

8



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

EXPEDIENTE N° **04-122511**

TITULO COMPOSICIONES INMUNOGENICAS

CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 14/315

71 SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S A Y GLAXO GROUP LIMITED

DOMICILIO RIXENSART BELGICA Y MIDDLESEX INGLATERRA

74 REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE

22 BOGOTA D C 6 Dic 2004 T P 53 215

25

PETITORIO



SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 84122511 00000000

Folios: 241

Fecha (HNB): 2004-12-06 16:37:43

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2828 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención☐ Patente de Modelo de Utilidad☐ Capítulo I.☒ Capítulo II.

②

SOLICITANTE
(71)Nombre: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
S.A Y GLAXO GROUP LIMITEDDirección: Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica y Glaxo Wellcome
House, Berkeley Avenue, Greenford,
Middlesex UB8 0NN, Inglaterra.Nacionalidad o Domicilio: Rixensart,
Bélgica y Middlesex, Inglaterra.Lugar de Constitución: Bélgica e
Inglaterra.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: ALICIA LLOREDA RICAURTE

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jlcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)Nombre: CABEZON, Silva, Teresa, Elisa, Virginia; ELLIS, Jonathan, H.;
GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine; Hamblin, Paul, A.; PALMANTIER, Remi,
M. y VINALS Y DE BASSOLS, Carlota.Dirección: GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330
Rixensart, Bélgica y GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage,
Hertfordshire SG1 2NY, Gran Bretaña.

Nacionalidad o Domicilio: Bélgica y Gran Bretaña.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP03/06096Fecha: 06/06/03Publicación Internacional No. WO 03/104272 A1Fecha: 18/12/03

⑥

Título (54)

"COMPOSICIONES INMUNOGENICAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) C07K 14/315

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

GB

(32) Fecha

11.08.02

15.01.03

(31) Número de Solicitud

0213365.0

0300914.9

⑨

Comprobante de Pago No. 04 - 92.880Fecha: 01-12-04

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documentos que acreditan la existencia y representación legal cuando los solicitantes sean personas jurídicas.
- ☒ Documentos de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Copia del examen preliminar Internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☒ Traducción del examen preliminar Internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y listado de secuencias.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713

T.P. 53.215

2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 04122511 00000000 Folios: 241
Fecha (AMD): 2004-12-06 16:37:43
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INCI 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE MARCAS CREDITO

RIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 04 - 92,680
FECHA : DICIEMBRE 1 DE 2004

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORED A Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	28713600	01/12/2004	7,107,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	422,000.00
		TOTAL :	422,000.00

SON: CUATROCIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

ANEXO

Los documentos que acreditan la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de las sociedades peticionarias, que facultan a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se están presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Código 231

Yo, el infrascrito, **JAMES KERR MILLIGAN**, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

C E R T I F I C O:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON**, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada **"GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A."** (anteriormente denominada **"Smithkline Beecham Biologicals s.a."**), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don **MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON** está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

NOTARIO SEÑTO DEL C. CULO
DE BOGOTA, HAZO SUISE
NOTARIO SEÑTO DEL C. CULO
CUL HA TENIDO A LA VISTA
13 SET 2004
JUAN MANUEL BOYERO MEDINA
NOTARIO

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

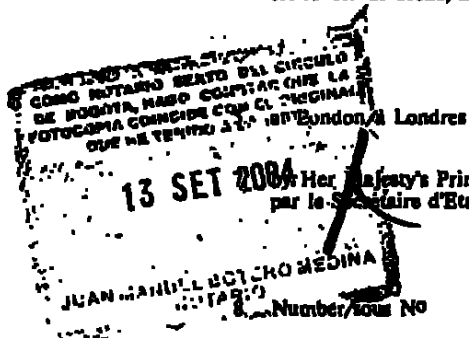
1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by James Keef Milligan
a été signé par
3. acting in the capacity of Notary Public
agissant en qualité de
4. bears the seal/stamp of Notar, Public
est revêtu du sceau/timbre de

Certified/Attesté

6. the/le 6th Oct 1984



9. Stamp
timbre



10. Signature WGLASS

WGLASS
For the Secretary of State/Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAX SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

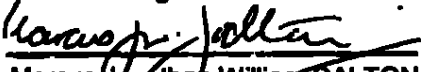
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de Bélgica, domiciliada en la ciudad de Rixensart, Bélgica, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder, que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad. El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en , con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

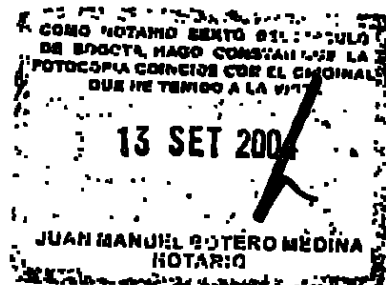
Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the of GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A., the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the Belgium, domiciled at the City of Rixensart, Belgium, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of , that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company. The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of , and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



X

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

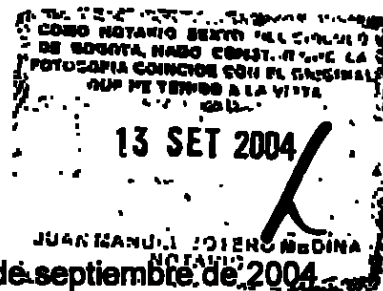
(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: G 749037
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)



TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

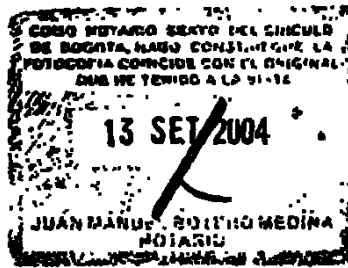
MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

260567
Anita Esobal
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

260567

JCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.



Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

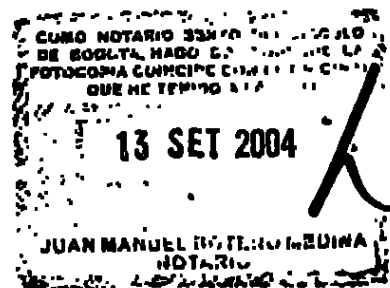
W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es auténtica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



Yo, el infrascrito, Martin Emil BUCHNER, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don Peter John GIDDINGS, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad inglesa denominada "GLAXO GROUP LIMITED", Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Inglaterra, e inscrita en la Oficina de Registro de Sociedades bajo el número 305979, con domicilio social en Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 ONN, Inglaterra;

QUE el citado Señor Don Peter John GIDDINGS está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 30 de enero de 2003, una copia del cual he tenido a la vista;

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE donde y como convenga y fuera necesario expido el presente Certificado que firmo y sello en dicha Ciudad de Londres, el día de hoy veintiseis de agosto del año dos mil cuatro.

07 SET 2004

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)


Martin Emil BUCHNER
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE
(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

2. The said document is a public document
Le dit document est un acte public
Martin E Buchner

3. Acting in the capacity of Notary Public
Agissant en qualité de Notary Public

4. Bears the seal/stamp of The Said Notary Public
Porte le sceau/stamp de

Certified/Attesté
6. the/le 26 August 2004

5. at London/à Londres

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G499865

9. Stamp:
timbre:

10. Signature: M. Monaghan



For the Secretary of State Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

TA
AL
des
repr
adm
trám
affect.
on
vica
recurs
descrip
solicitu
instaura
parci-in
impu: st
determin.
y valore:
cualesqui
las medid
de nuestr
oposición,
quedan fat
demandante
sean comp
árbitros, des
demás facult
presente dec
cuanto dichos
cualquiera
beneficio.

Asimismo
LLOREDA y/o
SANTAMARIA
solicitar en la
protocolización c
poder que cualq
nuestro.

Dado y firmado

Los abajo firmados, **GLAXO GROUP LIMITED**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Inglaterra y Gales..

con domicilio en **Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Inglaterra**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales, o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percluir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

10
The undersigned, **GLAXO GROUP LIMITED**, a corporation organized and existing under the laws of England and Wales.

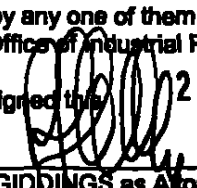
domiciled at **Glaxo Wellcome House
Berkeley Avenue
Greenford Middlesex UB6 0NN
Great Britain**

heraby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this **23 AUG 2004**


Peter John GIDDINGS as Attorney and
Authorised Officer
NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-02-440
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, Documento escrito en inglés y en español.

Notarización del documento es español.

Hay un sello rojo sobre una cinta verde.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

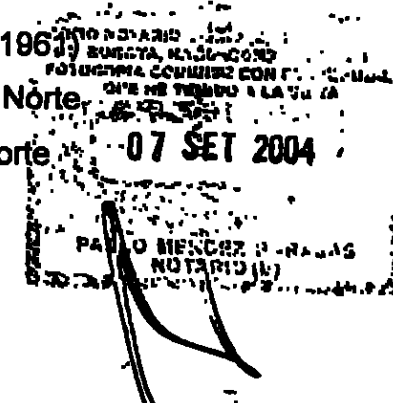
1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

Este documento público

2. ha sido firmado por Martin E Buchner
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Público

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 26 de agosto de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número G499865
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (ilegible)
M. Monaghan



TRADUCCION OFICIAL
RESOLUCION 3177

UNITA ESCOBAR DE TAMAYO

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

258650

Andrés Escobar

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 SET 5 3 12 P 12 12

EFECTUACIÓN DE
LEGALIZACIONES
PÚBLICA U.C.

SET 2004

PABLO JIMENEZ
NOTARIO

Exteriores, y del Commonwealth

Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse en la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido a mi mejor saber y entender, este día 2 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

COLOMBIA
DE BOGOTÁ, D.C. 07 SET 2004
FOTOCOPIA CONFECCIONADA POR
QUILINTO 11000000
07 SET 2004
PAULO MENDOZA
NOTARIO

13 **REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/06096

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 C07K14/315 A61K39/385 C12N5/10 C12N15/62 C12N15/63
A61K38/16

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

Dato WPI, PAJ, MEDLINE, BUSQUEDA DE SECUENCIAS, BIOSIS, EPO-Interno, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	SANCHEZ-PUELLES J M ET AL: "INMOBILIZACION Y PURIFICACION DE ETAPA SENCILLA DE PROTEINAS DE FUSION USANDO DEAE-CELULOSA" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 203, No. 1-2, 1992, páginas 153-160, XP001155694 ISSN: 0014-2956 todo el documento -/-	1-27

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

24 de Octubre de 2003

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

10/11/2003

Nombre y dirección del correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Mossier, B

Forma PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio 1992)

14 **REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/06096

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	CAUBIN J ET AL.: "Dominio de enlace-colina como una nueva etiqueta de afinidad para la purificación de proteínas de fusión producidas en <i>Pichia pastoris</i> " BIOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 74 No. 2, 20 de Julio de 2001 (2001-07-20) páginas 164-171, XP001155696 ISSN: 0006-3592 todo el documento	1-27
A	KJERRULF M ET AL: "REPETICIONES EN SERIE EPITOPES AYUDANTES T MEJORAN LA INMUNOGENICIDAD DE LAS PROTEINAS DE FUSION MEDIANTE PROCESO DE PROMOCION Y PRESENTACION" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 34 No. 8/9, Junio de 1997 (1997-06) páginas 599-608, XP000857056 ISSN: 0161-5890 todo el documento	1-27
A	ASTORI M ET AL.: "RECOMBINACIONES DE PEPTIDOS DE FUSION QUE CONTIENEN SENCILLA O MULTIPLES REPETICIONES DE UN EPITOPE AUXILIAR T UBICO SON ALTAMENTE INMUNOGENICAS" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US vol. 33 No. 13, 1996, páginas 1017-1024, XP001028964 ISSN: 0161-5890 todo el documento	1-27
A	OLSZEWSKA WIESLAWA ET AL: "Protección contra encefalitis inducida por virus de sarampión mediante anticuerpos anti-mimotopes: el papel de la afinidad del anticuerpo" VIROLOGY vol. 272 No. 1, 30 de Junio de 2000 (2000-06-30) páginas 98-105, XP002259121 ISSN: 0042-6822 todo el documento	1-27
A	WO 99 67293 A (UNITED BIOMEDICAL INC; WANG CHANG YI (US); WALFIELD ALAN M (US)) 29 de Diciembre de 1999 (1999-12-29) resumen	1-27
A	US 6 090 388 A (WANG CHANG YI) 18 de Julio de 2000 (2000-07-18) resumen	1-27

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONALSolicitud Internacional No.
PCT/EP 03/06096**Casilla I Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 1 de la primera hoja)**

Este informe de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:

Aunque las reivindicaciones 26 y 27 esta dirigida a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/ la composición.
2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:
3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Norma 6.4(a).

