la reivindicación 1 o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho primer antígeno en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra dicho antígeno diana, en el que dicho medicamento se coadministra con un segundo antígeno según se define en la reivindicación 1 o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho segundo antígeno.

47. Uso de un segundo antígeno según se define en la reivindicación 1 o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho segundo antígeno en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria humoral y celular contra dicho antígeno diana, en el que dicho medicamento se coadministra con un primer antígeno según se define en la reivindicación 1 o un polinucleótido a partir del cual se expresa dicho primer antígeno.

48. Uso de una composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29 en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta humoral y celular contra un antígeno diana.

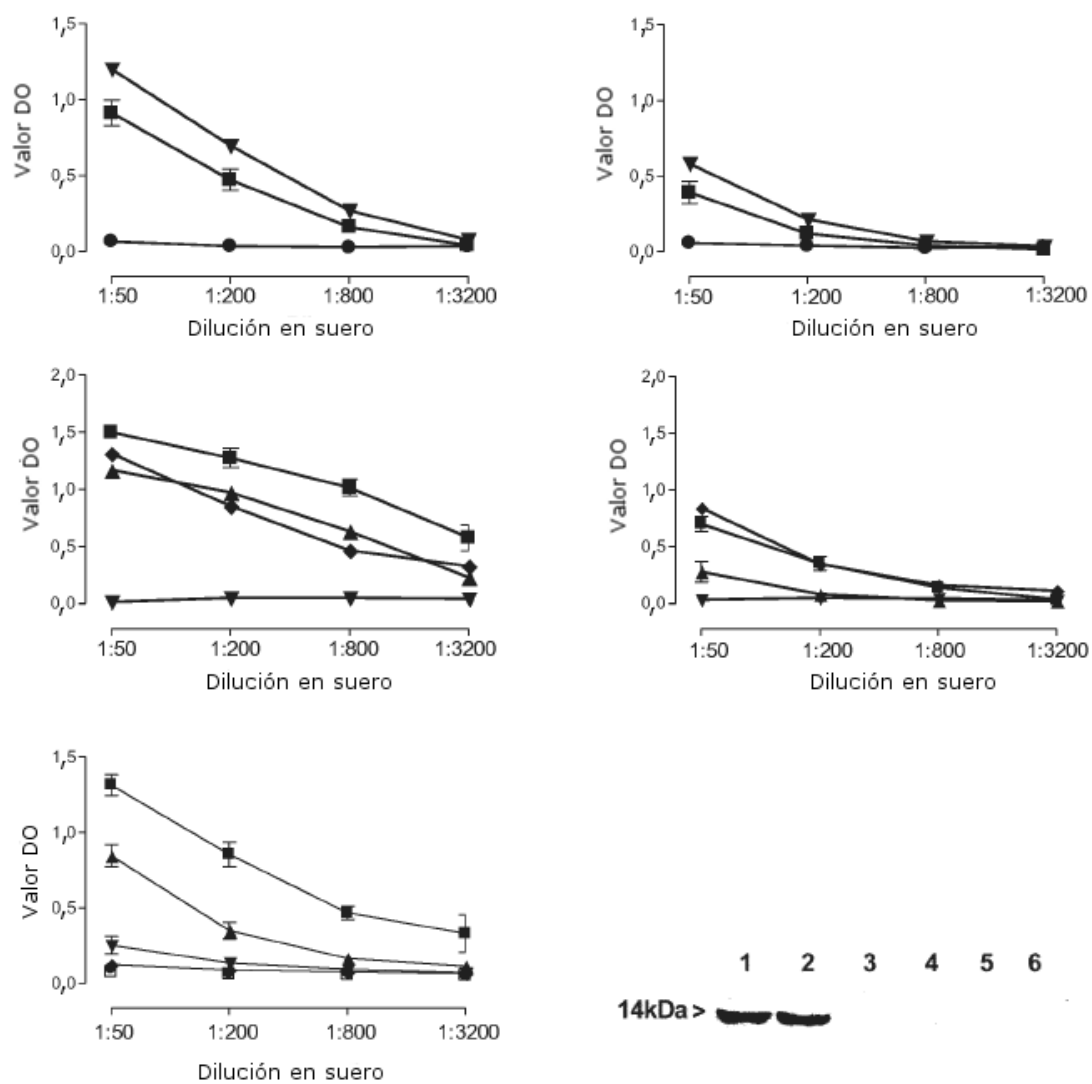


FIGURA 1

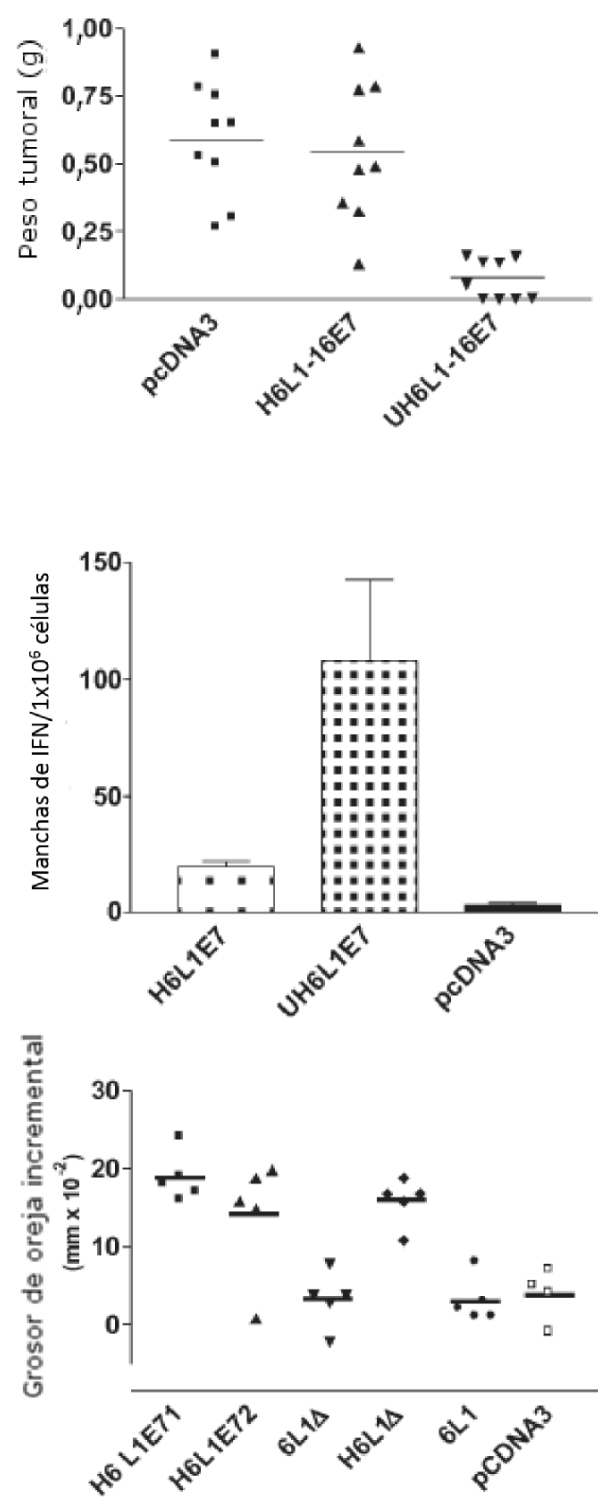


FIGURA 2

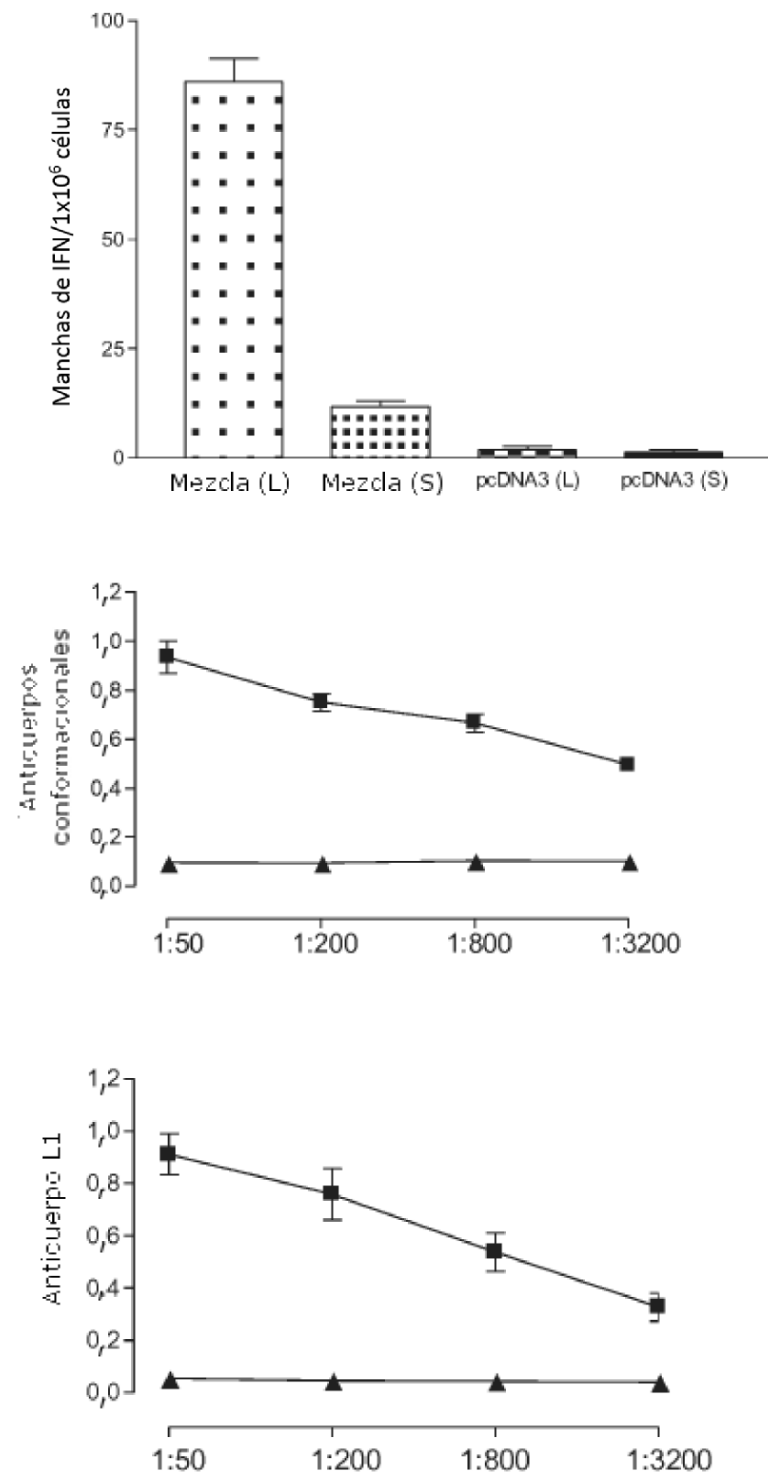


FIGURA 3

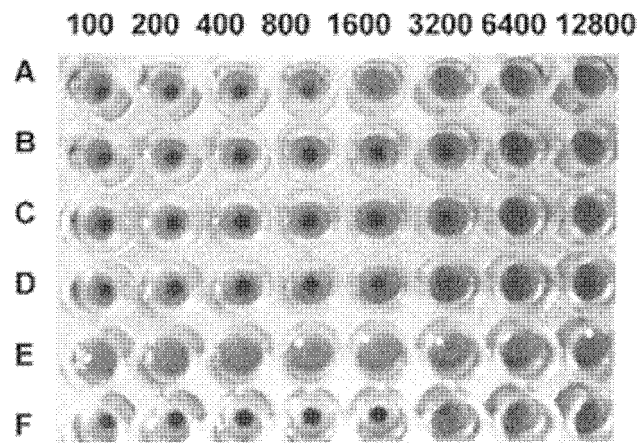


FIGURA 4

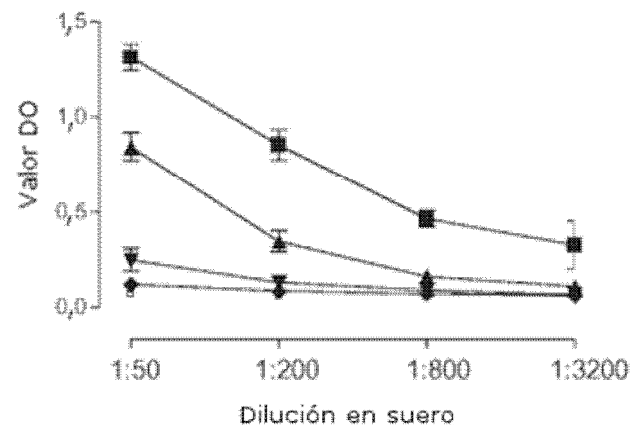


FIGURA 5