



**Industria y Comercio**

**SUPERINTENDENCIA**



Organización CSA Ltda

**SOLICITUD  
PATENTE DE INVENCION**

**00-2923**

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO**

VACUNAS

NUEVO TITULO Folio 83!

51. **CLASIFICACION INTERNACIONAL**

C07K 19/00, A61K 39/25, C12N 15/62

71. **SOLICITANTE**

SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.

**DOMICILIO**

RIXENSART, BELGICA

74. **APODERADO**

GERMAN CASTILLO GRAU

22. **SANTAFE DE BOGOTA, D.C.**

20 ENE 2000

202099



REPUBLICA DE COLOMBIA



SUPERINTENDENCIA  
DE INDUSTRIA  
Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD

DATENTE



DATO

00 2923

TE

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 00002923 00000000

Fecha (AMD): 2000-01-20 12:26:41

Tramite : 002 PATENTES D

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Folios: 76

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

SMITHKLINE BEECHMAN BIOLOGICALS S.A.

No. de Identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

GERMAN CASTILLO GRAU

País de Domicilio

BELGICA

Departamento o Estado

Dirección

rue de I'Institut 89

Ciudad

RIXENSART

Teléfono

(74) DATOS DEL APODERADO PODER No. 16.769

Nombre

GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección y Domicilio

Carrera 13 No. 37-43, Piso 12

Ciudad

Santafé de Bogotá

Teléfono 285-98-28

DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor(es)

Profesor Alex Bollen ; Michele Haumont

Paul Jacobs , Dr. Alain Jacquet

Marc Georges Francis Massaer

Identificación

Dirección

Nivelles, Bélgica- Nivelles, Bélgica- Nivelles, Bélgica,

Nivelles, Bélgica - Nivelles, Bélgica.

Ciudad

Teléfono

DATOS DE LA PATENTE DE INVENCION

(54) Título de la Invención

V A C U N A S

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒

NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDINA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País GRAN BRETAÑA

(32) Fecha Enero 20, 1999

(31) No. Solicitud 9901254.4

Fuente Normativa de Reciprocidad : Convención de Paris

Para Publicar a los

☐ 6 meses

☒ 12 meses

☐ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

(30) CLASIFICACION INTERNACIONAL



## RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

Esta invención se refiere a una nueva proteína de fusión que comprende  
 (1) una proteína gE del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmu-  
 nológicamente activo de la misma fusionados a (2) una proteína diferente  
 del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo  
 de la misma, y a composiciones de vacuna que comprenden la proteína de  
 fusión.

## ANEXOS DE LA SOLICITUD

|                                                                                                                            |                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica                                | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC                                             | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Recibo de la tasa respectiva                                                                                               | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación                                                  | <input type="checkbox"/>            |
| Si se reivindica prioridad Andina:                                                                                         |                                     |
| Copia de la primera solicitud                                                                                              | <input type="checkbox"/>            |
| Traducción oficial                                                                                                         | <input type="checkbox"/>            |
| Si se reivindica prioridad Unionista:                                                                                      |                                     |
| Copia certificada de la primera solicitud:                                                                                 | <input type="checkbox"/>            |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior |                                     |
| Traducción simple                                                                                                          | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Capítulo descriptivo                                                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Dibujos, planos necesarios                                                                                                 | <input type="checkbox"/>            |
| Capítulo reivindicatorio                                                                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tarjeta archivo propietarios según formato                                                                                 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tarjeta archivo temático según formato                                                                                     | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Extracto para publicación según formato                                                                                    | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Otros Documentos                                                                                                           | <input type="checkbox"/>            |

**SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES  
 NUEVA Y DE MI PROPIEDAD**

FIRMA

NOMBRE GERMAN CASTILLO GRAU

CC. 17'017.671 Btá

T.P.No. 2978

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO  
Radicacion : 00002923 00000000 Folios: 76  
Fecha (AMP): 2000-01-20 12:26:41  
Tramite : 002 PATENTES D 1 REGISTRO/ 001 SOLICITUD  
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 00 - 4,009  
FECHA : ENERO 18 DE 2000

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE                | TIPO PAGO    | BANCO         | CUENTA      | Nº. PAGO | FECHA PGO  | Vr. PAGO     |
|----------------------------|--------------|---------------|-------------|----------|------------|--------------|
| CASTILLO ORAZO Y ASOCIADOS | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | 050-00024-9 | 951005   | 19/01/2000 | 1,270,000.00 |

\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. RENTISTICO          | CONCEPTO                            | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-------------------------------------|----------------|
| 1 50005 01-01 SOLICITUDES | 1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 600,000.00     |
|                           | TOTAL :                             | \$ 600,000.00  |

ON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS



RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. \_\_\_\_\_

VACUNAS

La presente invención se refiere a composiciones para el tratamiento o prevención del herpes zoster en individuos infectados con el Virus de la Varicela Zoster (VZV) y a la prevención o tratamiento de infecciones de varicela.

El Virus de la Varicela Zoster es un virus de herpes alfa humano que produce dos enfermedades humanas: tras la infección primaria, el VZV produce la varicela infantil y, después, el virus queda latente y frecuentemente se reactiva (a menudo décadas después) para producir herpes zoster. Durante la varicela, el virus penetra en el sistema nervioso periférico donde permanece latente hasta que se reactiva en forma de herpes zoster doloroso. Mientras que el virus está latente, la expresión de la mayoría de los genes virales está reprimida. Se cree que la inmunidad mediada por células juega un papel crucial en el control de la latencia, ya que la reactivación como herpes zoster es frecuente en la población de edad avanzada o en individuos inmunocomprometidos.

La infección por VZV se caracteriza por una presencia mínima del virus libre. Durante la latencia y la reactivación el virus es principalmente intracelular. Por consiguiente, la enfermedad recurrente no se previene

incluso por altos niveles de anticuerpos neutralizadores, y el control del virus depende de la inmunidad mediada por células. Por lo tanto, para obtener protección con la vacunación, es deseable inducir no sólo una respuesta de anticuerpos, sino también una respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL). Una vacuna eficaz debería activar CTL capaces de actuar tan pronto como sea posible y tan pronto como aparezcan los signos de reactivación del virus latente.

10        Como el mecanismo de reconocimiento de antígenos por los linfocitos T citotóxicos (CTL) implica la fragmentación del antígeno nativo en péptidos, la unión de los fragmentos proteolíticos a las moléculas del MHC y la exportación del complejo a la superficie celular, 15 cualquier polipéptido codificado por el virus, no sólo los que son proteínas integrales de la membrana tales como las glicoproteínas, puede ser un objetivo potencial de una respuesta mediada por células T. Sin embargo, como el genoma de VZV codifica para varias proteínas no 20 estructurales y proteínas internas de viriones, además de las glicoproteínas externas, esto origina un gran número de objetivos potenciales para los CTL, y no se sabe la proteína que sería la más relevante.

El genoma del virus de VZ se compone de 71 fases de 25 lectura abiertas, que codifican 68 proteínas. La secuencia

del ADN del virus es conocida (Davison y Scott 1986). La proteína gE del Virus de la Varicela Zoster se codifica por la fase de lectura abierta 68 y es la proteína más abundante e inmunogénica entre las 6 glicoproteínas de la envuelta del Virus de la Varicela Zoster. Predomina en las membranas de las células humanas infectadas con VZV (Keller et al 1984; Montalvo y Grose 1986; Dubey et al 1988). Se han detectado anticuerpos anti-gE en sujetos con una infección primaria natural y en sujetos vacunados con la vacuna OKA-VZV viva. Se ha demostrado que gE es más inmunogénica que gB y gH, las otras dos glicoproteínas predominantes de VZV (Brunell et al 1987). Un anticuerpo monoclonal activado contra gE es capaz de neutralizar el virus infeccioso in vitro (Grose 1989).

La presente invención proporciona una proteína de fusión que comprende

(1) una proteína gE del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma fusionados a

(2) una proteína diferente del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma.

Las proteínas diferentes de Virus de la Varicela Zoster incluyen cualquier otra proteína estructural y no estructural de VZV, otras proteínas tempranas inmediatas o

tempranas, o proteínas tales como gB, gH, gC o gI.

En otro aspecto de la invención se proporciona ADN o ARN recombinante que codifica la proteína de fusión de la invención. El ADN o ARN recombinante de la invención puede formar parte de un vector, por ejemplo, un plásmido, especialmente un plásmido de expresión a partir del cual puede expresarse la proteína de fusión, o de un microorganismo recombinante vivo, tal como un virus o una bacteria. Tales vectores también forman parte de la invención, así como las células hospedadoras en las que se han introducido los vectores.

En otro aspecto de la invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una proteína de fusión de acuerdo con la invención, o que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la invención, en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto preferido, la proteína de fusión de la invención comprende como componente (2) la proteína temprana inmediata de VZV IE 63 o un fragmento inmunológicamente activo de la misma.

La proteína temprana inmediata del Virus de la Varicela Zoster IE 63 (también denominada iep34) se codifica por la fase de lectura abierta 63. Tiene una masa molecular prevista de 30,5 kDa (Debrus et al, J. Virology

69(5), 1995 p 3240) y se expresa en las primeras fases del ciclo infeccioso de VZV. El gen empieza en 110581 (CODÓN DE INICIACIÓN) y llega hasta 111414 (CODÓN PARADA). Se encuentra otra copia del gen en la orientación inversa entre las bases 119316 y 118483. Se ha demostrado el papel de IE63 (también denominada ie63) en la respuesta inmune mediada por células. De una forma bastante insólita, se ha demostrado que la proteína IE 63 se expresa en un modelo de rata, en neuronas, durante la latencia. La proteína se ha expresado como una proteína de fusión en E. coli (Debrus et al).

Ahora se ha descubierto que la proteína IE 63 de VZV se detecta exclusivamente en el citoplasma de las neuronas de los ganglios trigéminos y torácicos humanos infectados de forma latente. Esta es la primera identificación de una proteína alfa del virus del herpes expresada durante la latencia en el sistema nervioso humano. La proteína IE63 de VZV es un objetivo importante para el sistema inmune y, en particular, es un objetivo de la respuesta de las células T; por lo tanto, es útil en la prevención y tratamiento de infecciones por VZV, en particular, en la prevención del herpes zoster en pacientes ya infectados con VZV.

Ahora se ha descubierto que, sorprendentemente, una composición de vacuna que comprende una proteína de fusión



de gE de VZV e IE63 de VZV estimula tanto la respuesta humoral como la respuesta mediada por células tanto contra gE como contra IE63. El nivel y la calidad de estas respuestas son similares a los observados mediante la  
5 inmunización con proteínas gE e IE63 individuales, pero la proteína de fusión gE-IE63 puede purificarse más fácilmente que las proteínas solas y, por lo tanto, muestra una clara ventaja industrial.

Por consiguiente, la presente invención  
10 preferiblemente proporciona una proteína de fusión que comprende

(1) una proteína gE del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma fusionados a

15 (2) una proteína IE63 del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma.

Este es el primer uso médico para tal proteína y, por lo tanto, la invención proporciona la proteína de  
20 fusión que combina gE de VZV y una proteína estructural o no estructural de VZV, en particular IE63 de VZV, para uso en medicina.

Para construir el ADN que codifica una proteína de fusión de acuerdo con la invención, los ADNc que contienen  
25 las secuencias codificantes de las proteínas a fusionar

10

pueden manipularse usando técnicas convencionales [véase, por ejemplo, Maniatis T. et al Molecular Cloning, Cold Spring Habor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y. (1982)].

5

En otro aspecto de la invención se proporciona un procedimiento de tratamiento de un ser humano susceptible o que sufre una infección por VZV, que comprende administrar al ser humano una cantidad segura y eficaz de una composición de vacuna de acuerdo con la invención.

10

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin los efectos secundarios adversos significativos observados en las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo del inmunógeno específico que se emplee y de cómo se presente. Generalmente, es de

15

esperar que cada dosis comprenda de 1 a 1000  $\mu$ g de proteína, preferiblemente de 2 a 100  $\mu$ g y, más preferiblemente, de 4 a 40  $\mu$ g. La cantidad óptima para una vacuna particular puede determinarse por estudios convencionales que implican la observación de respuestas

20

inmunes apropiadas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo convenientemente espaciadas.

Además de para la vacunación de personas

25

susceptibles a las infecciones por VZV, las composiciones

de vacuna de la presente invención pueden usarse para tratar inmunoterapéuticamente a pacientes que sufren infecciones por VZV, para prevenir o reducir significativamente la enfermedad recurrente, la frecuencia, la gravedad o la duración de los episodios de herpes zoster.

En una vacuna preferida de la invención, puede usarse directamente una solución acuosa de la proteína de fusión que combina el gen gE de VZV y el gen IE63 de VZV. De forma alternativa, las proteínas de fusión, con o sin liofilización previa, pueden mezclarse entre sí o con cualquiera de los diversos adyuvantes conocidos. Tales adyuvantes incluyen, pero sin limitación, hidróxido de aluminio, muramil dipéptido y saponinas tales como Quil A, en particular QS21 o monofosforil lípido A 3 Desacilado (3D-MPL), y oligonucleótidos CpG (véase el documento WO96/02555 de la Universidad de Iowa). Se prefieren adyuvantes o sistemas de adyuvantes que inducen preferentemente una respuesta TH1. En las Solicitudes de Patente Internacional Nos. WO 94/00153 y WO 95/17209 se describen adyuvantes que son capaces de realizar una estimulación preferente de la respuesta de células TH1.

Un adyuvante particularmente preferido comprende QS21 y monofosforil lípido A 3 Des-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con una emulsión de aceite en agua.

El monofosforil lípido A 3-Des-O-acilado se conoce por el documento GB 2220211 (Ribi). Químicamente, es una mezcla de monofosforil lípido A 3 Des-O-acilado con 4, 5 ó 6 cadenas aciladas y se fabrica por Ribi Immunochem 5 Montana. En la Solicitud de Patente Internacional No. WO 92/16556 se describe una forma preferida de monofosforil lípido A 3 Des-O-acilado.

QS21 es una fracción no tóxica purificada por Hplc de una saponina obtenida a partir de la corteza del árbol 10 Quillaja Saponaria Molina de Sudamérica, y el procedimiento para su producción (como QA21) se describe en la patente de Estados Unidos No. 5.057.540.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, alfa 15 tocoferol y tween 80. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener span 85 y/o lecitina.

La relación de QS21 : 3D-MPL típicamente será del orden de 1 : 10 a 10 : 1, preferiblemente de 1 : 5 a 5 : 1 y, a menudo, sustancialmente de 1 : 1. El intervalo 20 preferido para la sinergia óptima es de 2,5 : 1 a 1 : 1 de 3D MPL : QS21. Típicamente, para la administración humana QS21 y 3D-MPL estarán presentes en una vacuna en el intervalo de 1 µg a 100 µg, preferiblemente de 10 µg a 50 µg por dosis. Típicamente, la emulsión de aceite en agua 25 comprenderá de un 2 a un 10% de escualeno, de un 2 a un

10% de alfa tocoferol y de un 0,3 a un 3% de Tween 80. Preferiblemente, la relación de escualeno : alfa tocoferol es igual o menor que 1, ya que esto proporciona una emulsión más estable. Span 85 también puede estar presente  
5 a un nivel del 1%. En algunos casos, puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizante.

Como alternativa ejemplar adicional, la proteína de fusión gE-IE63 puede encapsularse dentro de  
10 micropartículas tales como liposomas. En otra alternativa ejemplar, la proteína de fusión gE-IE63 de VZV puede conjugarse con una macromolécula inmunoestimuladora, tal como Bordetella lisada o un toxoide tetánico.

La preparación de la vacuna se describe, en general,  
15 en New Trends and Developments in Vaccines, Voller et al. (eds), University Park Press, Baltimore, Maryland, 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe por Fullerton en la Patente de Estados Unidos 4.235.877. La conjugación de proteínas con macromoléculas se describe,  
20 por ejemplo, por Likhite, en la Patente de Estados Unidos 4.372.954 y por Armor et al., en la Patente de Estados Unidos 4.474.757. El uso de Quil A se describe por Dalsgaard et al., Acta Vet Scand, 18:349 (1977). 3D-MPL está disponible en Ribí immunochem, USA, y se describe en  
25 la Solicitud de Patente Británica No. 2220211 y en la

Patente de Estados Unidos 4912094. QS21 se describe en la patente de Estados Unidos No. 5057540.

El uso del polinucleótido de la invención en una inmunización genética preferiblemente empleará un procedimiento de liberación adecuado tal como la inyección directa del ADN plasmídico en los músculos (Wolff et al., Hum Mol Genet 1992, 1:363, Manthorpe et al., Hum. Gene Ther. 1993:4, 419), la liberación del ADN complejo con soportes proteicos específicos (Wu et al., J Biol Chem 1989: 264, 1985), la coprecipitación del ADN con fosfato cálcico (Benvenisty & Reshef, PNAS, 1986:83, 9551) o con otros facilitadores, la encapsulación del ADN en diversas formas de liposomas (Kaneda et al., Science 1989: 243,375), el bombardeo de partículas (Tang et al., Nature 1992, 356:152, Eisenbraun et al., DNA Cell Biol 1993, 12:791) y la infección in vivo usando vectores retrovirales clonados (Seegar et al., PNAS 1984:81,5849) o vectores virales recombinantes no infecciosos, tales como el sistema adyuvante 2 de Semliki Forest (Berglund) et al Bio/Technology 1993, 11:916-920. Los promotores adecuados para la transfección en músculo incluyen CMV, RSV, Sra, actina, MCK, alfa globina, adenovirus y dihidrofolato reductasa. Una forma preferida de liberar un polinucleótido de acuerdo con la invención utiliza partículas de oro liberadas por medio de una pistola

génica (documentos US 5100792, US 5036006 Y 4945050).

Las composiciones de polinucleótidos de la invención pueden administrarse usando las dosis y vías de administración descritas en el documento WO 90/11092. Sin embargo, será evidente que la dosis precisa dependerá de factores tales como el peso, sexo, modo de administración, salud general del paciente y el trastorno a tratar. Sin embargo, para uso intramuscular, las dosis a emplear típicamente estarán en el intervalo de 0,05  $\mu$ g/kg a aproximadamente 50 mg/kg, más típicamente de aproximadamente 0,1 a 10 mg/kg. La administración subcutánea, epidérmica, intradérmica o en mucosa puede ser ventajosa, debido a la capacidad de inducir altos niveles de CTL.