Casilla II Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

VER HOJA ADICIONAL

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.
2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.
3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:
4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.

☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 03/06096

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 9967293 A	29-12-1999	AU 757919 B2	13-03-2003
		AU 4580299 A	10-01-2000
		BR 9911389 A	20-03-2001
		CA 2329754 A1	29-12-1999
		CN 1305498 T	25-07-2001
		EP 1090039 A1	11-04-2001
		JP 2002518038 T	25-06-2002
		WO 9967293 A1	29-12-1999
		ZA 200006384 A	29-05-2001
US 6090388 A	18-07-2000	AU 4704899 A	10-01-2000
		BR 9912175 A	10-04-2001
		CA 2330235 A1	29-12-1999
		CN 1303394 T	11-07-2001
		EP 1098910 A1	16-05-2001
		JP 2002518523 T	25-06-2002
		WO 9967294 A1	29-12-1999
		ZA 200006385 A	11-10-2001

Forma PCT/ISA/210 (anexo familia de patentes) (Julio 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. application No.
PCT/EP 03/06096A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/315 A61K39/385 C12N5/10 C12N15/62 C12N15/63
A61K38/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, BIOSIS, EPO-Internal, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANCHEZ-PUELLES J M ET AL: "IMMOBILIZATION AND SINGLE-STEP PURIFICATION OF FUSION PROTEINS USING DEAE-CELLULOSE" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 203, no. 1-2, 1992, pages 153-160, XP001155694 ISSN: 0014-2956 the whole document — —/—	1-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 October 2003

Date of mailing of the international search report

10/11/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patentkanal 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Internat Application No
 PCT/EP 03/06096

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CAUBIN J ET AL: "Choline-binding domain as a novel affinity tag for purification of fusion proteins produced in <i>Pichia pastoris</i>" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 74, no. 2, 20 July 2001 (2001-07-20), pages 164-171, XP001155696 ISSN: 0006-3592 the whole document	1-27
A	KJERRULF M ET AL: "TANDEM REPEATS OF T HELPER EPITOPES ENHANCE IMMUNOGENICITY OF FUSION PROTEINS BY PROMOTING PROCESSING AND PRESENTATION" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 34, no. 8/9, June 1997 (1997-06), pages 599-608, XP000857056 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-27
A	ASTORI M ET AL: "RECOMBINATION FUSION PEPTIDES CONTAINING SINGLE OR MULTIPLE REPEATS OF A UBIQUITOUS T-HELPER EPITOPE ARE HIGHLY IMMUNOGENIC" MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 33, no. 13, 1996, pages 1017-1024, XP001028964 ISSN: 0161-5890 the whole document	1-27
A	OLSZESKA WIESLAWA ET AL: "Protection against measles virus-induced encephalitis by anti-mimotope antibodies: The role of antibody affinity" VIROLOGY, vol. 272, no. 1, 30 June 2000 (2000-06-30), pages 98-105, XP002259121 ISSN: 0042-6822 the whole document	1-27
A	WO 99 67293 A (UNITED BIOMEDICAL INC ;WANG CHANG YI (US); WALFIELD ALAN M (US)) 29 December 1999 (1999-12-29) abstract	1-27
A	US 6 090 388 A (WANG CHANG YI) 18 July 2000 (2000-07-18) abstract	1-27

18

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 03/06096

19

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 26 and 27 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internation

Application No

PCT/EP 03/06096

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9967293 A	29-12-1999	AU 757919 B2	13-03-2003
		AU 4580299 A	10-01-2000
		BR 9911389 A	20-03-2001
		CA 2329754 A1	29-12-1999
		CN 1305498 T	25-07-2001
		EP 1090039 A1	11-04-2001
		JP 2002518038 T	25-06-2002
		WO 9967293 A1	29-12-1999
		ZA 200006384 A	29-05-2001
US 6090388 A	18-07-2000	AU 4704899 A	10-01-2000
		BR 9912175 A	10-04-2001
		CA 2330235 A1	29-12-1999
		CN 1303394 T	11-07-2001
		EP 1098910 A1	16-05-2001
		JP 2002518523 T	25-06-2002
		WO 9967294 A1	29-12-1999
		ZA 200006385 A	11-10-2001

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional

18 de Diciembre de 2003 (18.12.2003)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional.

WO 03/104272 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C07K 14/315
A61K 39/385, C12N 5/10, 15/62, 15/63, A61K 38/16

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP03/06096

(22) Fecha de Registro Internacional: 6 de Junio de 2003
(06.06.2003)

(25) Idioma de registro: INGLÉS

(26) Idioma de Publicación: INGLÉS

(30) Información de Prioridad:

0213365.0 11 de Junio de 2002 (11.06.2002) GB
0300914.9 15 de Enero de 2003 (15.01.2003) GB

(71) Solicitante: (para todos los estados designados, excepto Estados Unidos de América): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventores: e

(75) Inventores/Solicitantes (para los Estados Unidos de América únicamente): CABEZON, Silvia, Teresa, Elisa, Virgínia [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). ELLIS, Jonathan, H. [GB/GB] GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). Hamblin, Paul, A. [GB/GB] GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). PALMANTIER, Remi, M. [FR/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). VINALS Y DE BASSOLS, Carlota [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).