La vacuna de la presente invención puede contener además otros componentes antigénicos tales como gE, gB, gH, gI o gC de VZV o sus derivados truncados o sin anclaje, u otras proteínas tempranas inmediatas tales como la proteína IE62. En particular, gE, gB o gH truncadas, como se describe en la solicitud de Patente europea publicada con el No. 0 405 867.

En una realización preferida de la presente invención se proporciona una composición de vacuna que comprende una glicoproteína de VZV sin anclaje, especialmente gE, en combinación con la proteína de fusión

gE-IE63.

Por glicoproteína de VZV sin anclaje se entiende un derivado de glicoproteína de VZV que carece de sustancialmente toda la región de anclaje C-terminal y que  
5 permite la secreción cuando se expresa en células de mamíferos. Tales proteínas se describen en el documento EP-A-0405867.

En una realización alternativa, puede usarse directamente un polinucleótido capaz de expresar la  
10 proteína de fusión gE-IE63 como vacuna de ácido nucleico. Preferiblemente, el polinucleótido es ADN. En tales casos, el polinucleótido estará bajo el control de un promotor adecuado.

También puede usarse inmunización con ARN. En tales  
15 casos, el ARN puede prepararse de acuerdo con los procedimientos del documento WO 92/10578.

A continuación la invención se describirá adicionalmente en los siguientes Ejemplos, que sólo son  
ilustrativos y no limitan el alcance de la invención de  
20 forma alguna.

#### EJEMPLOS

##### Ejemplo 1

##### I. MATERIAL Y MÉTODOS

##### I.1 Clonación y expresión

25 I.1.a. Clonación y expresión de ie63 con el extremo



12

amino prolongado

El plásmido de expresión pNIV2094, que codifica ie63, se construyó en 5 etapas:

- Un fragmento de ADN *SspI-SspI* de 4027 pb se escindió y se recuperó del plásmido pUC19 que llevaba el fragmento *EcoRIA* genómico de VZV, los extremos se rellenaron y después el fragmento se insertó en el sitio *HincII* de pUC19, produciendo la construcción intermedia pNIV2032.
- 10 • Se recuperó un fragmento de ADN *StyI-StyI* de 832 pb a partir de pNIV2032, los extremos se rellenaron y el fragmento se insertó en el sitio *HincII* de pUC19, produciendo la construcción intermedia pNIV2052.
- 15 • Se insertó un par de oligonucleótidos sintéticos entre los sitios *NcoI* y *BamHI* de pNIV2052 para restaurar el extremo 3' de la secuencia codificante de ie63 que incluía el codón parada y para crear un sitio 3' *BamHI*. Esta construcción intermedia se ha denominado pNIV2037.
- 20 • Se recuperó una pieza de ADN *PstI-BamHI* de 856 pb a partir de pNIV2037, los extremos se rellenaron y la pieza se insertó en el sitio *EcoRV* del vector de expresión pMG81kn de *E.coli*.

18

- La última etapa implicaba una escisión por restricción con *NdeI* seguida por unión para producir el plásmido final pNIV2094.

El mapa de restricción de pNIV2094 se muestra en la  
5 Figura 1A. Por construcción, la proteína, cuando se expresa mediante el plásmido pNIV2094, lleva 10 aminoácidos N terminales adicionales que corresponden a la parte amino-terminal de la proteína NS1: MLTSTRWSKD [SEC ID NO: 1].

10 Para la expresión, se uso el plásmido pNIV2094 para transformar la cepa AR58 de *E.coli* [F<sup>r</sup>m<sup>r</sup>psL31 galk2 recA13 galE : Tn10(Tet<sup>R</sup>) $\square$ 8(chlD-pgl)]. Después, las bacterias recombinantes se dejaron crecer en medio LB enriquecido a una temperatura de hasta 30°C y a una DO<sub>620</sub>  
15 de 0,35, y después se indujeron a 42°C durante dos horas para conseguir la expresión y la producción de la proteína.

Las proteínas totales procedentes de bacterias inducidas y no inducidas se separaron en SDS-PAGE; los  
20 datos muestran que las bacterias inducidas producen una proteína de 43 kDa en una proporción de aproximadamente el 5% de las proteínas totales. Esta especie de 43 kDa se reconoce en una transferencia de Western por un antisuero policlonal de ratón activado contra un péptido ie63

(restos 70-86) y por un antisuero policlonal de conejo activado contra la proteína ie63 completa.

I.1.b Clonación y expresión de la proteína ie63 auténtica

5 El plásmido de expresión pNIV4807, que codifica la proteína ie63 autentica, se ha construido como se indica a continuación:

El plásmido pNIV2094 se sometió a restricción con *AflIII* y *HpaI* para eliminar un fragmento de ADN que  
10 comprendía 18 nucleótidos cadena arriba del codón de iniciación ATG y 66 nucleótidos cadena abajo del codón ATG. Se reemplazó por un par oligonucleotídico sintético para reconstituir la parte que faltaba del promotor y el extremo 5' de la secuencia codificante de ie63. La  
15 secuencia de los oligonucleótidos se lee como se indica a continuación:

5'TTAAGGAGGATATAACATATGTTTTGCACCTCACCGGCTACGCGGGGCG  
CCTCCTATATTGTATACAAAACGTGGAGTGGCCGATGCGCCCCGC

ACTCGTCCGAGTCAAAACCCGGGGCATCGGTTGATGTT 3'  
TGAGCAGGCTCAGTTTTGGGCCCCGTAGCCAACCTACAA 5'

Para la expresión, se usó el plásmido pNIV4807 para transformar la cepa AR58 de *E. coli* como se ha descrito anteriormente.

I.1.c. Clonación y expresión del ADN que codifica la proteína de fusión gE-ie63, pNIV4801

- El material de partida para esta construcción constaba 1) de pNIV2088 (un vector de expresión de mamífero, pEE14 (Celltech), que lleva en sus sitios *HindIII/SmaI* una pieza de ADN *HindIII/BclI* con extremos romos que corresponde a la secuencia codificante de la proteína gE sin anclaje), y 2) de pNIV2097, un plásmido que lleva una fusión gE-gB-ie63. El objetivo de este plásmido es proporcionar un acceso conveniente al ADN de ie63 para restricciones simples.
- El plásmido pNIV4801 se construyó uniendo cuatro fragmentos de ADN:
  - una pieza de ADN *EcoRI/BstEII* de 10.258 pb escindida de pNIV2088, que incluye la secuencia del vector pEE14, una secuencia genómica no traducida correspondiente a la ORF68 anterior de 56 pb del genoma de VZV y la secuencia codificante para los aminoácidos 1-316 de gE.

- un fragmento *BstEII/AvaII* de 674 pb también recuperado de pNIV2088 y que especifica los aminoácidos 317 a 540 de gE.

- un par oligonucleotídico sintético *AvaII/NspI* de 15/22 pb, que codifica para los aminoácidos 541 a 546 de gE y seguido por 3 pb que permiten, mediante el sitio *NspI*, la fusión en fase con el primer codón ATG de ie63, que por lo tanto codifica ahora una metionina interna.

5' GACCGGAGGGCTTGCAGACATG 3'

3' GCCTCCCGAACGTCT 5' [SEC ID NO: 3]

- un fragmento de ADN *NspI/EcoRI* de 841 pb recuperado de pNIV2097 y que codifica para los aminoácidos 2 a 278 de ie63.

15 Por lo tanto, el plásmido de expresión final, pNIV4801, codifica para una proteína de fusión gE (señal<sup>+</sup>, anclaje<sup>-</sup>, aa 1-546) x ie63 (aa1-aa278). (Fig. 1B). La secuencia codificante de gE carece de anclaje y contiene la NLS (señal de localización nuclear) de la proteína transactivadora ie63 también conocida como iep34.

20 La secuencia de ADN completa para pNIV4801 se proporciona más adelante como la SEC ID NO: 4. Las SEC ID NOS: 5 y 6 contienen el inserto de ADN en el vector pEE14 y la proteína de fusión codificada por dicho inserto.

Nota: pNIV4801 también se denomina pRIT14583.

Para la expresión, se uso el plásmido pNIV4801 para transfectar células CHOK1. Después de una selección con MSX 25  $\mu$ M, los clones sobrenadantes se ensayaron en una transferencia de Western con un anticuerpo monoclonal activado contra gE.

## I.2. Cultivos

### I.2.a. Fermentaciones

Se inocularon fermentadores de 10 l con precursores de bacterias *E. coli* recombinantes que llevaban los plásmidos pNIV2094 o pNIV4807. El medio de cultivo, Opti 3X-glucosa, consta de 0,66% de bactotripton; 1,5% de extracto de levadura; 1,5% de NaCl; 0,3% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1% de glucosa y 20 mg/l de kanamicina. La fermentación se realizó a 30°C y a pH 7,0. Cuando el cultivo alcanzó una  $\text{DO}_{620}$  de 13, la temperatura se cambió a 42°C y se mantuvo la inducción de la expresión de ie63 durante 2 horas. Después, las bacterias se recogieron por centrifugación durante 30 minutos a 12.000 rpm y se almacenaron a -20°C.

### 20 I.2.b. Cultivos en factorías de células de una línea de células CHOK1 recombinante (gE-ie63 n° 22) que expresa la proteína de fusión gE-ie63

La línea de células CHOK1 recombinante, gE-ie63 n° 22, se cultivó en factorías de células de 6000  $\text{cm}^2$  (NUNC) en medio GMEM (Gibco) suplementado con un 2% de suero de

ternero fetal (Gibco) y butirato sódico 2 mM. Se realizó una recolección del medio (1700 ml) cada tres días. Los conjuntos de cuatro recolecciones sucesivas, almacenados a -20°C antes del uso, se utilizaron en el proceso de purificación (véase más adelante).

### I.3. Purificación

#### I.3.a. Purificación de la proteína ie63 con el extremo amino prolongado

Se resuspendieron bacterias (60 g), recogidas de fermentadores, en tampón Tris-HCl 20 mM pH 7,5, aprotinina 1 mM y AEBSF 1 mM, y después se lisaron en una prensa francesa (2 pases a 15000 psi (103,42 MPa)). Los desechos celulares se eliminaron por una primera centrifugación (30 minutos a 15000 rpm, rotor SS34) y el sobrenadante resultante se clarificó adicionalmente por ultracentrifugación (1 hora a 45000 rpm, rotor 60TI). Después, el lisado transparente se aplicó sobre una columna de flujo rápido de Q-sepharose (15 x 2,6 cm, Pharmacia) equilibrada en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Después de un lavado considerable de la columna con el mismo tampón, las proteínas unidas se eluyeron de la columna por etapas aumentando la concentración de NaCl en el tampón.

La proteína ie63 eluye de la columna a una concentración de NaCl 400 mM; las fracciones que contenían

24

ie63 se aplicaron inmediatamente sobre una columna Blue Trisacryl Plus LS (7 x 2,6 cm, Biosepra), acondicionada en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Después de cargar y lavar la columna extensamente con el mismo tampón, la resina se eluyó por etapas con concentraciones crecientes de NaCl (500, 1000 y 2000 mM). La proteína ie63 se recuperó en fracciones de NaCl 1000 y 2000 mM. Éstas se reunieron y se aplicaron en una columna de flujo rápido de quelato de  $Ni^{2+}$  y sepharose (12 x 1 cm, Pharmacia), acondicionada en tampón PBS, pH 7,5, que contenía NaCl 500 mM. Después de lavar la columna con el tampón de partida, las proteínas se eluyeron aumentando la concentración de imidazol en el tampón de la columna. La proteína ie63 se recuperó a partir de fracciones de imidazol con concentraciones de 20 y 30 mM y su pureza se estimó en más de un 90%.

#### I.3.b Purificación de la proteína de fusión gE-ie63

Se aplicó medio de cultivo gastado (7 l, cuatro recolecciones) sobre una columna de flujo rápido de Q-sepharose (15 x 2,6 cm, Pharmacia) acondicionada en Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Después del lavado, las proteínas se liberaron de la columna mediante la adición por etapas de NaCl en tampón de acondicionamiento. La proteína gE-ie63 se recuperó en la fracción de NaCl 1000 mM. Este material después se ajustó a  $(NH_4)_2SO_4$  1000 mM y se aplicó sobre una columna de butil TSK (8 x 2,6 cm, Tosohaas), acondicionada



en tampón PBS, pH 7,5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1000 mM. La columna primero se lavó con tampón PBS suplementado con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  200 mM y después se eluyó con agua recuperando la proteína gE-ie63. La fracción enriquecida se purificó  
5 adicionalmente sobre una columna de flujo rápido de quelato de  $\text{Ni}^{2+}$  y sepharose (12 x 1 cm, Pharmacia) acondicionada en tampón PBS, pH 7,5, NaCl 500 mM. Después de lavar la columna, las proteínas unidas se eluyeron con concentraciones crecientes de imidazol. La proteína gE-  
10 ie63 eluyó en imidazol 100 mM y tenía una pureza mayor del 80%.

#### I.3.c. Purificación de proteínas gE

Los presentes solicitantes han publicado el protocolo de purificación de la proteína gE sin anclaje,  
15 producida por células CHOK1 modificadas por ingeniería genética, en *Virus Research* 40, 199-204 (1996).

#### I.4. Inmunología

##### I.4.a. Animales e inmunizaciones

Se obtuvieron ratones BalbC, hembras, de 8 semanas  
20 de edad, y cobayas Dunkin Hartley, hembras, de 500 a 600 g, de Iffa Credo.

##### Primer experimento de inmunización

Cuatro grupos de 4 ratones se inmunizaron dos veces a través de las almohadillas de las patas a intervalos de  
25 28 días. Se extrajeron muestras de sangre en los días 28 y

42. En el día 42, los ratones se sacrificaron para recuperar los bazo y los ganglios linfáticos poplíteos. Los grupos 1 y 2 recibieron 4  $\mu$ g de ie63 con el extremo amino prolongado, junto con 3D-MPL + QS21 + una emulsión de aceite en agua que contenía escualeno,  $\alpha$ -tocoferol y Tween 80 (como se describe en el documento W095/17210) como adyuvante; o 3D-MPL + una forma menos reactogénica de QS21 (como se describe en el documento W096/33739).

Los grupos 3 y 4 recibieron sólo los adyuvantes.

#### Segundo experimento de inmunización

Cinco grupos de 6 cobayas se inmunizaron dos veces por vía subcutánea a intervalos de 28 días. Las muestras de sangre se extrajeron en los días 28, 42 y 72. Todos los antígenos (8  $\mu$ g/cobaya) se mezclaron con una composición adyuvante "X", que constaba de 50  $\mu$ g de MPL/50  $\mu$ g de QS21/una emulsión de aceite en agua de escualeno + tocoferol + Tween 80, en un total de 500  $\mu$ l. El grupo 1 recibió proteína gE, el grupo 2 recibió proteína ie63 con el extremo amino prolongado, el grupo 3, la proteína de fusión gE-ie63, el grupo 4 recibió por separado gE e ie63 con el extremo amino prolongado, y el grupo 5, el adyuvante.

#### Tercer experimento de inmunización

Cinco grupos de 6 ratones se inmunizaron dos veces a través de las almohadillas de las patas a intervalos de 28

días. Se extrajeron muestras de sangre en los días 28 y 42. En el día 42, los ratones se sacrificaron para recuperar los bazo y los ganglios linfáticos poplíteos. Todos los antígenos (5  $\mu$ g/ratón) se mezclaron con adyuvante X como se ha descrito previamente. Los cinco grupos son idénticos a los descritos en el segundo experimento de inmunización.

#### I.4.b Ensayos ELISA

##### a) Específico de IgG

10 Las placas se recubrieron con la proteína gE (500 ng/pocillo), la proteína de fusión gE-ie63 (200 ng/pocillo) o la proteína ie63 con el extremo amino prolongado (20 ng/pocillo), durante 16 horas a 4°C. Después, las placas se lavaron 5 veces con 100  $\mu$ l por 15 pocillo de TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 80 al 0,1%) y se saturaron durante 1 hora a 37°C con 150  $\mu$ l del mismo tampón suplementado con 1% de BSA. Después, se incubaron diluciones en serie de 100  $\mu$ l del suero a ensayar durante 1 hora a 37°C. Las placas se 20 lavaron 5 veces con tampón TBS-Tween y los anticuerpos unidos a los antígenos se detectaron con el segundo anticuerpo (anticuerpo de cabra anti-ratón o anticuerpo de cabra anti-cobaya, Promega, USA) acoplado a fosfatasa alcalina (dilución 1/7500 en tampón TBS-Tween). La 25 actividad enzimática se midió usando el substrato

paranitrofenilfosfato (Sigma) disuelto en tampón de dietanolamina (pH 9,8). La  $DO_{415nm}$  se midió en un lector ELISA de Biorad Novapath.

b) Específico de IgG1 e IgG2a

5 Las placas se recubrieron y se saturaron como se ha descrito anteriormente. Se incubaron diluciones en serie de 100  $\mu$ l del suero a ensayar durante 1 hora a 37°C. Las IgG1 e IgG2a específicas de antígeno se detectaron con anticuerpos marcados con biotina contra IgG1 e IgG2a (de rata anti-ratón, dilución 1/7000 en tampón TBS-Tween y 1% de BSA, Biosource). Después se añadió estreptavidina conjugada con fosfatasa alcalina (dilución 1/1000, Amersham) a cada pocillo. La medición de la actividad enzimática se realizó como se ha descrito anteriormente.

15 I.4.c. Ensayos de neutralización

El virus VZV (cepa Webster) se diluyó hasta una concentración de  $4 \cdot 10^2$  pfu/ml en tampón VZV (PBS pH 7,1; 5% de sacarosa, 1% de glutamato, 10% de suero de Ternero Fetal). 100  $\mu$ l de la suspensión se incubaron durante 1 hora a 37° C con 100  $\mu$ l de diluciones en serie del suero a ensayar (después de la inactivación del complemento) en tampón VZV. Se añadieron 2  $\mu$ l de suero de cobaya (Gibco-Grand Island) a cada pocillo. La mezcla después se añadió a células MRC5 confluentes y la incubación continuó durante 2 horas a temperatura ambiente en la oscuridad. Se

añadieron 800  $\mu$ l de medio de cultivo (BME, FCS al 2%) y las células se dejaron crecer durante 7 días. En este momento, el medio gastado se desechó y las células se fijaron y después se tiñeron con azul de Coomassie durante 10 minutos (0,5% de R250, 45% de metanol, 10% de ácido acético). La valoración de neutralización se expresó como la inversa de la dilución del suero que ocasionaba una reducción del 50% del número de placas virales.

I.4.d. Acoplamiento de gE e ie63 con el extremo amino prolongado a sepharose, ensayos de agotamiento

Las proteínas gE e ie63 se acoplaron a CHB4 sepharose activada (Pharmacia, Suecia). Un miligramo de gE o ie63 con el extremo amino prolongado, preferiblemente dializadas frente al tampón de acoplamiento ( $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, NaCl 0,5 M, pH 8), se incubó con 3 ml de resina activada y 9 ml de tampón de acoplamiento. La eficacia de acoplamiento se midió por ELISA aplicando proteínas gE o ie63 residuales. Después del acoplamiento, los grupos reactivos residuales se bloquearon con Tris-HCl 0,1 M, pH 8, y el gel se lavó tres veces a pH 4 y pH 8, alternativamente. Para los ensayos de agotamiento, 100  $\mu$ l del suero a ensayar se diluyeron cinco veces en tampón PBS y se incubaron con 100  $\mu$ l de gel acoplado durante 16 horas a 4°C. El sobrenadante se recogió y el gel se lavó dos veces con 250  $\mu$ l de PBS. El control negativo para el

agotamiento se realizó en sepharose acoplada con BSA. Después del agotamiento, no se podían detectar anticuerpos residuales en el ELISA.

#### I.4.e. Ensayos de proliferación

5        Se aislaron linfocitos a partir de bazos y ganglios linfáticos poplíteos. Se incubaron  $4 \cdot 10^5$  de células, por triplicado, con diluciones en serie de antígenos, en placas de 96 pocillos (Nunc), durante 4 días (se ensayaron 2 diluciones en base 10 del antígeno, partiendo de una  
10        concentración de 25  $\mu$ g/ml). La proliferación celular se mostró midiendo la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina durante 16 horas de proliferación. Los controles negativos eran antígenos irrelevantes, obtenidos a partir de fuentes bacterianas o CHO y purificados de forma similar a los  
15        antígenos de interés.

### OII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### II.1. Clonación y expresión de ie63

El nivel de expresión para la ie63 auténtica fue del mismo orden de magnitud que el medido para la ie63 con el extremo amino prolongado. Para los estudios inmunológicos  
20        se usó la proteína ie63 con el extremo amino prolongado, ya que en ese momento no se disponía de la ie63 auténtica.

#### II.2. Purificación de las proteínas

II.2.a. Fermentación y purificación de la proteína ie63  
25        con el extremo amino prolongado

Se ha creado un protocolo de fermentación, adecuado para la producción de grandes cantidades de ie63 recombinante, a partir de bacterias transformadas con pNIV2094. Se han optimizado las condiciones de inducción para la expresión para fermentaciones de lotes de 10 litros. El análisis de transferencia de Western muestra que la adición de 10 g/l de glucosa durante el período de inducción prolonga el crecimiento bacteriano y triplica el nivel de expresión para ie63. La adición de 2 g/l de extracto de levadura no tuvo tal efecto. La regulación del pH durante la inducción parece crucial para mantener la ie63 en solución, impidiendo la agregación. A pH 7,0, el 70% de la proteína ie63 permanece soluble, mientras que este porcentaje se reduce al 20% en ausencia de regulación del pH. La proteína ie63 se purificó en tres etapas; un intercambio aniónico, una etapa de trisacril Blue y una etapa de quelato metálico. El rendimiento final del proceso de purificación fue de 250 µg de ie63 por gramo de bacteria incluida. El peso molecular, estimado por SDS-PAGE, fue de 40 kDa. Las bandas de menor Pm, también reconocidas por transferencia de Western con anticuerpos policlonales anti-ie63, representan formas degradadas de la proteína.

#### II.2.b. Purificación de la proteína de fusión gE-ie63

La proteína de fusión gE-ie63 se purificó en tres

etapas: un intercambio aniónico, una interacción hidrófoba y una etapa de quelato metálico. El protocolo es muy parecido al usado para gE, con la excepción de que la proteína de fusión eluye de la columna de Q-sepharose a una concentración de NaCl superior (1000 mM frente a 300 mM). El rendimiento final fue de 1 mg por litro de medio gastado procedente de la factoría de células. La proteína de fusión migró en SDS-PAGE como una banda ancha de 180 kDa, junto con subespecies más finas de 130, 85 y 75 kDa. Todos estos productos fueron reconocidos, en transferencias de Western, por el anticuerpo monoclonal 3D6 activado contra gE y por anticuerpos policlonales de conejo activados contra ie63. La secuencia amino terminal de estas 4 bandas se determinó por degradación de Edman; todas las secuencias resultaron idénticas y se correspondían al extremo N-terminal de la proteína gE. Aparentemente, se obtuvieron productos de menor Pm resultantes la degradación del radical ie63 de la proteína de fusión.

## II.3. Inmunología

### II.3.a. Primer Experimento

En la sección de Material y Métodos se han descrito los grupos de ratones y los programas de inmunización. Se descubrió que la valoración media de IgG específicas era significativamente menor para el grupo 1 (ie63 + 3D-MPL +



33

QS21 + una emulsión de aceite en agua) que para el grupo 2 (ie63 + 3D-MPL + QS21), es decir 8864 frente a 21148 (véase la figura 2). Los grupos de control proporcionaron señales ELISA por debajo del umbral de detección. Se determinaron las valoraciones medias para IgG1 e IgG2a en sueros de animales inmunizados (véase la figura 3 y la tabla 1 mostrada más adelante).

| Tabla 1 |         |         |
|---------|---------|---------|
|         | Grupo 1 | Grupo 2 |
|         | IgG1    | 11924   |
|         | IgG2a   | 7509    |
|         |         | 17643   |

De nuevo, la valoración media para IgG1 e IgG2a en el grupo 1 fue menor que para el grupo 2. Sin embargo, la relación IgG1/IgG2a es mayor en el grupo 1 que en el grupo 2 (1,58 frente a 1,05), lo que parece indicar que la formulación de ie63 con 3D-MPL + QS21 + una emulsión de aceite en agua desviaba la respuesta inmune hacia el tipo TH2 de una forma más evidente que con el otro adyuvante.

La respuesta linfoproliferativa se midió después de 3, 4 ó 5 días de incubación de los linfocitos con el antígeno. Las respuestas se mostraron en la Figura 4 (se reunieron células de bazo procedentes de 4 ratones de cada grupo, así como células procedentes de los ganglios linfáticos poplíteos). Sólo se observó proliferación para

el grupo 1 (ie63 + 3D-MPL + QS 21 + una emulsión de aceite en agua).

A altas concentraciones de antígeno, el índice de proliferación fue de aproximadamente 10, tanto para los bazo 5 como para los ganglios linfáticos poplíteos. Aunque 3 días son suficientes para leer la respuesta en el caso de las células de bazo, los experimentos se realizaron generalmente después de 5 días, el período de tiempo necesario para la lectura de los ganglios linfáticos 10 poplíteos. La incapacidad de observar una respuesta linfoproliferativa en el grupo 2 parece deberse a un problema técnico, ya que la respuesta humoral en este grupo era bastante satisfactoria.

Para comprobar la secreción de IFN $\gamma$  e IL-5, dos 15 citocinas típicas, respectivamente, de respuestas TH1 y TH2, se ensayó una alícuota de sobrenadantes de cultivo. Como se ve en la Figura 5, se encontraron tanto IFN $\gamma$  como IL-5, lo cual está de acuerdo con la presencia de IgG1 e IgG2a en el suero de ratones. Las mayores concentraciones 20 para las dos citocinas se obtuvieron después de 5 días de estimulación con ie63.

#### II.3.b. Segundo Experimento

Se estudió la respuesta humoral, inducida por la inyección de proteínas gE, ie63 o gE-ie63, en cobayas. Los 25 grupos y el programa de inmunización se han detallado en

la sección de Materiales y Métodos. En la Tabla 2 y en la Figura 6 se muestran las curvas y las valoraciones ELISA.

Por regla general, las valoraciones medias ELISA eran menores en el día 72 (44 días después de la 2ª inyección) que en el día 42 (14 días después de la 2ª inyección). La respuesta humoral parecía mayor con la formulación de gE + ie63 que con la formulación gE o la formulación de fusión gE-ie63, cuando se medían en un ELISA de gE.

Se hizo la misma observación cuando se comparó la formulación gE + ie63 con las otras formulaciones, como se mide en el ELISA de ie63. Sin embargo, en el ELISA de fusión, la formulación de gE + ie63 dio valoraciones del mismo orden de magnitud que la formulación de fusión gE-ie63.

Se realizaron ensayos de neutralización con suero de cobaya, para las tres muestras de sangre (véase Material y Métodos). Las valoraciones medias de neutralización se muestran en la Figura 6.

La proteína de fusión gE-ie63 inducía una valoración en los anticuerpos neutralizadores mayor que las medidas para gE o para gE + ie63, inyectadas simultáneamente. Al contrario que las valoraciones ELISA, las valoraciones de neutralización no se reducían entre los días 42 y 72. Debe indicarse que la inyección de ie63 no inducía anticuerpos

neutralizadores detectables. Eso también es evidente cuando se comparan valoraciones de neutralización inducidas por gE y gE + ie63, las cuales son similares para cada muestra de sangre.

5        Para comprobar el significado de la diferencia entre valoraciones de neutralización inducidas por gE y por la fusión gE-ie63, se agotaron sueros de la 2ª y 3ª extracción de sangre de cobayas inmunizados con la proteína de fusión sobre gE o ie63 inmovilizadas en  
10        sepharose. En las Fig. 7 y 8 se muestran las curvas ELISA para los sueros del grupo 3, antes y después del agotamiento. Después, los sueros agotados se ensayaron con respecto a la neutralización, como se muestra en la Tabla 3. El agotamiento en ie63 inmovilizada no produjo ninguna  
15        reducción significativa de la valoración de neutralización, mientras que el agotamiento en la columna de gE sepharose anuló la capacidad de neutralización. Por lo tanto, puede concluirse que la fusión entre gE e ie63 no crea nuevos epítomos.

#### 20        II.3.c. Tercer Experimento

      Los grupos y el programa de inmunización fueron idénticos a los del segundo experimento. Sin embargo, la dosis inyectada fue diferente (5 µg) y los animales eran ratones en lugar de cobayas. De nuevo, se midieron las  
25        valoraciones medias ELISA para IgG específicas. La

formulación gE + ie63 no inducía una respuesta mayor (Figura 9) que la observada con cobayas. Fuera cual fuera el ensayo ELISA usado, la valoración para esta formulación era la menor de todas.

5 Las valoraciones de IgG1 e IgG2a fueron similares en los tres casos de formulación (Figura 9). Las células de bazo y de ganglios linfáticos poplíteos se estimularon durante 5 días con concentraciones decrecientes de gE, ie63 o fusión gE-ie63.

10 Para el grupo 1 (gE), no se produjo ninguna proliferación significativa mediante la estimulación *in vitro* con gE.

Para el grupo 2 (ie63), los linfocitos proliferaron en función de la dosis de ie63 (Figura 10). Usando una  
15 proteína irrelevante como estimulador negativo, no se detectó proliferación, lo que indica que la estimulación por ie63 era específica, lo que confirma los datos obtenidos en el primer experimento (II.3.a). La proteína de fusión indujo una proliferación significativa en sólo 1  
20 de 6 ratones.

Para el grupo 3 (fusión gE-ie63) no se produjo ninguna estimulación con gE. Sin embargo, ie63 indujo una proliferación significativa de células de bazo y de ganglio linfático poplíteo (Figura 11). Este efecto es

específico, ya que la proteína de fusión inyectada procedía de células CHO, mientras que ie63 procede de bacterias.

La reestimulación de linfocitos con la proteína de fusión no produjo resultados interpretables, ya que el índice de proliferación era similar al medido con una proteína irrelevante también procedente de células CHO.

Para el grupo 4 (gE + ie63), los resultados confirmaron los obtenidos para los grupos 1, 2 y 3. gE no indujo la proliferación e ie63 indujo la proliferación en 4 de 6 ratones. Los datos para gE-ie63 no eran interpretables.

#### IIII. CONCLUSIÓN GENERAL

La inmunización de ratones y cobayas con la proteína de fusión gE-ie63 estimula tanto la respuesta humoral como la respuesta mediada por células (contra ie63 y gE).

El nivel de estas respuestas es similar al observado por la inmunización con proteínas gE e ie63 individuales. Como gE-ie63 puede purificarse más fácilmente que gE e ie63, tiene una ventaja industrial obvia.

#### Ejemplo 2

##### Expresión de gE-ie63 de VZV en CHO-K1, en suspensión

Se realizó una transfección de células CHO-K1 adaptadas al crecimiento en suspensión, sin suero, usando la misma construcción de plásmido pEE14-gE-ie64 (pero

diferente preparación de plásmido de ADN).

Se generaron nuevos clones CHO-K1 que crecían en suspensión, en condiciones sin suero (S/SF). Su nivel de expresión se evaluó por WB y análisis de Coomassie y SDS-PAGE.

#### 1. Material de partida

Se usó el ADN del plásmido pNIV 4801 para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de E. coli. Se realizó una preparación del ADN plasmídico a pequeña escala. El análisis de restricción EcoRI/HindIII indicó la presencia de 2 poblaciones de plásmidos de ADN como bandas doblete a +/- 8900-9200 pb y +/- 2200-2400, en lugar de las bandas esperadas de 9200 pb, 1281 pb y 1258 pb. Por lo tanto, se transformaron células competentes E. coli de las cepas HB101 y DH5 $\alpha$ . Se obtuvieron transformantes en DH5 $\alpha$ . Se realizaron preparaciones de ADN a pequeña escala y el ADN se digirió con EcoRI/HindIII. 3 clones candidatos de cada 12 contenían el ADN plasmídico correcto. Se realizó una preparación grande del ADN plasmídico usando el procedimiento de ultracentrifugación CsCl-EtBr (dos veces). Se eligió el ADN plasmídico candidato pEE14 gE-  
ie63 n° 17/2, se denominó pRIT15077 y se usó adicionalmente para las transfecciones de CHO-K1.

Se realizaron varios análisis de enzimas de restricción sobre el plásmido No. 17/2 y se secuenciaron

el inserto gE-ie64 completo y las regiones 5' y 3' flanqueantes, considerándose correctos.

## 2. Transfección de CHO-K1 S/SF

Se realizó la transfección de células CHO-K1 procedentes de Master Cell Bank MCB CHO-K1 028W 1996/2 SHF P31 en p40 (suspensión, sin suero) con el plásmido pEE14 gE-ie63 No. 17/2 (también denominado pRIT15077) usando la técnica clásica de coprecipitación de ADN con Fosfato Cálculo. Las células se contaron 48 horas después de la transfección y se transfirieron a placas de 96 pocillos (Costar) a una concentración de 5000 células/pocillo.

Los clones transfectantes se seleccionaron de acuerdo con un procedimiento modificado del sistema de expresión GS descrito por Crockett et al. (Biotechnology 1990, vol. 8, p. 662) y se amplificaron en presencia de metionina sulfoximina (MSX) 30  $\mu$ M en medio GMEM (Gibco) que no contenía glutamina y suplementado con aditivos (glutamato/asparagina/nucleósidos) y 5% de FBS (suero bovino fetal, QA SBBio certificado) dializado.

Las células se lavaron con medio nuevo tres veces en la primera semana y dos veces en la segunda semana después de la transfección. En el tercer lavado, se añadió un 20% de medio acondicionado y después las células se lavaron cada 3-4 días.

De 3 a 6 semanas después de la transfección, se



transfirieron clones transfectantes resistentes a MSX a placas de 24 pocillos, se recogieron los sobrenadantes de cultivo y se ensayaron con respecto a la expresión (secreción) de la proteína de fusión gE-ie64 por análisis WB usando un  $\square$ D6 monoclonal específico de gE.

La expresión de la proteína de fusión gE-ie64 se detectó en 10 de cada 22 clones ensayados (procedentes de 2 transfecciones).

Se seleccionaron clones por su mayor expresión y por su buen crecimiento y viabilidad (clones n° 3, 7 y 8), se readaptaron a condiciones de suspensión sin suero y se evaluaron y caracterizaron adicionalmente.

La expresión se evaluó a 37°C y 33°C en presencia o ausencia de butirato sódico (2 mM). La expresión (1-5 mg/l) de la proteína gE-ie64 secretada pudo detectarse por análisis WB ( $\square$ D6) y por tinción con Coomassie. Mediante el análisis WB ( $\square$ D6), pudieron detectarse una banda principal a 66kD y una banda minoritaria a 85 kD.

Este modelo de bandas fue bastante diferente del modelo de 4 bandas obtenido con la expresión en cultivos adherentes y suero.

Se realizó un experimento en el cual el clon n° 3, que crecía en S/SF, se cultivó en presencia de 1% de suero en medio GMEM. Después del análisis WB del sobrenadante de cultivo, pudo detectarse un modelo de bandas heterogéneo

42

con 2 bandas principales a 130 kD y 66 kD. Sería de esperar que la banda de 130 kD fuera la proteína de fusión gE-ie63 secretada normalmente que contenía modificaciones de glicosilación.

- 5 Otro clon transfectante, el No. 27, crece lentamente (tarda +/- 3 semanas más que los otros clones) mostrando una banda fuerte principal a 130 kD en presencia de un 5% de suero (24 pocillos).

### 3. Amplificaciones MSX

- 10 Para aumentar adicionalmente el nivel de expresión de los clones CHO-K1 gE-ie64, se añadieron diversas concentraciones (100, 250 y 500  $\mu$ M) de MSX al cultivo de células de los clones 3, 7 y 8. Se realizó un análisis de expresión para +/- suero, y +/- inhibidores de proteasa.