(74) Agente: DALTON, Marcus, Jonathan, William; GlaxoSmithKline, CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados Designados (regionales): patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR) patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

Publicado:

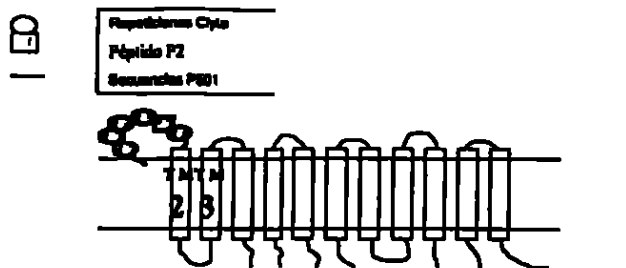
— con reporte de búsqueda internacional y para ser publicado con la bajo el recibido de este reporte.

— Antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Gulas sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "COMPOSICIONES INMUNOGENICAS"

FIG. 3. Estructura de la proteína de fusión CPC-p501 His expresada en *E. coli*



(57) Resumen: La presente invención se presente a parejas de fusión que actúan como parejas de fusión inmunológicas, como potenciadores de expresión, y preferiblemente a parejas de fusión que tienen ambas funciones. En particular las parejas de fusión que comprenden un también llamado dominio de unión a colina, por ejemplo las fusiones que comprenden LytA de *Streptococcus pneumoniae*, o la lisozima (CPL1) del fago neumocócico CP1 en la que el dominio de unión a colina se modifica para incluir un epítopo auxiliar T heterólogo y se fusionan a antígenos, particularmente antígenos escasamente inmunogénicos tales como autoantígenos, por ejemplo antígenos específicos de tumores o específicos de tejidos. La invención también se refiere a proteínas de fusión que las contienen, a su fabricación, a su uso en composiciones inmunogénicas y vacunas y a su uso en medicinas.

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 December 2003 (18.12.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/104272 A1

(51) International Patent Classification: C07K 14/315,
A61K 39/385, C12N 5/10, 15/62, 15/63, A61K 38/16

(21) International Application Number: PCT/EP03/06096

(22) International Filing Date: 6 June 2003 (06.06.2003)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0213365.0 11 June 2002 (11.06.2002) GB
0300914.9 15 January 2003 (15.01.2003) GB

(71) Applicants (for all designated States except US): GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). GLAXO GROUP LIMITED [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): CABEZON

SILIVA, Teresa, Ellen, Virginia [BE/BE]; Glaxo-SmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). ELLIS, Jonathan, H. [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). GERARD, Catherine, Marie, Ghislaine [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). HAMBLIN, Paul, A. [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). PALMANTIER, Rami, M. [FR/BE]; Glaxo-SmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE). VINALS Y DE BASSOLS, Carlotte [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals s.a., Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart Brussels (BE).

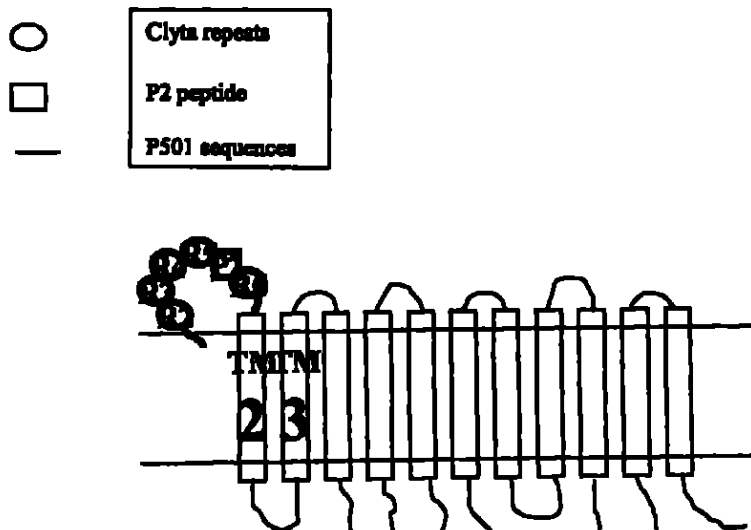
(74) Agent: DALTON, Marcus, Jonathan, William; Glaxo-SmithKline, CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GI, GL, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: IMMUNOGENIC COMPOSITIONS

Structure of CPC-p501 His fusion protein expressed in *S. cerevisiae*



(57) Abstract: The present invention relates fusion partners which act as immunological fusion partners, as expression enhancers, and preferably to fusion partners having both functions. In particular the fusion partners contain a so-called choline binding domain, for example fusions comprising LytA from *Streptococcus pneumoniae*, or the pneumococcal phage CP1 lysozyme (CPL1) wherein the choline binding domain is modified to include a heterologous T-helper epitope, and are fused to antigens, particularly poorly immunogenic antigens such as self-antigens, eg tumour specific or tissue specific antigens. The invention also relates to fusion proteins containing them, to their manufacture, to their use in immunogenic compositions and vaccines and to their use in medicines.

WO 03/104272 A1



MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PI, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

Published:

— with international search report

23

26

24

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia Solicitantes o agentes VJR/B45311	SI SE REQUIERE ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión de Informe de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)																								
Solicitud Internacional No. PCT/EP 03/06096	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 06.06.2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 11.06.2002																								
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7 C07K14/315																										
Solicitante GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.																										
1. Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>7</u> páginas, incluyendo la carátula. ☐ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de _____ páginas. 3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 5%;">I</td> <td style="width: 5%; text-align: center;">☒</td> <td>Bases del reporte</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td style="text-align: center;">☒</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td style="text-align: center;">☒</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td style="text-align: center;">☐</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			I	☒	Bases del reporte	II	☐	Prioridad	III	☒	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial	IV	☐	Falta de unidad de invención	V	☒	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación	VI	☐	Ciertos documentos citados	VII	☐	Ciertos defectos en la solicitud internacional	VIII	☐	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional
I	☒	Bases del reporte																								
II	☐	Prioridad																								
III	☒	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial																								
IV	☐	Falta de unidad de invención																								
V	☒	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación																								
VI	☐	Ciertos documentos citados																								
VII	☐	Ciertos defectos en la solicitud internacional																								
VIII	☐	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional																								
Fecha de presentación de la demanda 09.12.2003	Fecha de terminación de este reporte 04.03.2004																									
Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar European Patent Office D-80298 Munich Tel. No. +49 89 2399-0 Tx:523656 epmu d Fax No. +49 89 2399-4465		Funcionario autorizado Mossier, B Teléfono No. +49 89 2399-8706																								