Tabla 2

2º experimento

|           |    | Día 0                           |      | Día 30  |        | Tabla 2                         |      |         |        |                                 |      |         |        |  |  |
|-----------|----|---------------------------------|------|---------|--------|---------------------------------|------|---------|--------|---------------------------------|------|---------|--------|--|--|
|           |    |                                 |      |         |        | 2º experimento                  |      |         |        |                                 |      |         |        |  |  |
| Cobaya    |    | Extracción se sangre 1 (D = 30) |      |         |        | Extracción de sangre 2 (D = 42) |      |         |        | Extracción de sangre 3 (D = 72) |      |         |        |  |  |
|           |    | Elisa                           |      |         | Neutra | Elisa                           |      |         | Neutra | Elisa                           |      |         | Neutra |  |  |
|           |    | gE                              | ie63 | gE-ie63 |        | gE                              | ie63 | gE-ie63 |        | gE                              | ie63 | gE-ie63 |        |  |  |
| gE        | c1 | 292                             |      |         | 0      | 23684                           |      | 9023    | 960    | 8337                            |      | 2985    | 640    |  |  |
|           | c2 | 226                             |      |         | 0      | 7973                            |      | 1509    | 60     | 2549                            |      | 875     | 240    |  |  |
|           | c3 | 359                             |      |         | 60     | 13978                           |      | 4727    | 60     | 4598                            |      | 2474    | 480    |  |  |
|           | c4 | 118                             |      |         | 30     | 15233                           |      | 5909    | 1280   | 10829                           |      | 2620    | 1920   |  |  |
|           | c5 | 263                             |      |         | 0      | 9320                            |      | 2096    | 120    | 1840                            |      | 965     | 240    |  |  |
|           | c6 | 61                              |      |         | 0      | 6351                            |      | 1778    | 240    | 14300                           |      | 706     | 480    |  |  |
| ie63      | c1 |                                 | <20  |         | 0      |                                 | 4197 | 1026    | 0      |                                 | 1515 | 519     | 0      |  |  |
|           | c2 |                                 | <20  |         | 0      |                                 | 263  | 83      | 0      |                                 | <50  | <50     | 0      |  |  |
|           | c3 |                                 | <20  |         | 0      |                                 | 188  | <50     | 0      |                                 | 51   | <50     | 0      |  |  |
|           | c4 |                                 | <20  |         | 0      |                                 | 696  | 116     | 30     |                                 | 112  | <50     | 0      |  |  |
|           | c5 |                                 | <20  |         | 0      |                                 | 70   | 80      | 0      |                                 | <50  | <50     | 0      |  |  |
|           | c6 |                                 | <20  |         | 0      |                                 | 829  | 50      | 0      |                                 | 1207 | 278     | 0      |  |  |
| gE-ie63   | c1 | 69                              | 81   | 105     | 0      | 5939                            | 2433 | 6915    | 320    | 6131                            | 788  | 2725    | 480    |  |  |
|           | c2 | 51                              | 32   | 51      | 0      | 9120                            | 4413 | 7380    | 480    | 2973                            | 3266 | 3041    | 480    |  |  |
|           | c3 | 67                              | 36   | 111     | 0      | 5142                            | 2344 | 6455    | 0      | 2690                            | 979  | 2194    | 240    |  |  |
|           | c4 | 313                             | 86   | 250     | 30     | 15959                           | 3479 | 12140   | 1920   | 10716                           | 2014 | 5888    | 1920   |  |  |
|           | c5 | 1307                            | 257  | 1152    | 0      | 20795                           | 2622 | 16749   | 1920   | 13161                           | 1495 | 6147    | 3840   |  |  |
|           | c6 | 456                             | 116  | 346     | 0      | 5213                            | 2418 | 5518    | 1920   | 7240                            | 2293 | 3349    | 1920   |  |  |
| gE+ie63   | c1 | 1294                            | 35   |         | 0      | 25805                           | 7821 | 9669    | 60     | 15733                           | 2544 | 5580    | 960    |  |  |
|           | c2 | 797                             | <20  |         | 0      | 22039                           | 5670 | 13096   | 0      | 9913                            | 934  | 4566    | 0      |  |  |
|           | c3 | 127                             | <20  |         | 0      | 2271                            | 2270 | 1966    | 480    | 8534                            | 972  | 4738    | 960    |  |  |
|           | c4 | 373                             | <20  |         | 240    | 36576                           | 3009 | 13213   | 1920   | 1612                            | 567  | 2915    | 1920   |  |  |
|           | c5 | 242                             | <20  |         | 0      | 18474                           | 780  | 6618    | 30     | 12800                           | 1369 | +       | +      |  |  |
|           | c6 | 2265                            | 52   |         | 60     | 18854                           | 5360 | 11145   | 240    | 3295                            | 1101 | 1534    | 640    |  |  |
| Adyuvante | c1 | <20                             | <20  | <20     | 0      | <50                             | <50  | <50     | 0      | <50                             |      | <50     | 0      |  |  |
|           | c2 |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |  |  |
|           | c3 |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |  |  |
|           | c4 |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |  |  |
|           | c5 |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |  |  |
|           | c6 |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |                                 |      |         | 0      |  |  |

**Tabla 3**  
**Valoración de neutralización antes y después del**  
**agotamiento**

| Grupo 3 | 2ª extracción de sangre |                      |                        | 3ª extracción de sangre |                      |                        |
|---------|-------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|----------------------|------------------------|
|         | Antes                   | Agotamiento<br>de gE | Agotamiento de<br>ie63 | Antes                   | Agotamiento<br>de gE | Agotamiento<br>de ie63 |
| C1      | 320                     | 30                   | 320                    | 480                     | 20                   | 480                    |
| C2      | 480                     | 40                   | 480                    | 480                     | 40                   | 320                    |
| C3      | 0                       | 0                    | 0                      | 240                     | 0                    | 240                    |
| C4      | 1920                    | 40                   | 1920                   | 1920                    | 60                   | 1920                   |
| C5      | 1920                    | 60                   | 1920                   | 3840                    | 80                   | 2560                   |
| C6      | 1920                    | 40                   | 1920                   | 1920                    | 40                   | 1920                   |

45  
45

Secuencias de ADN y de Proteínas

Secuencia de ADN de pNIV4801 [SEC ID NO: 4]

GAATTCATTGATCATTAAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTG  
CTTTAAAAAACCTCCCACACCTCCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAA  
TGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAA  
AGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCT  
AGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCCTCT  
ACGCCGGACGCATCGTGGCCGGCATCACCGGCGCCACAGGTGCGGTTGCT  
GGCGCCTATATCGCCGACATCACCGATGGGGAAGATCGGGCTCGCCACTTC  
GGGCTCATGAGCGCTTGTTTCGGCGTGGGTATGGTGGCAGGCCCGTGGCC  
GGGGGACTGTTGGGCGCCATCTCCTTGCATGCACCATTCTTGCGGCGGCG  
GTGCTCAACGGCCTCAACCTACTACTGGGCTGCTTCCTAATGCAGGAGTCG  
CATAAGGGAGAGCGTCGACCTCGGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG  
CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG  
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCT  
CCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC  
CTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTA  
TCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACC  
CCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTC  
CAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACA  
GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGG  
TGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTG  
CTGAAG  
CCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACC  
ACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA  
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT  
CAGTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAA  
AGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTAAATCAATC  
TAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT  
GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGA  
CTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCC

AGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCA  
GCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAAC  
TTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAG  
TAGTTCGCCAGTTAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCAT  
CGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCCA  
ACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTA  
GCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTAT  
CACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTATGCCATCCGT  
AAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATA  
GTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATAC  
CGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTC  
GGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA  
ACCC

ACTCGTGCAACCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTG  
GGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGC  
GACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGC  
ATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAG  
AAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCT  
GACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGT  
ATCACGAGGCCCTGATGGCTCTTTGCGGCACCCATCGTTTCGTAATGTTCCG  
TGGCACCGAGGACAACCCTCAAGAGAAAATGTAATCACACTGGCTCACCTT  
CGGGTGGGCCTTTCTGCGTTTATAAGGAGACACTTTATGTTTAAGAAGGTT  
GGTAAATTCCTTGCGGCTTTGGCAGCCAAGCTAGAGATCCAGCTTTTTGCA  
AAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGAATAGCTCAGA  
GGCCGAGGCGGCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCAT  
GGGGCGGAGAATGGGCGGAAGTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGG  
AGTTAGGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCAT  
ACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTA  
ATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTT  
TCCACACCCTAACTGACACACATTCCACAGGGAAGCTAGCTTGGAATTAAT  
TCCCCGCCCCCTTCCAATACAAAACTAATTAGACTTTGAGTGATCTTGAG  
CCTTTCCTAGTTTTTGTATTGGAAGGGCTCGTCGCCAGTCTCATTGAGAAG

GCATGTGCGGACGATGGCTTCTGTCACTGCAAAGGGGTACAAATTGGCAG  
AGGGGCG  
GCGGTCTTCAAAGTAACCTTTCTTCTCCTGGCCGAGCCGAGAATGGGAGTA  
GAGCCGACTGCTTGATTCCACACCAATCTCCTCGCCGCTCTCACTTCGCCT  
CGTTCTCGTGGCTCGTGGCCCTGTCCACCCCGTCCATCATCCCGCCGGCCA  
CCGCTCAGAGCACCTTCCACCATGGCCACCTCAGCAAGTTCCCACTTGAAC  
AAAAACATCAAGCAAATGTACTTGTGCCTGCCCCAGGGTGAGAAAGTCCA  
AGCCATGTATATCTGGGTTGATGGTACTGGAGAAGGACTGCGCTGCAAAA  
CCCGCACCCCTGGACTGTGAGCCCAAGTGTGTAGAAGAGTTACCTGAGTGG  
AATTTTGATGGCTCTAGTACCTTTCAGTCTGAGGGCTCCAACAGTGACATG  
TATCTCAGCCCTGTTGCCATGTTTCGGGACCCCTTCCGCAGAGATCCCAAC  
AAGCTGGTGTCTGTGAAGTTTTCAAGTACAACCGGAAGCCTGCAGAGACC  
AATTTAAGGCACTCGTGTAACGGATAATGGACATGGTGAGCAACCAGCA  
CCCCTGGTTTGAATGGAACAGGAGTATACTCTGATGGGAACAGATGGGC  
ACCCTTTTGGTTGGCCTTCCAATGGCTTTCCTGGGCCCCAAGGTCCGTATT  
ACTGTGGTGTGGGCGCAGACAAAGCCTATGGCAGGGATATCGTGGAGGCT  
CACTACCGCGCCTGCTTGTATGCTGGGGTCAAGATTACAGGAACAAATGCT  
GAGGTCATGCCTGCCCAGTGGGAACCTCAAATAGGACCCTGTGAAGGAAT  
CCGCATGGGAGATCATCTCTGGGTGGCCCGTTTCATCTTGCATCGAGTATG  
TGAAGACTTTGGGGTAATAGCAACCTTTGACCCCAAGCCCATTCTGGGAA  
CTGGAATGGTGCAGGCTGCCATACCAACTTTAGCACCAAGGCCATGCGGG  
AGGAGAATGGTCTGAAGTAAGTAGCTTCCTCTGGAGCCATCTTTATTCTCA  
TGGGGTGGAA  
GGGCTTTGTGTTAGGGTTGGGAAAGTTGGACTTCTCACAACCTACATGCCA  
TGCTCTTCGTGTTTGTGATAACCTATCGTTTTGTACCCGTTGGAGAAGTGAC  
AGTACTCTAGGAATAGAATTACAGCTGTGATATGGCAAAGTTGTCACGTAG  
GTTCAAGCATTTAAAGGTCTTTAGTAAGAACTAAATACACATACAAGCAAG  
TGGGTGACTTAATTCTTACTGATGGGAAGAGGCCAGTGATGGGGGTCTTCC  
ATCCAAAAGATAATTGGTATTACATGTTAGCGGACATGGTCTGAAGCACTT  
AGCAGCACATAGTACACGGACAGACACGTCCGACTAACGTATTTATTGGTT  
TCTTATAAGTCATCGTCCGTCTCCGCCCTgggggggggggggggggggggggggggggg  
gggggggAAGACTGTCTGAAGCATTGAGACATAGGTACAAGGCAGACACAG

CCTCCATCAATATTTATTGTTTCTTGAACATCATGCCTGGCTCCTGCCC GTTG  
AAGGACAGGTTTCCTAGGTGACAAGGTCAGACCCTCACCTTTACTGCTTCC  
ACCAGCCAGGCACATCGAGGAGGCCATGGAGAACTAAGCAAGCGGCACC  
GGTACCACATTTCGAGCCTACGATCCCAAGGCGGCCCTGGACAATGCCCGTC  
GTCTGACTGGGTTCCACGAAACGTCCAACATCAACGCATTTTCTGCTGGTG  
TCGCCAAGTCGAATCGATCCGATTGCGAGAGAATTATTAAGACGCGCCCTC  
TGCAATGTGACCTTGCAGTGACAGAAGCCATCGTCCGCACATGCCTTCTCA  
ATGAGACTGGCGACGGAGCCCTTCCAATACAAAACCTAATTAGACTTTGAG  
TGATCTTGAGCCTTTCCTAGTTCATGCCACCCCGCCCCAGCTGTCTCATTGT  
AACTCAAAGGATGGAATATCAACGGTCTTTTTATTCTCGTGCCCAAGTTAA  
TCCTTGCTTTTATTGGTCAGAATAGAGGAGTCAAGTTCTTAAT  
GCCTATACACCAACCTCATTTCCTTTCTATTAGCTTTCTACGTGGGGGTGG  
GAGGGGTAGGGAGGGGTAGGCGAAGGGAACGTAACCACATGCTTCATCTC  
ATCAGGAATGCCATGTCCAGTAGGCAGAGCTGCCAAAGGTGTTATCTGAG  
AGCTTTTACggggggTGCTAGTTCCTCAGGTAAACCAACTTTCTATTCCAAA  
TGGAAGTTAGGTGAGGAGTAGTGAGGAGTTAATGCCCTCCATGAAGACA  
GCTCAGTGTATCACCTGAGACAGATGGGTAGCCCTACTGTAAAAGAAGGA  
AAAGTTATTTCTGGGTCTCCATTATAACACAAAGCAGTAGTATTTTATA  
TTTAAATGTAAAAACAAAAGTTATATATATGATATGTGGATATATGTGTAT  
TTCTAATTCAGAAACCATCCTAGTTACTGGGTTTGCCAAGTTTGAAGAGCT  
TGGTTAACAAGAAAGGATCTCTTGAGTAGAGGTGGGGGTGCAGTACCAGG  
AAAGTGGTTATCTGGGGCTCAGCCCTTATTACTATGTGGGGTTTCCCTGC  
CCACTCTGCAGGAGCAGATGCTGGACAGGTAGCCAGGGTGGGACACAGTG  
CTTGCCACCACCTGTCCCTGTGCTTAGGCCTAAGATGCATATCTATCCACA  
CAGAGTTAGCAGGATGGAGTTGGCTGGTCAACTTGAACATTTGTTACTGAT  
AGGGGTGGTGGGTTTATTTTTTGGTGGCATAGCATGTCACATAAAGCAGGC  
CTTTGATATATTAAATTTTTTAAAGCAAACATGTTTCACTTTATCACCTTG  
TAGGGTTTCTAACTTTACAGAATTGCCTGTTTGTTCAGTGTCTCCATCCAC  
TTTGCTCTTGAGGAACGGAGGACAGGCAGACCTGGAGTTAAAACATTTG  
TCATTTTGTGTCATAGTGTCTACTTTCTCCAGCCAGAATATTCCTTTCCTT  
CTTAGGAGTCCTATGGAGTTTTGTTTTTGTTTTTTTCTATTACGATAAACA  
TA



49

CCCCACCTCCATTCTGGCTTGCCCTGCTGTTCTCTGGTTGTTTGTGTGCTGT  
CCGCAGCAGGCTGCCTGTGGTTTTCTCTTGCCATAGCAGCTTCTAATTGCC  
ATGTACGATATGTTGATTAGATAACTCCTCATGTAAACAGACTGTAAGT  
CCAGAGCAGCGCTTATAAATCAACCTAACATTTATAAGATTTCTCTTGAC  
TTGTTTCTTTGTGGTTGGCGGAGGAAGAAAAAAGCTGCAGTATTTTT  
TTGTTCCCTTCATTTCTATCAAAAGAAAGGGGAGTGGTTCTGTTTTGTTTAC  
TCGCAAAATAAGCTTATCTATTGGCTTTTCTTTTTTTTTTTTTTAAACGG  
GCTTTTTCTTGTACCTAAATTTGGGGTAAGGTGTGAGAGTTTTTATAGTTTT  
TTGAGACAGGGTCTTGGTGTATACCCTTGCTGGCCCTGGAGCTAACTATG  
TAGACTGGGCTAGCCTTTAACTTGCAGTTCTGGTTTCAATTAGGGTTTATA  
CATTTAGTCTTGGCAATTCCTAGGTCCACGTTTAATCTCTTTACATTTCA  
AAGCAGTGTATCTGAAGAGTTCAGGCGggCAGAGTgggggAATTCAATAGA  
GTTACggAAAAAGCTAAAAACAAGTTTTAAATACCAAgGTTATGTTGGgGG  
gGTGGCggCTTTTCACAGCTCCgTGAAGGTTTCGAGTTTGAACTGAATAATC  
GAGGGGTGAGAAAGTCTTGATCTTATCCCCACAGTATGGCACCAAGCCTG  
GCTGTGCCTTCTAGCTTAGTCTGCCCTGTTGCTATTTAAGCACTTCTTCAC  
TAGGCAAAAATAAAAGGAGCTTCCTCCTTTGCCATGGCGCTGTGCATGATA  
CGAAAAGGTAGCTATCTACTAGCATATTAAGTCCACTGTTTTTGCTTTGTGT  
GTTTGGTTTTTTGAGGAAGGGTCTCAACTGTGTATCCCTGGCTGGCCTGGCC  
GGATCTAGCTTCGTGTCAAGGACGGTGACTGCAGTGAATAATAA  
AATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTGCGCCGACTAAA  
TTCATGTGCGCGATAGTGGTGTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGG  
AAAAATCGATATTTGAAAATATGGCATATTGAAAATGTGCGCGATGTGAGT  
TTCTGTGTAAGTGAATCGCCATTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGC  
GATATCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGA  
CTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTGCGAAATATCGCAGTTTCGATAT  
AGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCT  
GGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCCATT  
AGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCC  
ATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGT  
CCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA  
TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA

TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCA  
TTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTC  
CATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA  
CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGT  
AAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCT  
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG  
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATT  
CCAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAT  
CAA

CGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGC  
GGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA  
CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAG  
ACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGAACGGTGCAATTGGAACGC  
GGATTCCCCGTGCCAAGAGTGACGTAAGTACCGCCTATAGAGTCTATAGGC  
CCACCCCTTGGCTTCTTATGCATGCTATACTGTTTTGGCTTGGGGTCTAT  
ACACCCCGCTTCCTCATGTTATAGGTGATGGTATAGCTTAGCCTATAGGT  
GTGGGTTATTGACCATTATTGACCACTCCCTATTGGTGACGATACTTCC  
ATTACTAATCCATAACATGGCTCTTTGCCACAACCTCTCTTTATTGGCTATAT  
GCCAATACACTGTCCTTCAGAGACTGACACGGACTCTGTATTTTACAGGA  
TGGGGTCTCATTATTTATTTACAAATTCACATATAACAACACCACCGTCCCCA  
GTGCCCCGAGTTTTTTATTAACATAACGTGGGATCTCCACGCGAATCTCGG  
GTACGTGTTCCGGACATGGGCTCTTCTCCGGTAGCGGCGGAGCTTCTACAT  
CCGAGCCCTGCTCCCATGCCTCCAGCGACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCT  
TGCTCCTAACAGTGGAGGCCAGACTTAGGCACAGCACGATGCCACCACC  
ACCAGTGTGCCGACAAGGCCGTGGCGGTAGGGTATGTGTCTGAAAATGA  
GCTCGGGGAGCGGGCTTGACCGCTGACGCATTTGGAAGACTTAAGGCAG  
CGGCAGAAGAAGATGCAGGCAGCTGAGTTGTTGTGTTCTGATAAGAGTCA  
GAGGTAACCTCCCGTTGCGGTGCTGTTAACGGTGGAGGGCAGTGTAGTCTG  
AGCAGTACTCGTTGCTGCCGCGCGGCCACCAGACATAATAGCTGACAGA  
CTAACAGA

CTGTTCTTTCCATGGGTCTTTTCTGCAGTCACCGTCCTTGACACGAAGCTT  
CGGGCGAATTGCGTGGTTTTAAGTGACTATATTCCGAGGGTCGCCTGTAAT

ATGGGGACAGTTAATAAACCTGTGGTGGGGGTATTGATGGGGTTCGGAAT  
TATCACGGGAACGTTGCGTATAACGAATCCGGTCAGAGCATCCGTCTTGCG  
ATACGATGATTTTCACACCGATGAAGACAACTGGATACAACTCCGTATA  
TGAGCCTTACTACCATTGAGATCATGCGGAGTCTTCATGGGTAAATCGGGG  
AGAGTCTTCGCGAAAAGCGTACGATCATAACTCACCTTATATATGGCCACG  
TAATGATTATGATGGATTTTTAGAGAACGCACACGAACACCATGGGGTGTA  
TAATCAGGGCCGTGGTATCGATAGCGGGGAACGGTTAATGCAACCCACAC  
AAATGTCTGCACAGGAGGATCTTGGGGACGATACGGGCATCCACGTTATC  
CCTACGTTAAACGGCGATGACAGACATAAAATTGTAAATGTGGACCAACG  
TCAATACGGTGACGTGTTTAAAGGAGATCTTAATCCAAAACCCCAAGGCCA  
AAGACTCATTGAGGTGTCAGTGGAAGAAAATCACCCGTTTACTTTACGCGC  
ACCGATTGAGCGGATTTATGGAGTCCGGTACACCGAGACTTGGAGCTTTTT  
GCCGTCATTAACCTGTACGGGAGACGCAGCGCCCGCCATCCAGCATATATG  
TTTAAACATACAACATGCTTTCAAGACGTGGTGGTGGATGTGGATTGCGC  
GGAAAATACTAAAGAGGATCAGTTGGCCGAAATCAGTTACCGTTTTCAAG  
GTAAGAAGGAAGCGGACCAACCGTGGATTGTTGTAAACACGAGCACACTG  
TTTGATGAACTCGAATTAGACCCCCCGAGATTGAACCGGGTGTCTTGAAA  
GTA CTTCGGACAGAAAAACAATACTTGGGTGTGTACATTTGGAACATGCGC  
GGCTCCGA  
TGGTACGTCTACCTACGCCACGTTTTTGGTCACCTGGAAAGGGGATGAAAA  
AACAAGAAACCCTACGCCCCGAGTAACCTCCTCAACCAAGAGGGGCTGAGT  
TTCATATGTGGAATTACCACTCGCATGTATTTTCAGTTGGTGATACGTTTAG  
CTTGGAATGCATCTTCAGTATAAGATACATGAAGCGCCATTTGATTTGCT  
GTTAGAGTGGTTGTATGTCCCATCGATCCTACATGTCAACCAATGCGGTT  
ATATTCTACGTGTTTGTATCATCCCAACGCACCCCAATGCCTCTCTCATATG  
AATTCGGTTGTACATTTACCTCGCCACATTTAGCCCAGCGTGTGCAAGC  
ACAGTGTATCAAAATTGTGAACATGCAGATAACTACACCGCATATTGTCTG  
GGAATATCTCATATGGAGCCTAGCTTTGGTCTAATCTTACACGACGGGGGC  
ACCACGTTAAAGTTTGTAGATACACCCGAGAGTTTGTGCGGATTATACGTT  
TTTGTGGTGTATTTTAAACGGGCATGTTGAAGCCGTAGCATACACTGTTGTA  
TCCACAGTAGATCATTTTGTAAACGCAATTGAAGAGCGTGGATTTCCGCCA  
ACGGCCGGTCAGCCACCGGCGACTACTAAACCAAGGAAATTACCCCCGT

25

AAACCCCGGAACGTCACCACTTCTACGATATGCCGCATGGACCGGAGGGC  
TTGCAiGACATGTTTTGCACCTCACCGGCTACGCGGGGCGACTCGTCCGAG  
TCAAACCCGGGGCATCGGTTGATGTAAACGGAAAGATGGAATATGGATC  
TGCACCAGGACCCCTGAACGGCCGGGATACGTCGCGGGGCCCCGGCGCGT  
TTTGTACTCCGGGTTGGGAGATCCACCCGGCCAGGCTCGTTGAGGACATCA  
ACCGTGTTTTTTTATGTATTGCACAGTCGTCGGGACGCGTCACGCGAGATT  
CACGAAGATTGCGGCGCATATGCCTCGACTTTTATCTAATGGGTGCGACCA  
GACAGC  
GTCCACGTTAGCGTGCTGGGAGGAATTGTTACAGCTTCAACCCACCCAGA  
CGCAGTGCTTACGCGCTACTTTAATGGAAGTGTCCCATCGACCCCCTCGGG  
GGGAAGACGGGTTCAATTGAGGCGCCGAATGTTCTTTGCATAGGAGCGCA  
CTGGAATGTGACGTATCTGATGATGGTGGTGAAGACGATAGCGACGATGA  
TGGGTCTACGCCATCGGATGTAATTGAATTTCTGGGATTCCGACGCGGAATC  
ATCGGACGGGGAAGACTTTATAGTGGAAGAAGAATCAGAGGAGAGCACCG  
ATTCTTGTGAACCAGACGGGGTACCCGGCGATTGTTATCGAGACGGGGAT  
GGGTGCAACACCCCGTCCCCAAAGAGACCCAGCGTGCCATCGAGCGATA  
CGCGGGTGCAGAAACCGCGGAATATACAGCCGCGAAAGCGCTACCGCGT  
TGGGCGAGGGGGGTGTAGATTGGAAGCGACGTCGACACGAAGCCCCGCGC  
CGGCATGATATACCGCCCCCCCATGGCGTGTAGTTGAAT

Secuencia de ADN del inserto del Plásmido [SEC ID NO: 5]

La región en *itálica* es la región no traducida. Las regiones subrayadas son el sitio de iniciación ATG, el ATG de ie63 que codifica para una metionina interna y el codón de parada.

1 AGCTTCGGG CGAATTGCGT GGTTTTAAGT GACTATATTC CGAGGGTCGC  
51 CTGTAAT*ATG* GGGACAGTTA ATAAACCTGT GGTGGGGGTA TTGATGGGGT  
101 TCGGAATTAT CACGGGAACG TTGCGTATAA CGAATCCGGT CAGAGCATCC  
151 GTCTTGCGAT ACGATGATTT TCACACCGAT GAAGACAAAC TGGATACAAA  
201 CTCCGTATAT GAGCCTTACT ACCATTCAGA TCATGCGGAG TCTTCATGGG  
251 TAAATCGGGG AGAGTCTTCG CGAAAAGCGT ACGATCATAA CTCACCTTAT

54

301 ATATGGCCAC GTAATGATTA TGATGGATTT TTAGAGAACG CACACGAACA  
 351 CCATGGGGTG TATAATCAGG GCCGTGGTAT CGATAGCGGG GAACGGTTAA  
 401 TGCAACCCAC ACAAATGTCT GCACAGGAGG ATCTTGGGGA CGATACGGGC  
 451 ATCCACGTTA TCCCTACGTT AAACGGCGAT GACAGACATA AAATTGTAAA  
 501 TGTGGACCAA CGTCAATACG GTGACGTGTT TAAAGGAGAT CTTAATCCAA  
 551 AACCCCAAGG CCAAAGACTC ATTGAGGTGT CAGTGGAAGA AAATCACCCG  
 601 TTTACTTTAC GCGCACCGAT TCAGCGGATT TATGGAGTCC GGTACACCGA  
 651 GACTTGGAGC TTTTGGCGT CATTAACTG TACGGGAGAC GCAGCGCCCG  
 701 CCATCCAGCA TATATGTTTA AAACATACAA CATGCTTTCA AGACGTGGTG  
 751 GTGGATGTGG ATTGCGCGGA AAATACTAAA GAGGATCAGT TGGCCGAAAT  
 801 CAGTTACCGT TTTCAAGGTA AGAAGGAAGC GGACCAACCG TGGATTGTG  
 851 TAAACACGAG CACACTGTTT GATGAACTCG AATTAGACCC CCCCAGATT  
 901 GAACCGGGTG TCTTGAAAGT ACTTCGGACA GAAAAACAAT ACTTGGGTGT  
 951 GTACATTTGG AACATGCGCG GCTCCGATGG TACGTCTACC TACGCCACGT  
 1001 TTTTGGTCAC CTGGAAAGGG GATGAAAAAA CAAGAAACCC TACGCCCGCA  
 1051 GTAACCTCTC AACCAAGAGG GGCTGAGTTT CATATGTGGA ATTACCACTC  
 1101 GCATGTATTT TCAGTTGGTG ATACGTTTAG CTTGGCAATG CATCTTCAGT  
 1151 ATAAGATACA TGAAGCGCCA TTTGATTTGC TGTTAGAGTG GTTGATGTC  
 1201 CCCATCGATC CTACATGTCA ACCAATGCGG TTATATTCTA CGTGTGTTGA  
 1251 TCATCCCAAC GCACCCCAAT GCCTCTCTCA TATGAATTCC GGTTGTACAT  
 1301 TTACCTCGCC ACATTTAGCC CAGCGTGTTG CAAGCACAGT GTATCAAAAT  
 1351 TGTGAACATG CAGATACTA CACCGCATAT TGCTGGGAA TATCTCATAT  
 1401 GGAGCCTAGC TTTGGTCTAA TCTTACACGA CGGGGGCACC ACGTTAAAGT  
 1451 TTGTAGATAC ACCCGAGAGT TTGTCGGGAT TATACGTTTT TGTGGTGTAT

1501 TTTAACGGGC ATGTTGAAGC CGTAGCATAC ACTGTTGTAT CCACAGTAGA  
1551 TCATTTTGTA AACGCAATTG AAGAGCGTGG ATTTCCGCCA ACGCCCGGTC  
1601 AGCCACCGGC GACTACTAAA CCAAGGAAA TTACCCCGT AAACCCCGGA  
1651 ACGTCACCAC TTCTACGATA TGCCGCATGG ACCGGAGGGC TTGCAGACAT  
1701 GTTTTGCACC TCACCGGCTA CGCGGGGCGA CTCGTCCGAG TCAAAACCCG  
1751 GGGCATCGGT TGATGTAAAC GGAAAGATGG AATATGGATC TGCACCAGGA  
1801 CCCCTGAACG GCCGGGATAC GTCGCGGGGC CCCGGCGCGT TTTGTACTCC  
1851 GGGTTGGGAG ATCCACCCGG CCAGGCTCGT TGAGGACATC AACCGTGTTT  
1901 TTTTATGTAT TGCACAGTCG TCGGGACGCG TCACGCGAGA TTCACGAAGA  
1951 TTGCGGCGCA TATGCCTCGA CTTTATCTA ATGGGTCGCA CCAGACAGCG  
2001 TCCCACGTTA GCGTGCTGGG AGGAATTGTT ACAGCTTCAA CCCACCCAGA  
2051 CGCAGTGCTT ACGCGCTACT TTAATGGAAG TGTCCCATCG ACCCCCTCGG  
2101 GGGGAAGACG GGTTCATTGA GGCGCCGAAT GTTCCTTTGC ATAGGAGCGC  
2151 ACTGGAATGT GACGTATCTG ATGATGGTGG TGAAGACGAT AGCGACGATG  
2201 ATGGGTCTAC GCCATCGGAT GTAATTGAAT TTCGGGATTC CGACGCGGAA  
2251 TCATCGGACG GGAAGACTT TATAGTGGA GAAGAATCAG AGGAGAGCAC  
2301 CGATTCTTGT GAACCAGACG GGGTACCCGG CGATTGTTAT CGAGACGGGG  
2351 ATGGGTGCAA CACCCCGTCC CCAAAGAGAC CCCAGCGTGC CATCGAGCGA  
2401 TACGCGGGTG CAGAAACCGC GGAATATACA GCCGCGAAAG CGCTACCGC  
2451 GTTGGGCGAG GGGGGTGTAG ATTGGAAGCG ACGTCGACAC GAAGCCCCGC  
2501 GCCGGCATGA TATACCGCCC CCCCATGGCG TGAGTTGAA TG

Secuencia de la proteína de fusión gE-ie63 codificada por  
PNIV4801 [SEC ID NO: 6]

1 MGTVNKPVVG VLMGFGIITG TLRITNPVRA SVLRYDDFHT DEDKLDTSNV  
51 YEPYYHSDHA ESSWVNRGES SRKAYDHNSP YTWPRNDYDG FLENAHEHHG  
101 VYNQGRGIDS GERLMQPTQM SAQEDLGDDT GIHVPTLNG DDRHKIVNVD  
151 QRQYGDVFKG DLNPKPQGQR LIEVSVEENH PFTLRAPIQR IYGVRYTETW  
201 SFLPSLTCTG DAAPAIQHIC LKHTTCFQDV VVDVDC AENT KEDQLAEISY  
251 RFQGKKEADQ PWIVVNTSTL FDELEDPPE IEPGVLKVL R TEKQYLGVI  
301 WNMRGSDGTS TYATFLVTWK GDEKTRNPT AVTPQPRGAE FHMWNYHSHV  
351 FSVGDTFSLA MHLQYKIHEA PFDLLEWLY VPIDPTCQPM RLYSTCLYHP  
401 NAPQCLSHMN SGCTFTSPHL AQRVASTVYQ NCEHADNYTA YCLGISHMEP  
451 SFGLILHDGG TTLKFVDTP E SLSGLYVFV YFNHVEAVA YTVVSTVDHF  
501 VNAIEERGFP PTAGQPPATT KPKEITPVNP GTSPLLR YAA WTGGLADMFC  
551 TSPATRGDSS ESKPGASVDV NGKMEYGSAP GPLNGRDTSR GPGAFCTPGW  
601 EIHPARLVED INRVFLCIAQ SSGRVTRDSR RLRRICLDFY LMGRTRQRPT  
651 LACWEELLQL QPTQTCLRA TLMEVSHRPP RGEDGFIEAP NVPLHRSAL E  
701 CDVSDDGGED DSDDDGSTPS DVIEFRSDA ESSDGEDFIV EESEESTDS  
751 CEPDGVPGDC YRDGDGCNTP SPKRPQRAIE RYAGAETA EY TAAKALTALG  
801 EGGVDWKRRR HEAPRRHDIP PPHGV\*



Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes

**REIVINDICACIONES**

5 1. Una proteína de fusión que comprende

(1) una proteína gE del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma fusionados a

10 (2) una proteína diferente del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma.

2. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende

15 (1) una proteína gE del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma fusionados a

20 (2) una proteína IE63 del Virus de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la misma.

3. ADN o ARN recombinante que codifica una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

25

4. Un vector de expresión o un microorganismo vivo recombinante que comprende ADN o ARN recombinante de acuerdo con la reivindicación 3.
- 5 5. Un hospedador transformado con un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o con un vector de acuerdo con la reivindicación 4.
- 10 6. Una composición de vacuna que comprende una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 15 7. Una composición de vacuna que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 20 8. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 para uso en medicina.
- 25 9. Un procedimiento para la producción de una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, que comprende expresar un ADN

recombinante que codifica dicha proteína en una célula hospedadora y recuperar la proteína.

5 10. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, para la fabricación de un medicamento para la prevención o mejoría de la varicela o del herpes zoster.

10 11. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, que comprende además otros antígenos de VZV.

15 12. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 11, en la que la proteína adicional del Virus de la Varicela Zoster se selecciona entre el grupo de gE, gB, gH, gI, gC o IE62 o un derivado inmunológicamente funcional de tales proteínas.

20 13. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 6, 7, 11 ó 12, que comprende además un adyuvante.

25 14. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 13 en la que el adyuvante induce preferentemente una respuesta TH1.

60

15. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el adyuvante se selecciona entre el grupo de adyuvantes que comprende: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, un oligonucleótido CpG, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y tocoferol, y una emulsión de agua en aceite o una combinación de dos o más de dichos adyuvantes.

16. Un procedimiento para tratar a un paciente que sufre o que es susceptible de infección o recurrencia del Virus de la Varicela Zoster, que comprende administrar a un paciente una cantidad segura y eficaz de una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 11, 12, 13, 14 ó 15.