I. Bases del Reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Carátulas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas:

1-68 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.:

1-27 como se presentaron originalmente

Dibujos, Páginas:

1-45 como se presentaron originalmente

Listado de secuencia para la descripción, páginas

1-45 como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
☐ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas:
☐ las reivindicaciones, Nos.:
☐ los dibujos, Hojas:

26

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas) de las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)):

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte.)

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

III. No-establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las preguntas como quiera que la invención reivindicada parezca ser novedosa, para comprender un nivel inventivo (para no ser obvio), o para ser aplicable industrialmente no se han examinado en relación con:

- ☐ toda la solicitud internacional.
☒ las reivindicaciones Nos. 26 y 27

Porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones No. 26 y 27 se relaciona con el siguiente asunto/materia que no requiere examen preliminar Internacional (especificar):
Ver hoja separada
- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (indican elementos particulares a continuación) o dichas reivindicaciones Nos. Son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (especifique):
- ☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.
- ☐ no se ha establecido un informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.
2. Un examen internacional significativo no puede llevarse a cabo debido a la falla del nucleótido y/o listado de secuencia amino ácida para cumplir con el estándar preparado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas:
- ☐ el formulario escrito no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar.
- ☐ la forma legible por computador no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar.

V. Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Sí: Reivindicaciones 1-27
	No: Reivindicaciones
Nivel inventivo (IS)	Sí: Reivindicaciones 1-27
	No: Reivindicaciones
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí: Reivindicaciones 1-25
	No: Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

Ver hoja separada

28

La presente solicitud se relaciona con patrones de fusión que actúan como patrones de fusión inmunológica y como mejoradores de expresión. En particular, los patrones de fusión contienen un dominio enlazante de colina (por ejemplo, la colina enlazante del *Streptococcus pneumoniae* amidasas LytA o de la lisozima neumococal CPL1. Dicho dominio de colina enlazante es modificado para incluir un epítopo heterólogo auxiliar T y se fusiona a los antígenos que son pobremente inmunogénicos. Se reivindican las proteínas de fusión así como el uso de dichas proteínas de fusión en composiciones inmunogénicas y vacunas y su uso en medicina.

Re Item III**No establecimiento de opinión respecto a la novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial**

Las reivindicaciones 24 y 27 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) del PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) del PCT).

Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 26 y 27 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones del uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero sin embargo, puede permitir reivindicaciones de un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un tratamiento médico nuevo.

Re Item V**Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a la novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación**

V.1 Se tuvieron en cuenta los siguientes documentos:

D1: SANCHEZ-PUELLES J M ET AL: 'IMMOBILIZATION AND SINGLE-STEP PURIFICATION OF FUSION PROTEINS USING DEAE-CELLULOSE' EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 203, no. 1-2, 1992, páginas 153-160, XP001155694 ISSN: 0014-2956

28

- D2: CAUBIN J ET AL: 'Choline-binding domain as a novel affinity tag for purification of fusion proteins produced in Pichia pastoris'**
BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 74, no. 2, 20 de julio de 2001, (2001-07-20), páginas 164-171, XP001155696 ISSN: 0006-3592
- D3: KJERRULF M ET AL: 'TANDEM REPEATS OF T HELPER EPITOTES ENHANCE IMMUNOGENICITY OF FUSION PROTEINS BY PROMOTING PROCESSING AND PRESENTATION' MOLECULAR IMMUNOLOGY**, ELMSFORD, NY, US, vol. 34, no. 8/9, junio de 1997 (1997-06), páginas 599-608, XP000857056 ISSN: 0161-5890
- D4: ASTORI M ET AL: 'RECOMBINATION FUSION PEPTIDES CONTAINING SINGLE OR MULTIPLE REPEATS OF A UBIQUITOUS T-HELPER EPITOPE ARE HIGHLY IMMUNOGENIC' MOLECULAR IMMUNOLOGY**, ELMSFORD, NY, US, vol. 33, no. 13, 1996, páginas 1017-1024, XP001028964 ISSN: 0161-5890

V.2 D1 así como D2 se relacionan con la purificación de un solo paso de proteínas de fusión que comprenden un dominio enlazante de colina como marcador. Las proteínas marcadas luego son purificadas en matrices DEAE.

La materia objeto revelada en D3 se refiere a la incorporación de epítopos auxiliares T como repeticiones tandem en proteínas quiméricas para hacer que dichas proteínas sean más inmunogénicas y D4 revela vacunas de subunidades de MMTV que comprenden la glicoproteína gp52 o el superantígeno fusionado a repeticiones simples o múltiples de un epítoto universal de células T (P30) de la toxina del tétano. Se incluyen además los marcadores de histidina de secuencias de glutathione-S-transferasa (GST) para facilitar la purificación de dichas proteínas recombinantes mediante la cromatografía de afinidad.

Ninguno de los documentos de la técnica anterior disponibles revela una proteína de fusión que comprenda un dominio enlazante de colina y un epítoto auxiliar T heterólogo promiscuo. Por lo tanto, se considera que la materia objeto de las reivindicaciones 1 - 27, es novedosa y cumple con los requerimientos del Artículo 33(1) y (2) del PCT.

V. 3 Se considera que la materia objeto a que se hace referencia en las reivindicaciones 1 - 27 de la presente solicitud comprende un paso inventivo (Artículo 33(3) PCT) por las siguientes razones.