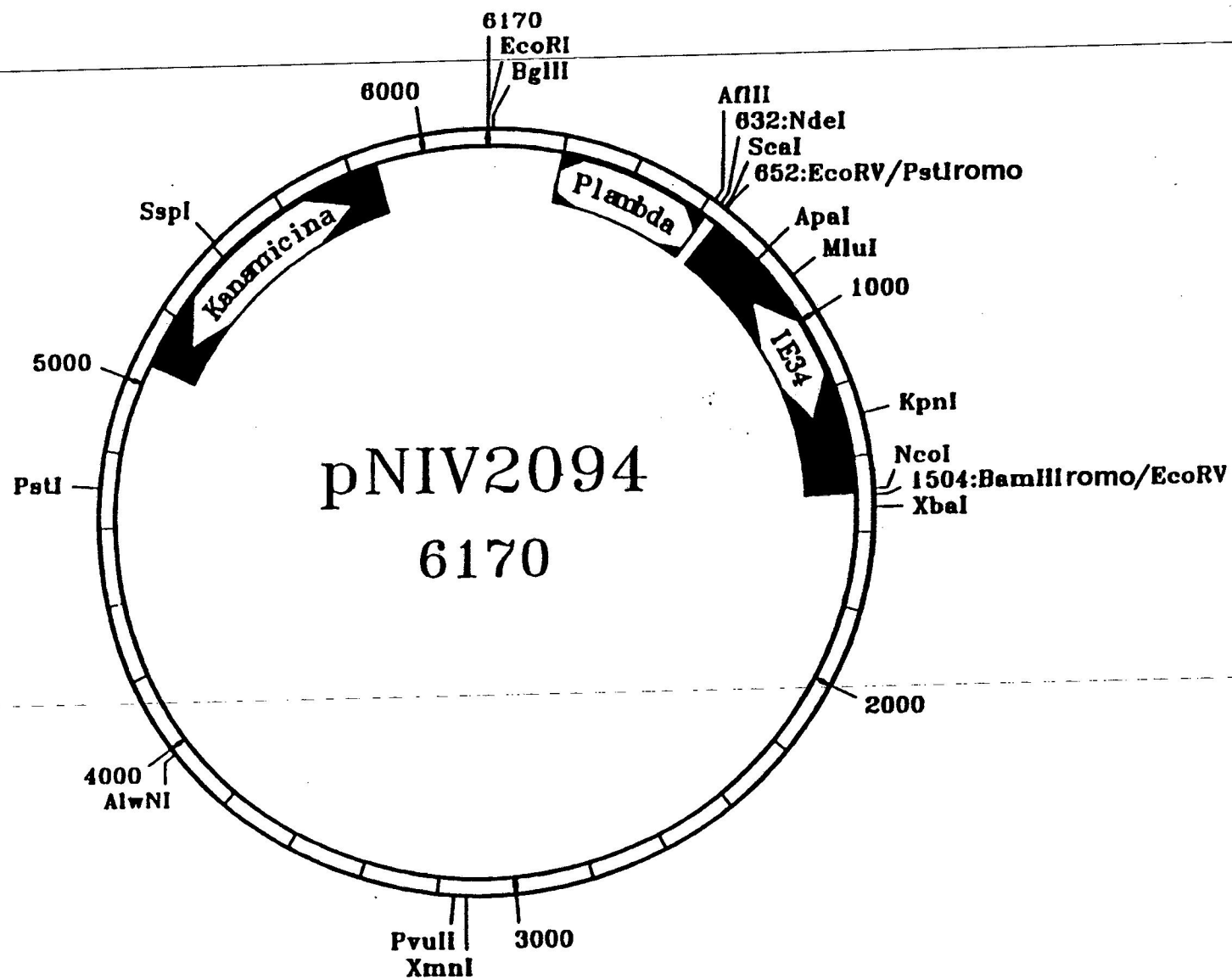
17. Un procedimiento de producción de una composición de vacuna de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 11 ó 12, que comprende mezclar dicha proteína de fusión o ácido nucleico con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el excipiente comprende un adyuvante de acuerdo con las reivindicaciones 13 - 15.

VACUNAS

## RESUMEN DE LA INVENCION

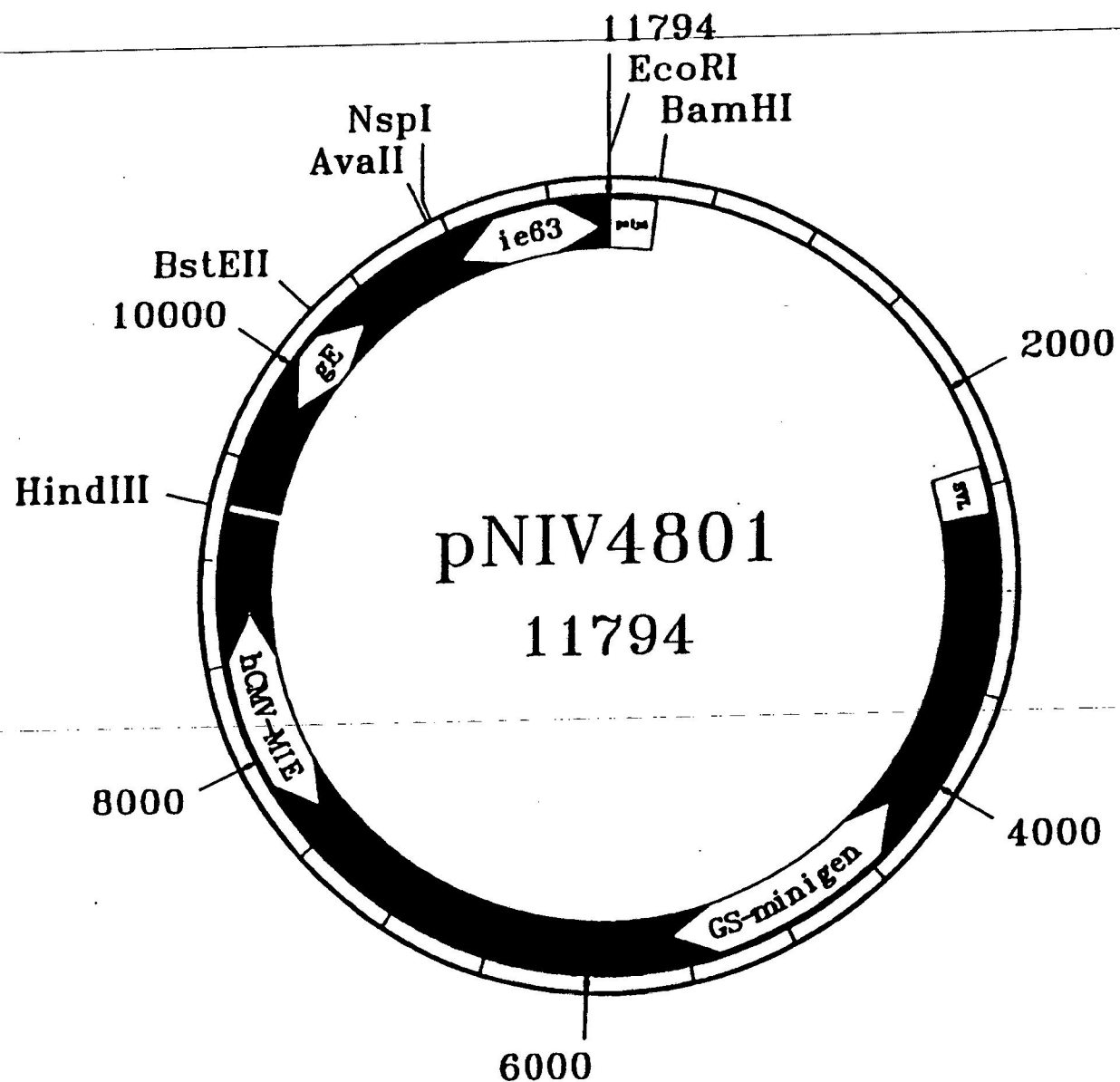
5        Esta invención se refiere a una nueva proteína de  
fusión que comprende (1) una proteína gE del Virus de la  
Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de  
la misma fusionados a (2) una proteína diferente del Virus  
de la Varicela Zoster o un fragmento inmunológicamente  
10    activo de la misma, y a composiciones de vacuna que  
comprenden la proteína de fusión.



1/12

Figura 1A

62



2/12

Figura 1B

63

3/12

IgG específica de ie63

1<sup>er</sup> experimento

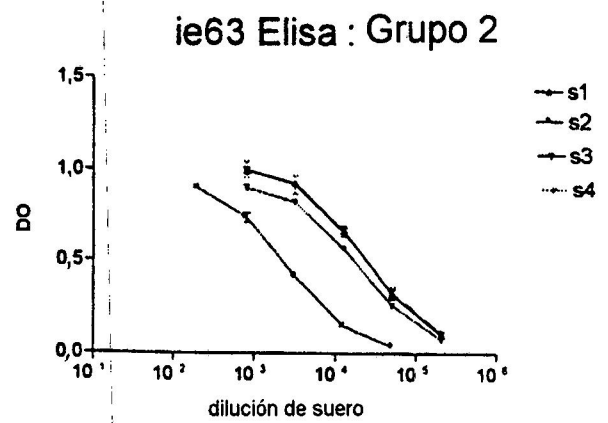
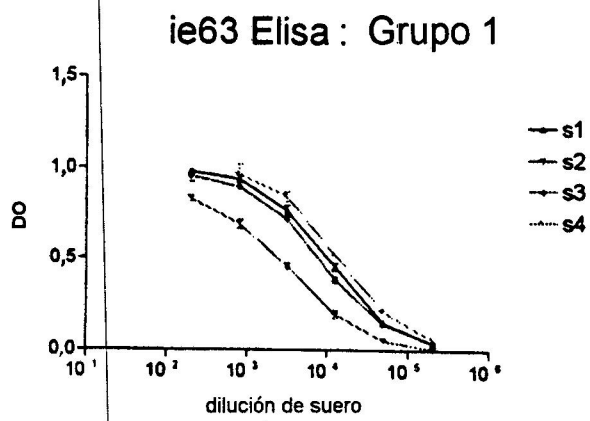


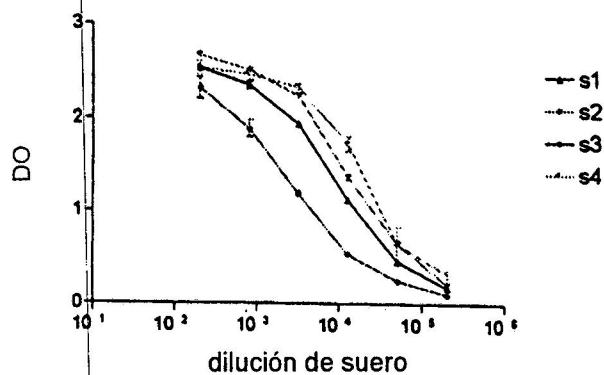
Figura 2



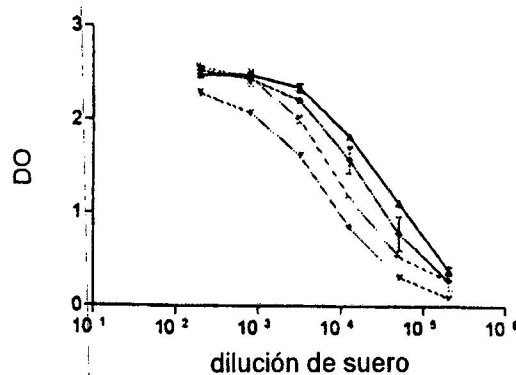
## IgG1 e IgG2a específicas de ie63

1<sup>er</sup> experimento

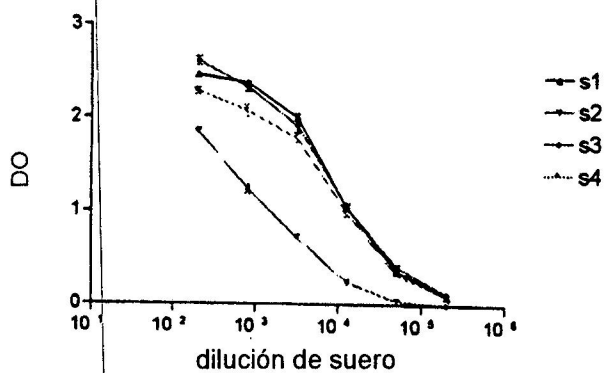
Elisa ie63 / IgG1 : Grupo 1



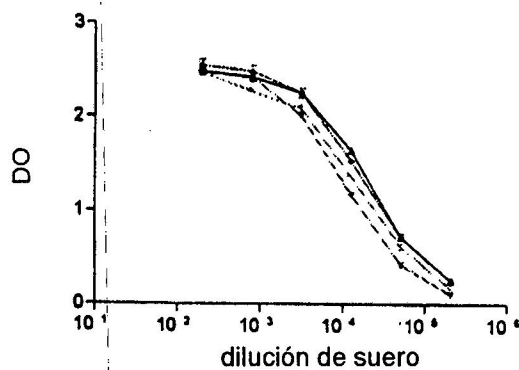
Elisa ie63 / IgG1 : Grupo 2



Elisa ie63 / IgG2a : Grupo 1



Elisa ie63 / IgG2a : Grupo 2



Valoración media Elisa

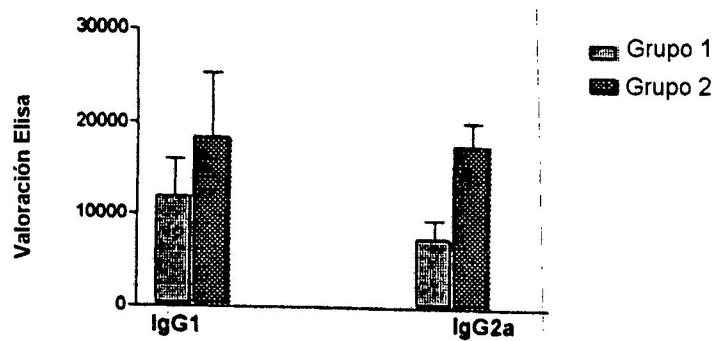
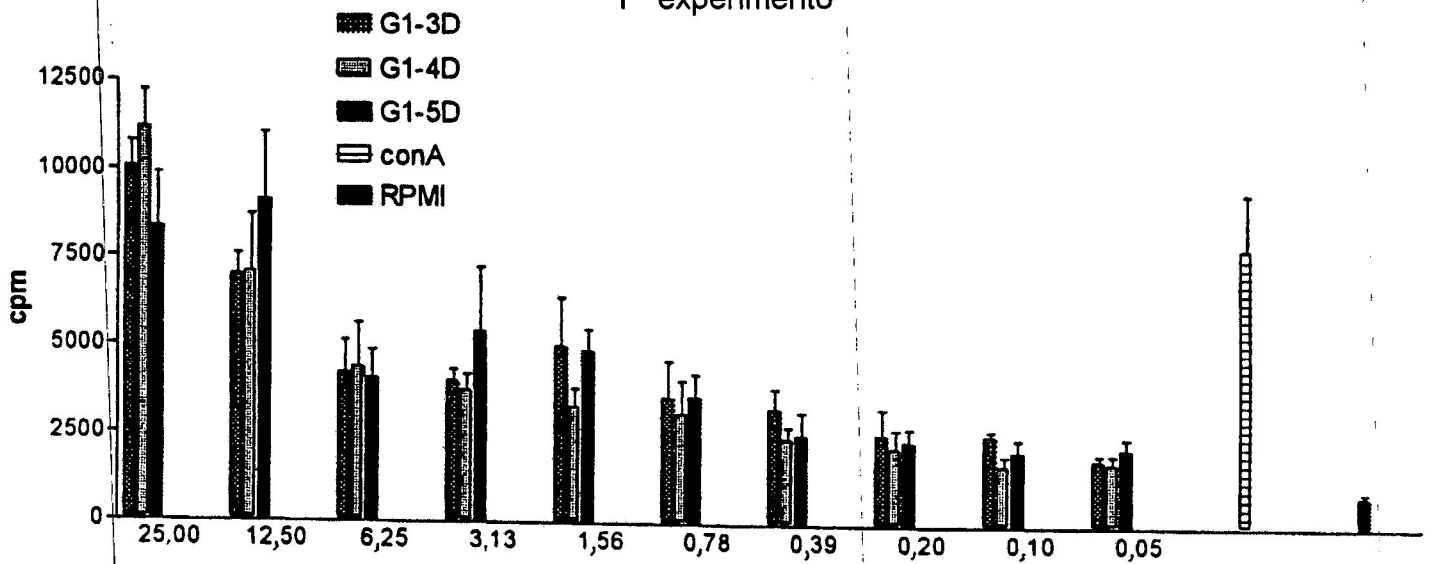


Figura 3

5/12

66

Proliferación de ie63 (bazo)  
1<sup>er</sup> experimento



Proliferación de ie63 (nodos linfáticos)  
1<sup>er</sup> experimento

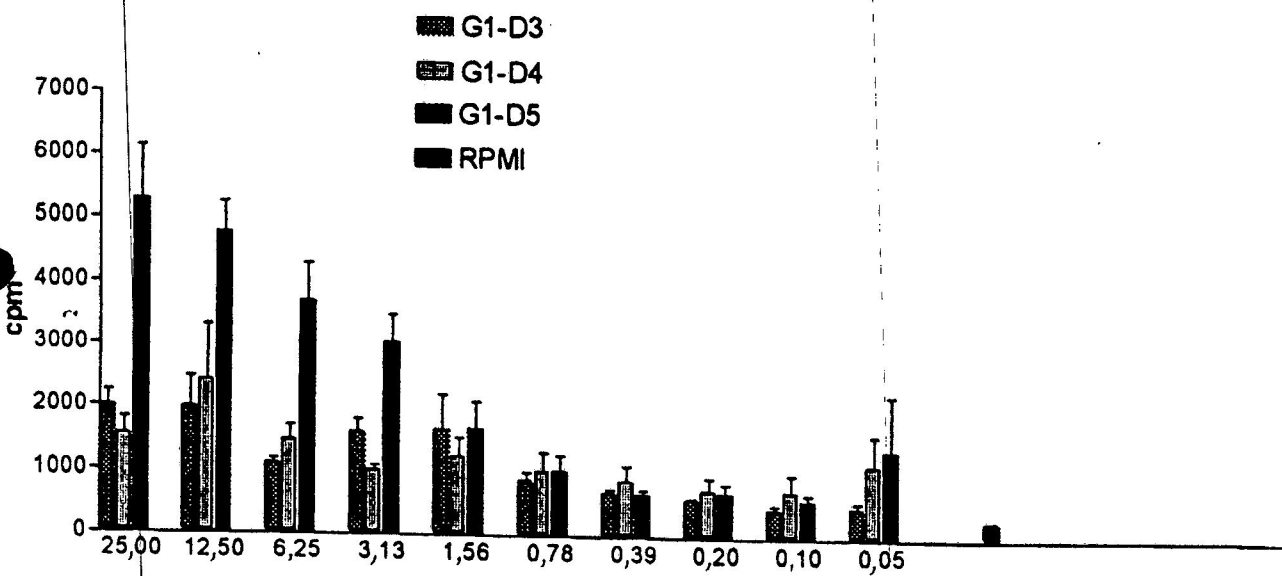


Figura 4

6/12

67

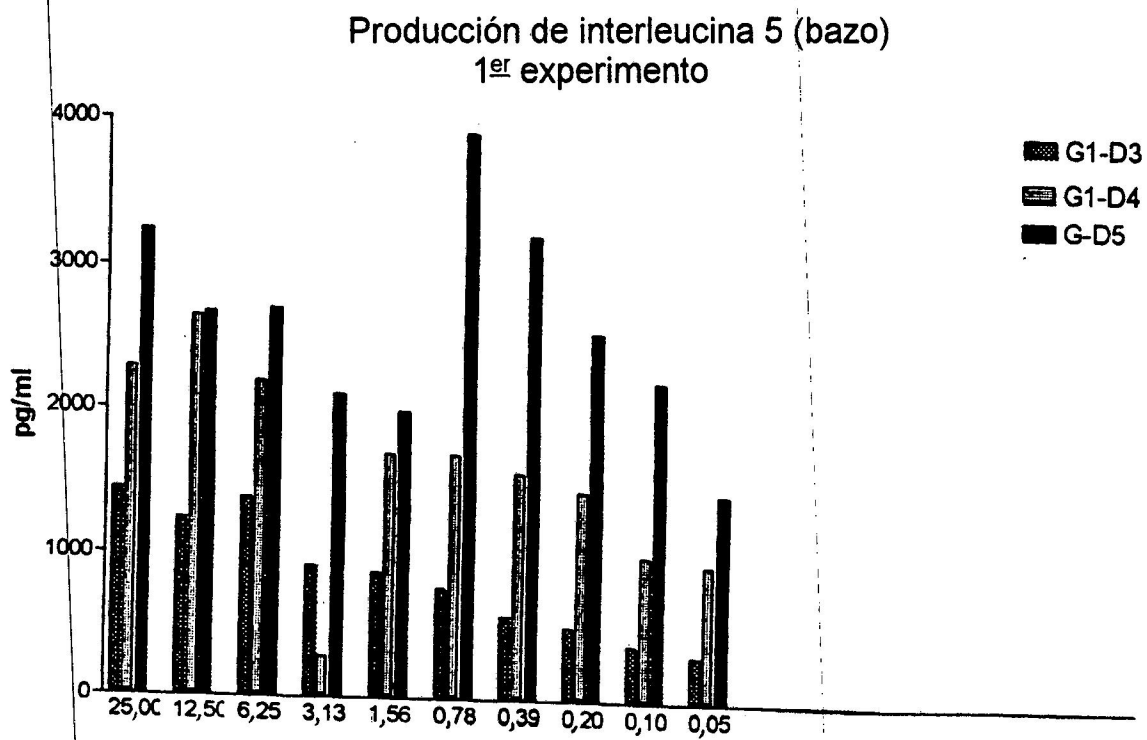
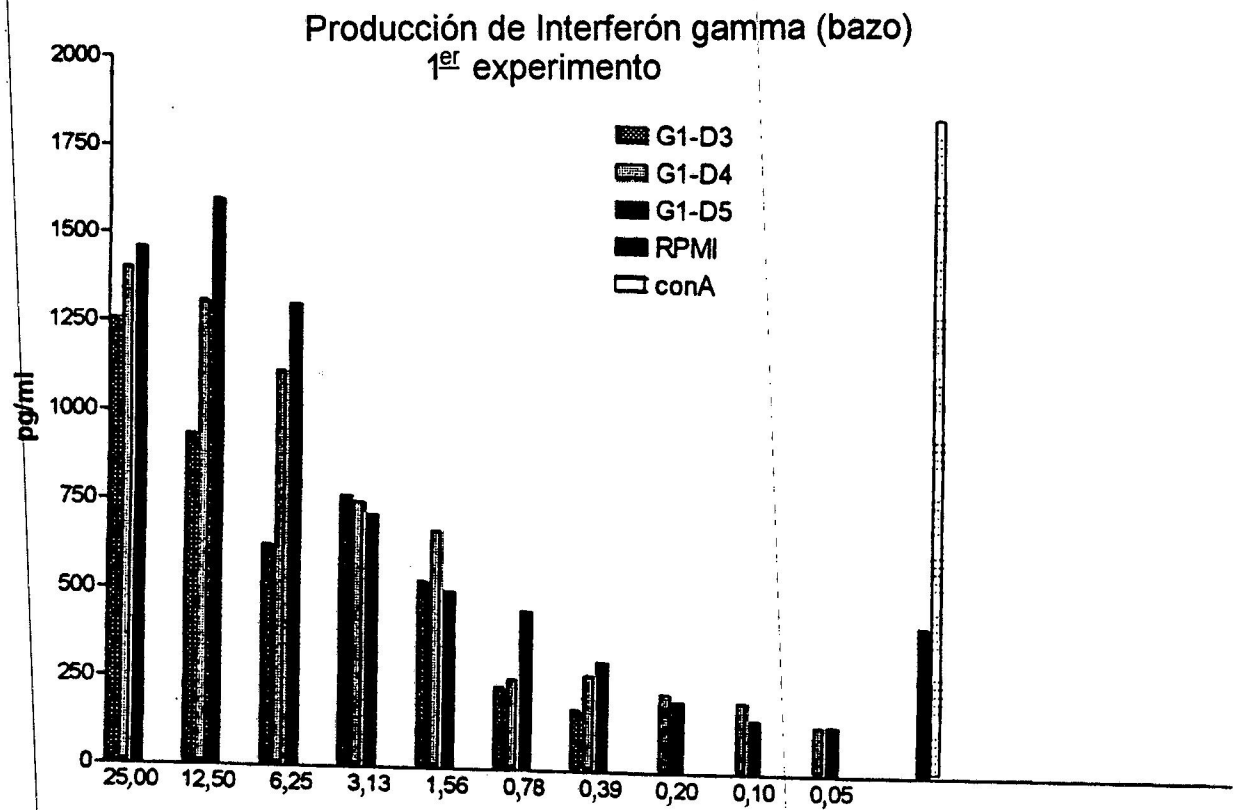


Figura 5

7/12

## IgG específica de gE, ie63 y gE-ie63

## 2º experimento

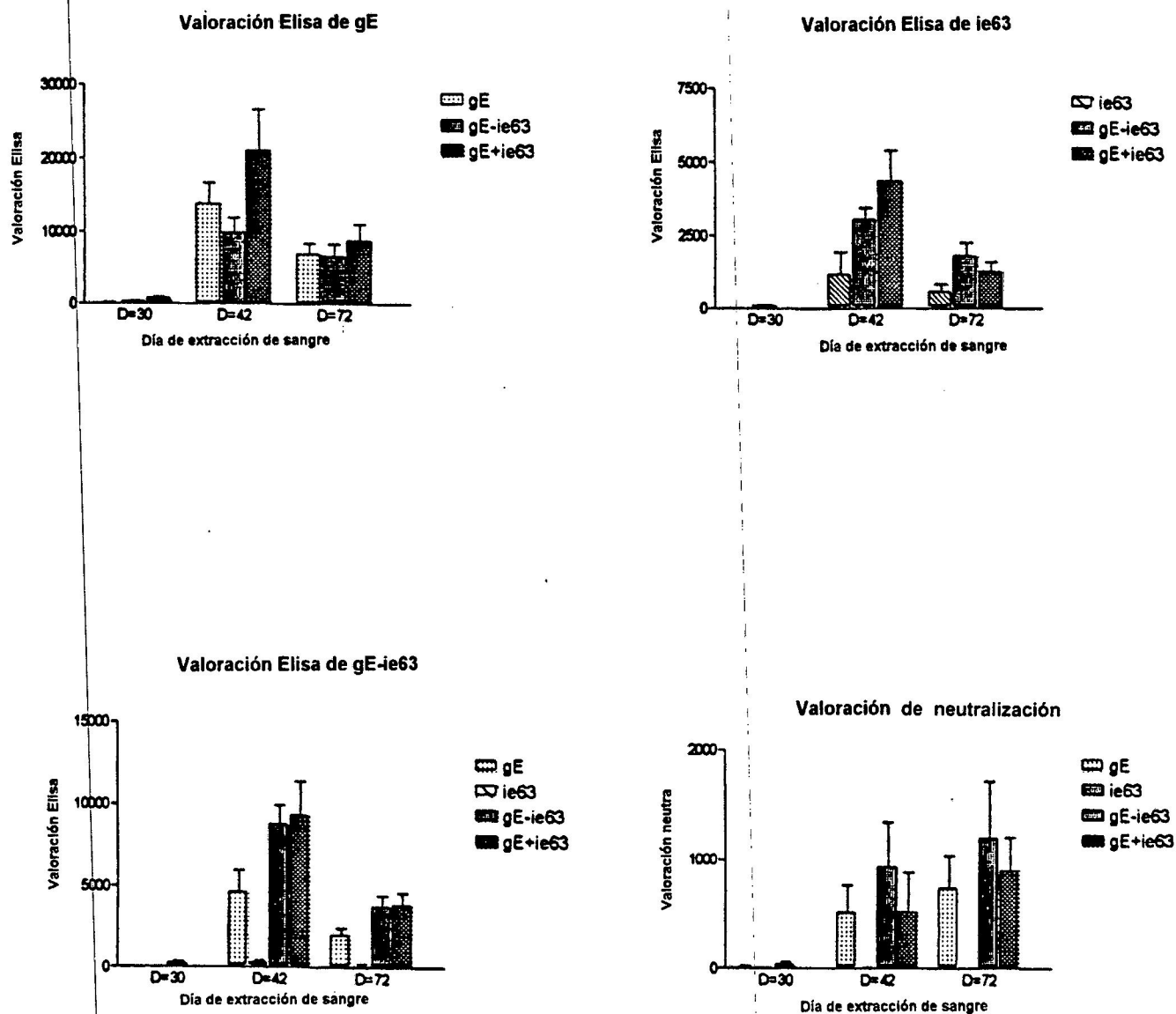


Figura 6

69

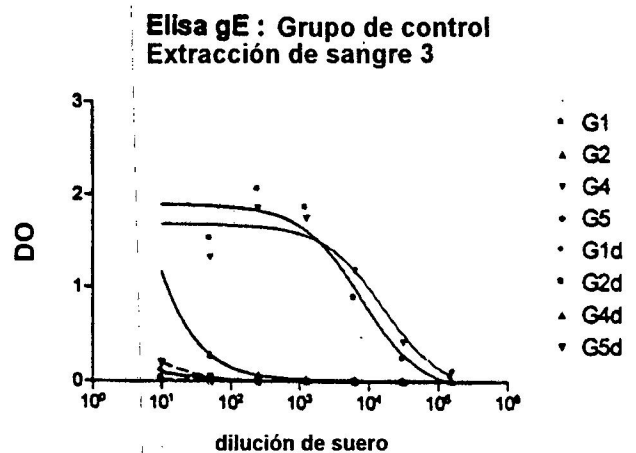
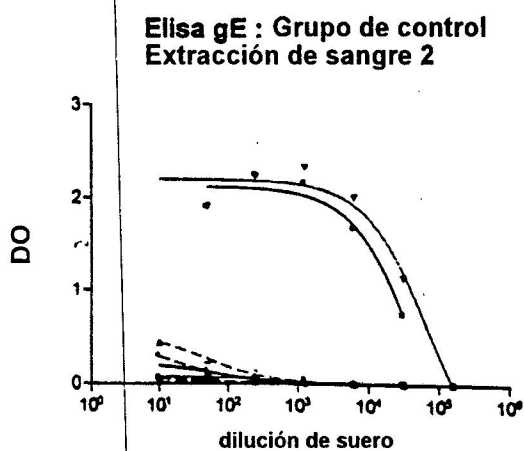
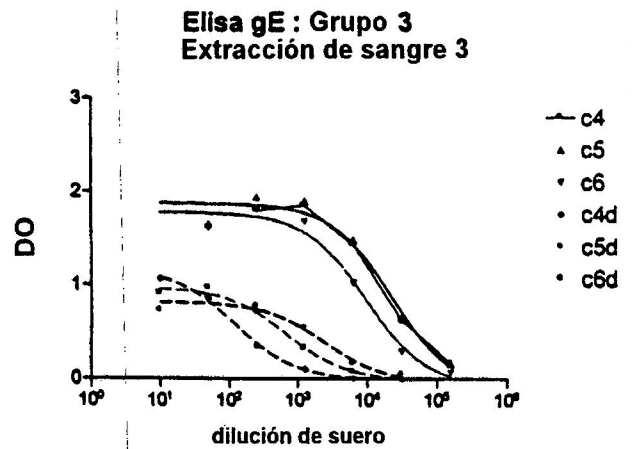
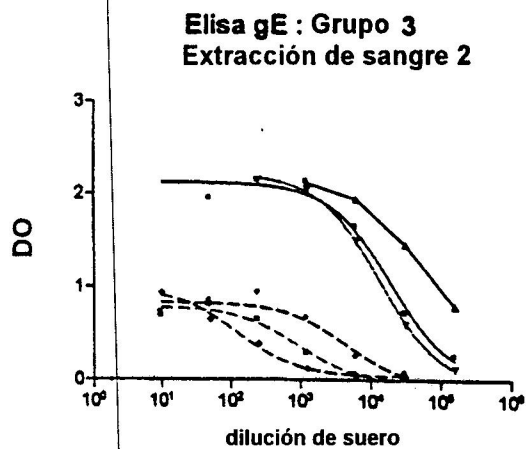
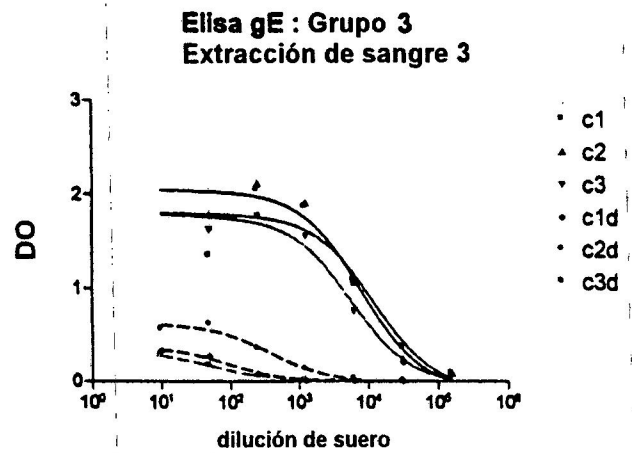
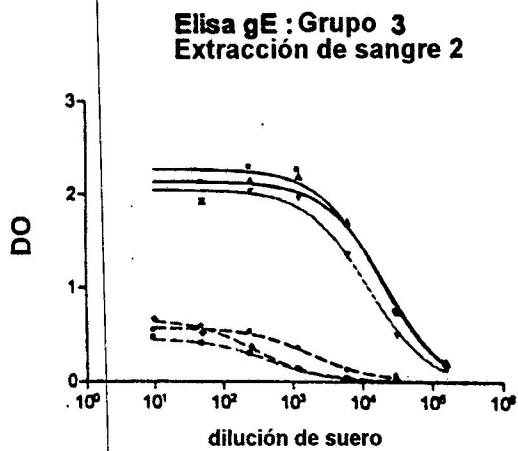
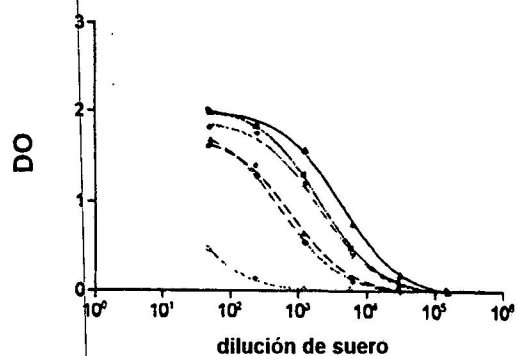
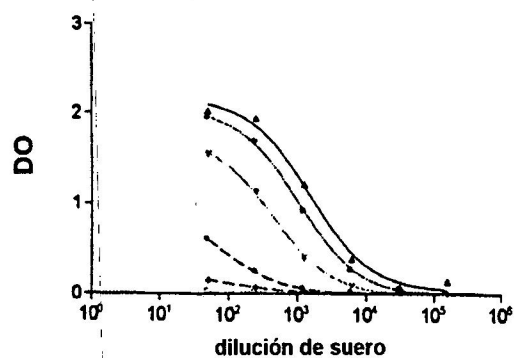


Figura 7

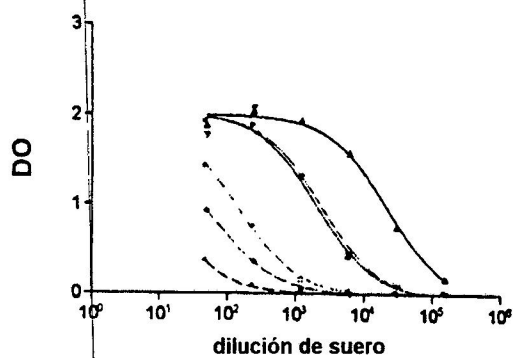
**Elisa ie63 : Grupo 3**  
**Extracción de sangre 2**



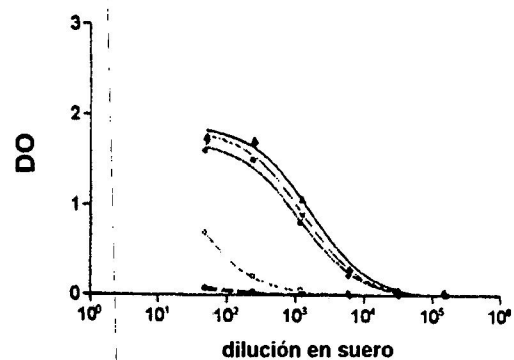
**Elisa ie63 : Grupo 3**  
**Extracción de sangre 3**



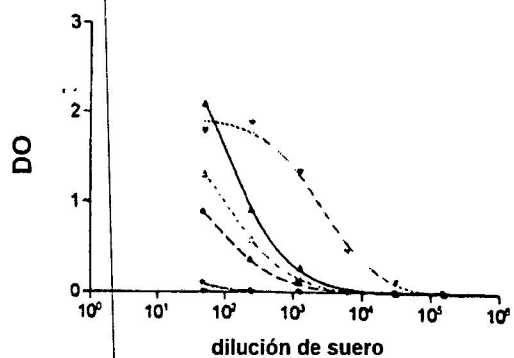
**Elisa ie63 : Grupo 3**  
**Extracción de sangre 2**



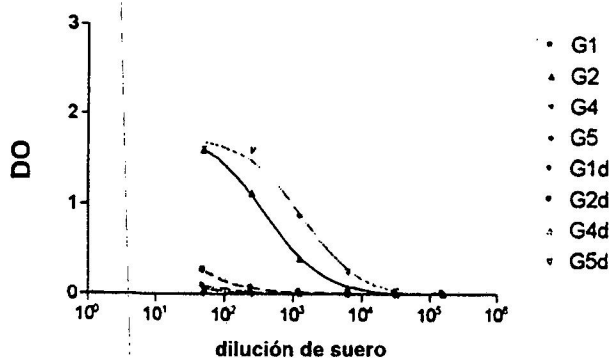
**Elisa ie63 : Grupo 3**  
**Extracción de sangre 3**