El problema que hay que resolver por medio de la presente solicitud puede ser considerado como la disposición de una proteína de fusión que, fusionada a una proteína heteróloga actúa como un mejorador de expresión y que además es capaz de mejorar la inmunogenicidad de la proteína heteróloga adjunta al presente.

31

29

La técnica anterior disponible no enseña ni sugiere la fusión del dominio enlazante de colina y un epítoto auxiliar T promiscuo a una proteína heteróloga para resolver el problema anteriormente mencionado. Por lo tanto, parece que la materia objeto a que se hace referencia en las reivindicaciones 1 - 27 es inventiva bajo el Artículo 33(3) del PCT).

V.4 Se considera que la materia objeto de las reivindicaciones 1 - 25 es aplicable industrialmente. Por lo tanto, cumple con los requerimientos del Artículo 33(1) y (4) del PCT).

32

PATENT COOPERATION TREATY

51
30From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT
(PCT Rule 71.1)

To: Dalton, Marcus J.W. GLAXOSMITHKLINE CN925.1 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE	GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD 08 MAR 2004 ATTY: <i>[Signature]</i> IPM: <i>[Signature]</i> ON: <i>[Signature]</i> UPDATED ON: ATTY CHECKED/FILE <i>[Signature]</i>	Date of mailing (day/month/year) 04.03.2004
Applicant's or agent's file reference VJR/B45311	IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/EP 0306086	International filing date (day/month/year) 06.06.2003	Priority date (day/month/year) 11.06.2002
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

- The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
- A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
- Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
- REMINDER**

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed invention is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the International preliminary examining authority:  European Patent Office D-80288 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax +49 89 2369 - 4485	Authorized Officer Brandt, M Tel. +49 89 2369-2828 
--	---

PATENT COOPERATION TREATY

31

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference VJR/B45311		FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/PEAA/16)	
International application No. PCT/EP 03/06096	International filing date (day/month/year) 06.06.2003	Priority date (day/month/year) 11.06.2002	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C07K14/315			
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet. ☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of sheets.			
3. This report contains indications relating to the following items: I ☒ Basis of the opinion II ☐ Priority III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV ☐ Lack of unity of invention V ☒ Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI ☐ Certain documents cited VII ☐ Certain defects in the international application VIII ☐ Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand 09.12.2003		Date of completion of this report 04.03.2004	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80289 Munich Tel. +49 89 23699 - 0 Fax: +49 89 23699 - 4485		Authorized Officer Mossier, B Telephone No. +49 89 23699-6706 	

34

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

international application No. PCT/EP 03/06096

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, Pages

1-68 as originally filed

Claims, Numbers

1-27 as originally filed

Drawings, Sheets

1-45 as originally filed

Sequence listing part of the description, pages:

1-40, as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
- ☐ the claims, Nos.:
- ☐ the drawings, sheets:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP 03/06096**

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)).

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 26 and 27

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 26 and 27 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the Standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the Standard.

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-25
	No: Claims	

2. Citations and explanations

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. **PCT/EP 03/06096**

see separate sheet

Present application relates to fusion partners which act as immunological fusion partners and as expression enhancers. In particular, the fusion partners contain a choline binding domain (for example, the choline binding of the *Streptococcus pneumonia* LytA amidase or of the pneumococcal CPL1 lysozyme). Said choline binding domain is modified to include a heterologous T-helper epitope and is fused to antigens which are poorly immunogenic. Fusion proteins as well as the use of said fusion proteins in immunogenic compositions and vaccines and their use in medicine are claimed.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

Claims 26 and 27 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

For the assessment of the present claims 26 and 27 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

V.1 The following documents were taken into account:

D1: SANCHEZ-PUELLES J M ET AL: 'IMMOBILIZATION AND SINGLE-STEP PURIFICATION OF FUSION PROTEINS USING DEAE-CELLULOSE' EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 203, no. 1-2, 1992, pages 153-160, XP001155694 ISSN: 0014-2956

- D2: CAUBIN J ET AL: 'Choline-binding domain as a novel affinity tag for purification of fusion proteins produced in *Pichia pastoris*' BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 74, no. 2, 20 July 2001 (2001-07-20), pages 164-171, XP001155696 ISSN: 0006-3592
- D3: KJERRULF M ET AL: 'TANDEM REPEATS OF T HELPER EPITOPES ENHANCE IMMUNOGENICITY OF FUSION PROTEINS BY PROMOTING PROCESSING AND PRESENTATION' MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 34, no. 8/9, June 1997 (1997-06), pages 599-608, XP000857056 ISSN: 0161-5890
- D4: ASTORI M ET AL: 'RECOMBINATION FUSION PEPTIDES CONTAINING SINGLE OR MULTIPLE REPEATS OF A UBIQUITOUS T-HELPER EPITOPE ARE HIGHLY IMMUNOGENIC' MOLECULAR IMMUNOLOGY, ELMSFORD, NY, US, vol. 33, no. 13, 1996, pages 1017-1024, XP001028964 ISSN: 0161-5890

V.2 D1 as well as D2 relate to the single step purification of fusion proteins comprising a choline binding domain as tag. The tagged proteins are then purified on DEAE-matrices.

The subject matter disclosed in D3 refers to the incorporation of T helper epitopes as tandem repeats in chimeric proteins in order to render said proteins more immunogenic and D4 discloses MMTV subunit vaccines that comprise the gp52 glycoprotein or the superantigen fused to single or multiple repeats of an universal T-cell epitope (P30) from tetanus toxin. Histidine tags of glutathione-S-transferase (GST) sequences are further included to facilitate the purification of said recombinant proteins by affinity chromatography.

None of the available prior art documents discloses a fusion protein comprising a choline binding domain and a heterologous promiscuous T helper epitope. Hence, subject matter of claims 1 - 27 is considered as novel and it complies with the requirements of Article 33(1) and (2) PCT.