**Elisa ie63 : Grupo de control**  
**Extracción de sangre 2**



**Elisa ie63 : Grupo de control**  
**Extracción de sangre 3**



**Figura 8**

10/12

IgG1 e IgG2a específicas de gE, ie63 y gE-ie63  
3<sup>er</sup> experimento

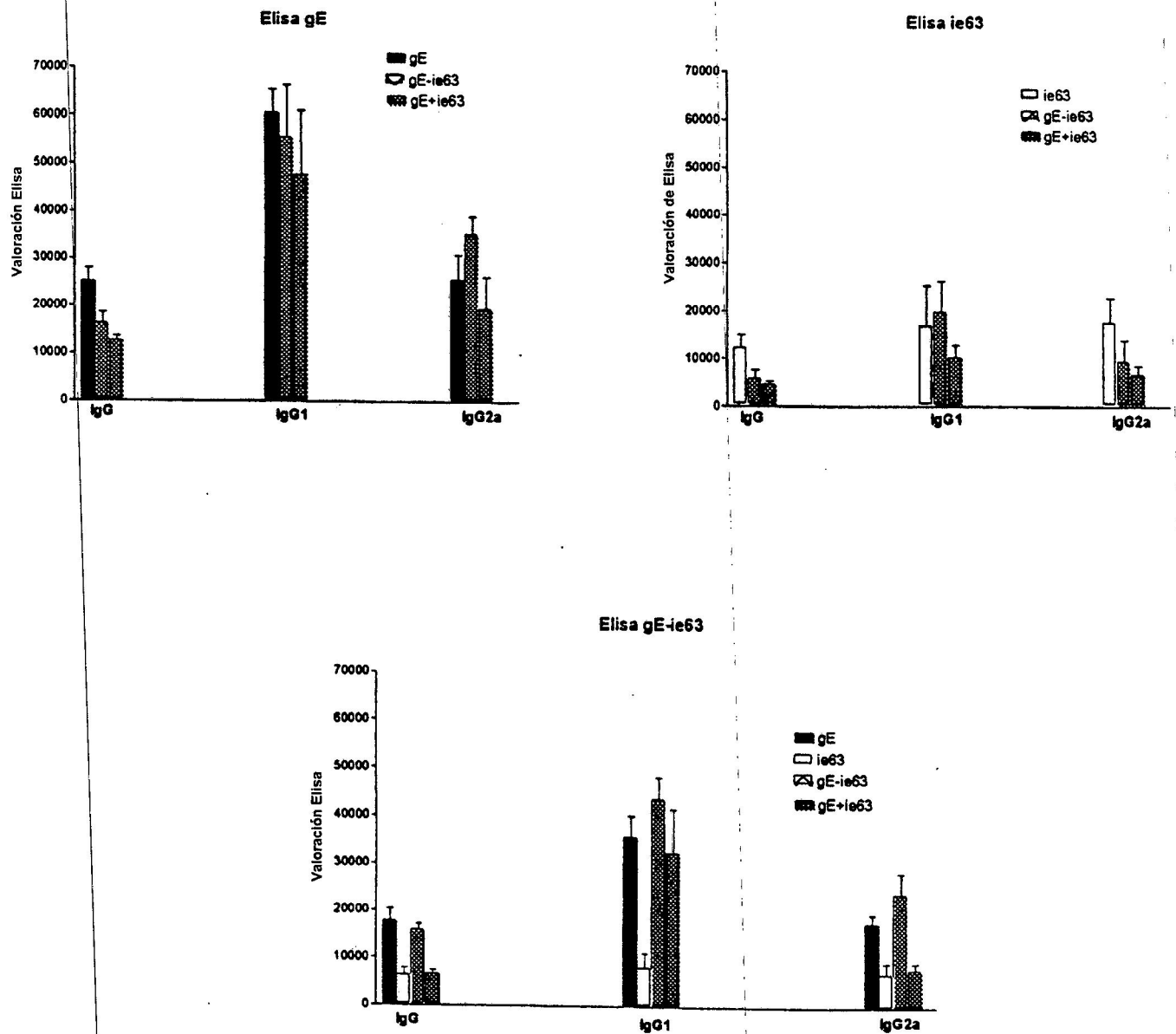


Figura 9

72

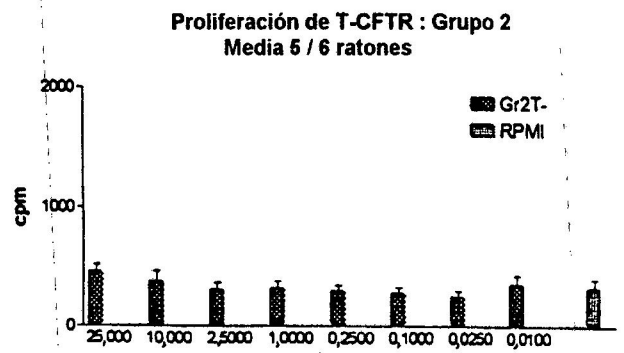
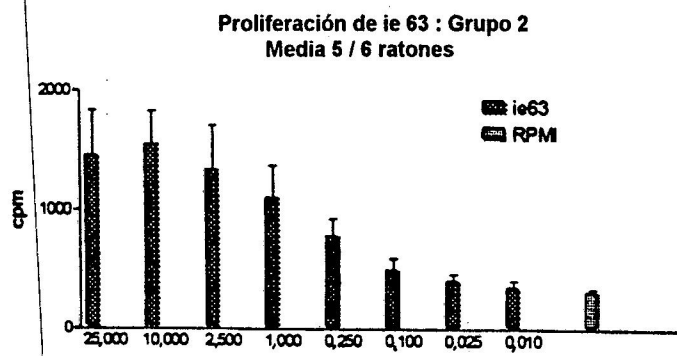


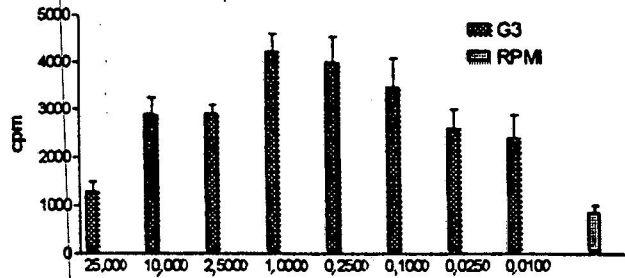
Figura 10



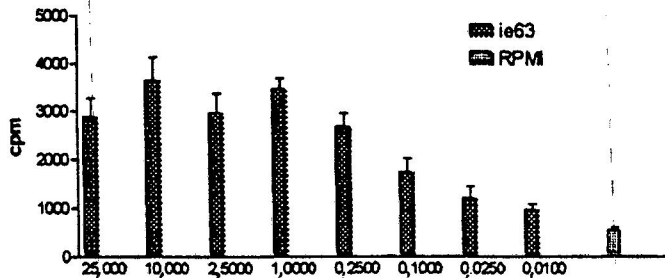
12/12

3

Proliferación de gE-ie63 : Grupo 3  
Media 4 / 5 ratones



Proliferación de ie63 : Grupo 3  
Media 5 / 6 ratones



Proliferación de T-CHO : Grupo 3  
Media 5 / 6 ratones

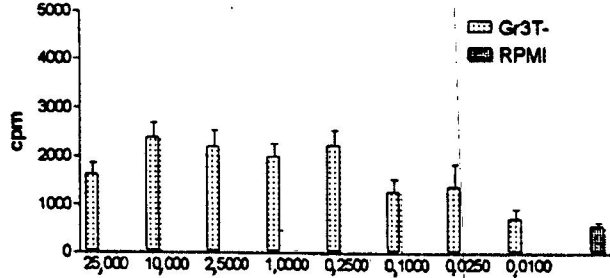
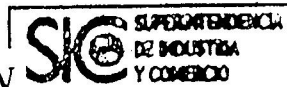


Figura 11

74 76

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN**  
**SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION**



DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

(21) No. SOLICITUD:

(51) INT. CL.:

(22) FECHA DE  
PRESENTACIÓN:

(71) SOLICITANTE:

SMITHKLINE BEECHMAN BIOLOGICALS s.a.

(30) PRIORIDAD:

(31) No. DE SOLICITUD: 9901254.4

(72) INVENTORES:

Profesor Alex Bollen, Michelle Haumont, Paul Jacobs

(32) FECHA DE  
PRESENTACIÓN:

Enero 20, 1999

Dr. Alain Jacquet, Marc Georges Francis Massaer

(33) PAÍS:

Gran Bretaña (74) APODERADO:

GERMAN CASTILLO GRAU

(54) TÍTULO: V A C U N A S

**(57) RESUMEN:**

1. Una proteína de fusión que comprende

(1) una proteína gE del Virus de la Varicela Zoster  
o un fragmento inmunológicamente activo de la misma  
fusionados a

(2) una proteína diferente del Virus de la Varicela  
Zoster o un fragmento inmunológicamente activo de la  
misma.

9. Un procedimiento para la producción de una proteína  
de fusión de acuerdo con la reivindicación 1 o la  
reivindicación 2, que comprende expresar un ADN  
recombinante que codifica dicha proteína en una célula  
hospedadora y recuperar la proteína.

75

# REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN/TRÁMITE

Patente de Invención ☒

Modelo de Utilidad ☐

- ☒ Nombre e identificación del solicitante
- ☒ Nombre e identificación del inventor
- ☒ Título o nombre de la invención
- ☒ Descripción
- ☒ Reivindicaciones
- ☒ Resumen
- ☐ Comprobante de pago

- ☐
- ☐
- ☐
- ☐
- ☐
- ☐
- ☐

COMPLETA ☒

INCOMPLETA

Diseño Industrial ☐

- ☐ Nombre e identificación del solicitante
- ☐ Nombre e identificación del inventor o diseñador
- ☒ Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse
- ☐ Representación gráfica
- ☐ Comprobante de pago

COMPLETA

INCOMPLETA

  
FIRMA RESPONSABLE.

Fecha \_\_\_\_\_

## INFORME DE PROTOCOLO

Expediente 0-2923.

Fecha: 21 de enero del 2000.

Se certifica que:

Desde fecha 12 de julio de 1996,  
del folio 86.459 al folio 86.464 del  
libro de Protocolo N° 298, obra el poder  
N° 16.769 conferido por SMITHKLINE  
BEECHAMAN BIOLOGICALS S.A.

domiciliado(a) en Rixensart - Bélgica

al doctor GERMAN CASTILLO GRAU y/o ADRIANA  
CASTILLO GIBSONE y/o LUIS FELIPE CASTILLO  
GIBSONE.

Representante en Santafé de Bogotá D.C. Los  
mismos.

Facultad para desistir SI.

Revisado \_\_\_\_\_.



**DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**  
**PRIMER EXAMEN DE FORMA**

430  
SIN FECHA

**EXPEDIENTE 0-2923**

Practicado el examen jurídico de acuerdo con lo establecido en el art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- |                                        |                                        |                                                                                                                                                                                                                    |
|----------------------------------------|----------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SI <input checked="" type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/>            | NO APLICABLE <input type="checkbox"/> Presentó los poderes necesarios en forma correcta (Decisión 344, art. 14-a).                                                                                                 |
| SI <input checked="" type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/>            | NO APLICABLE <input type="checkbox"/> Acreditó, en forma correcta, la existencia y representación de la persona jurídica solicitante (art. 14-c de la Decisión 344; literal g) del art. 4 del Decreto 117/94).     |
| SI <input checked="" type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/>            | NO APLICABLE <input type="checkbox"/> Presentó, en forma correcta el comprobante de pago por la tasa de presentación establecida (art. 13-f de la Decisión 344 y la Resolución 02 del 4 de enero del 2000 ).       |
| SI <input checked="" type="checkbox"/> | NO <input type="checkbox"/>            | EXTEMPORANEAMENTE <input type="checkbox"/> Reivindicó prioridad, dentro del plazo y de acuerdo con lo previsto en el Artículo 4 del Convenio de París.                                                             |
| SI <input type="checkbox"/>            | NO <input checked="" type="checkbox"/> | NO APLICABLE <input type="checkbox"/> Presentó copia, certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, al momento de radicar la solicitud nacional.      |
| SI <input type="checkbox"/>            | NO <input checked="" type="checkbox"/> | NO APLICABLE <input type="checkbox"/> Presentó la traducción del capítulo reivindicatorio de la solicitud de la cual se reivindica prioridad (Art. 4, D-3 Convenio de París; Concepto: 5 de enero de 1999 S.I.C.). |
| SI <input type="checkbox"/>            | NO <input checked="" type="checkbox"/> | CUMPLE LOS REQUISITOS JURIDICOS                                                                                                                                                                                    |

**OBSERVACIONES JURIDICAS CONVENIO DE PARIS:** En todo caso, deberá presentar copia certificada su conformidad por la Administración que recibió la solicitud de la cual reivindica prioridad, **en cualquier momento dentro del plazo de tres (3) meses**, contados a partir de la fecha de depósito de la solicitud posterior. La omisión de esta formalidad implicará la pérdida del derecho de prioridad.

En consecuencia, se conceptúa que esta solicitud:

- |                             |                                        |                                                                                    |
|-----------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| SI <input type="checkbox"/> | NO <input checked="" type="checkbox"/> | Se ajusta a los aspectos <b>FORMALES</b> indicados en la Decisión 344 y por tanto, |
| SI <input type="checkbox"/> | NO <input checked="" type="checkbox"/> | Se recomienda <b>PUBLICAR</b> el extracto correspondiente.                         |

Santafé de Bogotá, D.C., 21 de enero del 2000

**EXAMINADOR JURIDICO: Código 202002**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
Jel EXAMEN DE FORMA

Folio 80

78

430  
2000-02-17

Radicación no 00002923.

Concepto Técnico no 237 Clasificación Internacional de Patentes C07K 19/00, A61K 39/25  
C12N 15/62.

Practicado el examen de acuerdo a lo establecido en el Art. 21 de la Decisión 344 se determinó que esta solicitud de **Patente de Invención**:

- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del inventor (Art.8, Art.13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la identificación correcta del solicitante (Artículo 13-a).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el resumen con el objeto y finalidad de la invención en forma correcta (Art.13-e).
- SI ☐ NO ☒ Contiene el título o nombre de la invención en forma correcta (Art.13-b).
- SI ☐ NO ☒ Contiene la descripción clara y completa de la invención (Art.13-c).
- SI ☒ NO ☐ Contiene los dibujos correctos (Art.14-c junto con el literal d) del Art. 4 del Dto. 117 del 94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene las unidades de medida en el sistema exigido (Art.14-c junto con el Decreto 3464 del 26 de diciembre de 1980).
- SI ☒ NO ☐ Contiene una o más reivindicaciones, en forma correcta, que precisen la materia para la cual se solicita la protección mediante la patente (Art.13-d).
- SI ☒ NO ☐ Contiene el extracto de acuerdo con el literal c) del artículo 4 del Dto. 117 /94.
- SI ☐ NO ☐ Contiene el arte final del dibujo característico de acuerdo con el literal c) del artículo 4 y el artículo 27 del Dto. 117 /94.
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo Temático [formato P-104] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☒ NO ☐ Contiene la tarjeta del Archivo de Propietarios [formato P-105] en forma correcta (Art.14-c junto con el literal b) del artículo 4 del Dto. 117 /94).
- SI ☐ NO ☒ **CUMPLE LOS REQUISITOS TÉCNICOS**

OBSERVACIONES Y OTROS: SI ☒ NO ☐ ver hoja(s) anexa(s)

Santa Fe de Bogotá, D.C., 17 de febrero /00.

202016

EXAMINADOR TÉCNICO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES  
PRIMER EXAMEN DE FORMA

81 79

CONCEPTO TÉCNICO: 237  
EXPEDIENTE: 00002923  
IPC: C07K 19/00, A61K 39/25, C12N 15/62

Realizado el Primer Examen de Forma se hace la siguiente observación:

1. El título de la invención es muy general, pues "vacunas" no permite establecer sobre que tipo de vacunas versa la invención. Por tanto, se recomienda que se modifique el título de manera que corresponda con las reivindicaciones de la solicitud, una posibilidad es que dicho título sea "Proteínas de fusión del virus Varicela Zoster" o "Vacunas que comprenden proteínas de fusión del virus Varicela Zoster".
2. En el folio 45 se encuentra la SEQ ID No 4, pero en ningún folio se definen las secuencias 1 a 3. Sírvase presentarlas pues sin ellas no se encuentra completo el expediente.
3. En consecuencia a lo anterior, sírvase presentar nueva tarjeta temática, nueva tarjeta para el archivo de propietarios y nuevo extracto de publicación con el nuevo título.

|                                       |                                                                                                                        |                  |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| EXAMINADOR TÉCNICO<br>Código # 202016 | <br>JEFE DIVISIÓN NUEVAS CREACIONES | FECHA 2000-02-17 |
|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|

EXPEDIENTE 0-2923

AUTO 0115

430  
2000-02-24

**LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES**

**DISPONE**

**ARTICULO PRIMERO:** Reconocer personería al doctor German Castillo Grau, como apoderado del solicitante, en los términos y para los efectos del poder conferido

**ARTICULO SEGUNDO:** Conforme lo establece el artículo 22 de la Decisión 344 de la Comisión del Acuerdo de Cartagena, requiérese al solicitante, para que dentro del plazo de treinta (30) días hábiles siguientes a la fecha de notificación del auto, presente respuesta a las observaciones o complemente los antecedentes señalados en el examen de forma.

**ARTICULO TERCERO:** Notificar por estado el presente auto, advirtiéndole que contra el no procede recurso alguno en la vía gubernativa.

**NOTIFIQUESE Y CUMPLASE**

22 FEB. 2000

Dado en Santafé de Bogotá D.C., a los \_\_\_\_\_

**LA JEFE DE LA DIVISION DE NUEVAS CREACIONES,**

  
**ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL**

**NOTIFICADO POR ESTADO**

Santafé de Bogotá D.C., 24 FEB 2000, notificado por anotación en estado de esta misma fecha.

**VENCIMIENTO NOTIFICACION ESTADO**

**SOLICITO PRORROGA TERMINO SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_**

**VENCIMIENTO TERMINO PRORROGA**