V.3 The subject matter referred to in claims 1 - 27 of the present application is considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT) for the following reasons:

The problem to be solved by the present application can be regarded as the provision of a fusion protein that, fused to a heterologous protein acts as an expression enhancer and that is further capable of enhancing the immunogenicity

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/EP03/06096

of the heterologous protein attached thereto.

The available prior art neither teaches nor suggests the fusion of a choline binding domain and a promiscuous T helper epitope to a heterologous protein in order to solve the above mentioned problem. Hence, the subject matter referred to in claims 1 - 27 appears to be inventive under Article 33(3) PCT.

V.4 The subject matter of claims 1 - 25 is considered industrially applicable. Hence, it meets requirements of Article 33(1) and (4) PCT.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención se presente a parejas de fusión que actúan como parejas de fusión inmunológicas, como potenciadores de expresión, y preferiblemente a parejas de fusión que tienen ambas funciones. En particular las parejas de fusión que comprenden un también llamado dominio de unión a colina, por ejemplo las fusiones que comprenden LytA de *Streptococcus pneumoniae*, o la lisozima (CPL1) del fago neumocócico CP1 en la que el dominio de unión a colina se modifica para incluir un epítipo auxiliar T heterólogo y se fusionan a antígenos, particularmente antígenos escasamente inmunogénicos tales como autoantígenos, por ejemplo antígenos específicos de tumores o específicos de tejidos. La invención también se refiere a proteínas de fusión que los contienen, a su fabricación, a su uso en composiciones inmunogénicas y vacunas y a su uso en medicinas.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS

La presente invención se refiere a parejas de fusión que actúan como parejas de fusión inmunológicas, como potenciadores de expresión y, preferiblemente, a parejas de fusión que tienen ambas funciones. La invención también se refiere a proteínas de fusión que las contienen, a su fabricación, a su uso en vacunas y a su uso en medicinas. En particular, se proporcionan parejas de fusión que contienen un llamado dominio de unión a colina, por ejemplo las fusiones que comprenden LytA de *Streptococcus pneumoniae*, o la lisozima (CPL1) del fago neumocócico CP1 en la que el dominio de unión a colina se modifica para incluir un epítopo auxiliar T heterólogo. Se muestra que tales parejas de fusión mejoran el nivel de expresión de la proteína heteróloga unida a ellas y también encuentran particular utilidad cuando se fusionan a proteínas o péptidos escasamente inmunogénicos que de otra forma son útiles como antígenos de vacunas. Más particularmente, tales parejas de fusión son útiles en construcciones que comprenden autoantígenos, por ejemplo antígenos de tumores específicos o de tejidos específicos.

Antecedentes de la invención

El *Streptococcus pneumoniae* sintetiza una N acetil-L-alanina amidasa, LytA, una autolisina que degrada específicamente el eje central de del peptidoglicano de la pared celular conduciendo eventualmente a la lisis celular. Su cadena de polipéptidos tiene dos dominios. El dominio N terminal es responsable de la actividad catalítica, mientras que el dominio C terminal de LytA es responsable de la afinidad a la colina y anclaje a la pared celular. El dominio C terminal se sabe que se une a la colina y análogos de

colina y también se une a aminos terciarios tales como DEAE (dietilaminoetil) que se usa comúnmente en cromatografía.

Lyt es una proteína de 318 aminoácidos y la parte extremo C comprende un tándem de seis repeticiones imperfectas de 20 ó 21 aminoácidos y una cola corta extremo COOH.

Las repeticiones se localizan en las siguientes posiciones:

R1: 177 – 191

R2: 192 – 212

R3: 213 – 234

R4: 235 – 254

R5: 255 – 275

R6: 276 – 298

Estas repeticiones se predice que están en una conformación de giro beta. El extremo C es responsable de la unión a colina. Asimismo, el extremo C de CPL 1 es responsable de la afinidad de unión y los restos aromáticos en la repetición contribuyen a tal unión. Estas proteínas se han usado como señales de afinidad para permitir una rápida purificación. (Sánchez Puelles, Eur J Biochem. 1992, 203, 153 – 9).

También se han estudiado en *Streptococcus pneumoniae* otras proteínas con un dominio de unión a colina.

Una de ellos PspA (o proteína A de superficie neumocócica), es un factor de virulencia (Yother J y Briles (1992) J Bacteriol 174 (2) p 601). Esta proteína es antigénica e inmunogénica. Tiene un dominio C terminal que consta de 10 repeticiones de 20 aminoácidos, homólogos con repeticiones de LytA.

CbpA (o proteína A de unión a colina) está implicada en la adherencia del neumococo a las células humanas (Rosenow y col., (1997) Mol Microbiol 25 (5) p 819). Muestra 10 repeticiones de 20 aminoácidos en el dominio C terminal que son casi idénticos a los de PspA.

LytB y LytC tienen una organización modular diferente de las proteínas anteriormente mencionadas como su dominio de unión a colina, hecho de 15 repeticiones y 11 repeticiones respectivamente, se sitúa en el extremo extremo N, no en el extremo del extremo C (García P Mol Microbiol (1999) 31 (4) p 1275 y García P y col (1999) Mol Microbiol 33 (1) p 128). La comparación de secuencias muestra que LytB tiene actividad glucosamidasa. LytC muestra una actividad de tipo lisozima *in vitro*. Adicionalmente, tres genes llamados PepA, PepB y PepC se clonaron en 1995. Aunque su función es desconocida, estos genes tienen también un número variable de repeticiones homólogas a las de LytA.

En su ciclo de infección, los fagos sintetizan hidrolasas de mureína que facilitan su paso a las bacterias. Las hidrolasas tienen un dominio de unión a colina.

Se ha estudiado bien la muramidasa CPL 1 del fago Cp – 1. Muestra 6 repeticiones de 20 aminoácidos en el extremo C implicado en el reconocimiento específico de la colina. (García J. L. J. Virol 61 (8) p 2573 – 80; (1987) y García E Prol Natl Acad Sci (1988) p 914). Una comparación de las repeticiones LytA y CPL 1 posibilita un consenso inicial de las repeticiones a realizar.

Las hidrolasas de mureína de los fagos Dp – 1 (García P y col (1983) J Gen Microbiol 129 (2) p 489, Cpl – 9 (García P y col (1989) Biochem Biophys Res Commun 158 (1) p

251, HB – 3 Romero y col., 1990 J Bacteriol 172 (9) p 5064 – 5070) y EJ – 1 Díaz (1992) J Bacteriol 174 (17) p 5516), también muestran las características de los dominios de unión a colina.

Esta propiedad también se comparte por la lisozima codificada por un fago neumocócico CP – 1. El documento WO 99/10375 describe entre otros, proteínas E6 o E7 del virus del papiloma humano unidas a una diana His y la porción extremo C de LytA (en esta memoria descriptiva (C – LytA) y la purificación de las proteínas mediante cromatografía de afinidad diferencial.

El documento WO 99/40188 describe entre otros las proteínas de fusión que comprenden antígenos MAGE con una cola His y una porción C – LytA en el extremo N de la molécula.

Sorprendentemente ahora se ha encontrado que las parejas según la presente invención, cuando se fusionaban a una proteína heteróloga eran capaces de potenciar la inmunogenicidad de las proteínas heterólogas unidas a ellas. También se ha encontrado que se puede potenciar el nivel de expresión de la proteína heteróloga unida a ellas. Por consiguiente, en una realización preferida, la presente invención proporciona una pareja de fusión inmunológica mejorada que también puede actuar como un potenciador de expresión.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención comprende una molécula de pareja de fusión que comprende un dominio de unión a colina o un fragmento del mismo o un análogo del mismo, y un epítipo de auxiliar T promiscuo, preferiblemente un epítipo T de clase

II MHC promiscuo. Dicha pareja de fusión muestra una capacidad para actuar tanto como pareja de fusión inmunológica o como potenciador de expresión y preferiblemente tanto como pareja inmunológica y como potenciador de expresión. Un epítipo auxiliar T promiscuo es un epítipo que se une a más de un alelo de clase II MHC, preferiblemente más de 3 alelos de clase II MHC. En particular tales epítipos son capaces de inducir la respuesta de la célula del auxiliar T en un gran número de individuos que expresan diversos halotipos de MHC. Opcionalmente, la proteína de fusión puede retener su capacidad para unirse a colina.

En una realización preferida el resto de unión a colina se deriva del extremo C de LytA. Preferiblemente el C – LytA o derivados comprenden al menos cuatro repeticiones de cualquiera de repeticiones R1 a R6 expuestos en la figura 1 (SEC ID N° 1 a 6). En una realización más preferida el C – LytA se extiende desde el aminoácido 177 al 278 que contiene una porción de la primera repetición y las otras cinco completas.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una pareja de fusión como se define en esta memoria descriptiva que además comprende una proteína heteróloga. La proteína heteróloga se puede bien conjugar químicamente o fusionarse a la pareja de fusión. Preferiblemente la proteína heteróloga es un antígeno asociado a tumores o un fragmento inmunogénico del mismo.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica las proteínas como se ha definido en esta memoria descriptiva. También se proporciona un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico y un hospedador transformado con dicho ácido nucleico o vector.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona una composición inmunogénica que comprende una secuencia de proteínas o de ácidos nucleicos como se describe en esta memoria descriptiva, y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Preferiblemente la composición inmunogénica comprende un Th – 1 que induce un adyuvante.

Todavía en una realización adicional, la invención proporciona la composición inmunogénica o proteína y ácidos nucleicos para uso en medicina. En particular, se proporciona una proteína o un ácido nucleico de la invención, para la fabricación de un medicamento que induzca una respuesta inmune en un paciente, o para uso en el tratamiento o profilaxis de enfermedades infecciosas o enfermedades de cáncer.

La invención además proporciona los procedimientos de tratamiento a un paciente que padece una enfermedad infecciosa o una enfermedad de cáncer, particularmente carcinoma de mama, pulmón (particularmente carcinoma de pulmón de células no pequeñas), colorrectal, ovarios, próstata, gástrico y otros GI (gastrointestinales) mediante la administración de una cantidad segura y eficaz de una composición o ácido nucleico como se describe en esta memoria descriptiva.

Todavía en una realización adicional la invención proporciona un procedimiento de producción de una composición inmunogénica como se describe en esta memoria descriptiva mediante la mezcla de un ácido nucleico o proteína de la invención con un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

Descripción detallada de la invención

Como se describe en esta memoria descriptiva, en una realización de la presente invención el dominio de unión a colina modificado (pareja de fusión) tiene la capacidad de actuar como potenciador de expresión con la proteína de fusión resultante se expresará en un rendimiento más alto en una célula hospedadora comparado con la proteína no fusionada, preferiblemente con un rendimiento mayor que aproximadamente 100% (2 veces más alto) ó 150% o más, medido mediante SDS – PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie o tinción con plata, opcionalmente seguido de barrido en gel. El dominio de unión a colina modificado según la invención tiene también la capacidad de actuar como una pareja inmunológica con la proteína de fusión resultante con una proteína heteróloga y será más inmunogénica en un hospedador comparada con la proteína heteróloga no fusionada.

En otra realización de la presente invención, el dominio de unión a colina modificado tiene la capacidad de actuar como pareja de fusión inmunológica, permitiendo una respuesta inmune potenciada que se obtiene con la proteína de fusión, comparada con la proteína de fusión sola.

En una realización preferida, el dominio de unión a colina tiene una función dual, que tiene la capacidad de actuar tanto como pareja de fusión inmunológica como potenciador de expresión.

En una realización preferida el resto de unión a colina se deriva del extremo C de LytA. Preferiblemente el C – LytA o derivados comprenden al menos dos repeticiones, preferiblemente al menos cuatro repeticiones. En este contexto, los derivados de C – LytA se refieren a una variante de C – LytA según la presente invención, esto quiere decir variantes que han retenido tanto la capacidad de actuar como pareja inmunológica

como un potenciador de expresión. Las variantes preferidas, incluyen, por ejemplo, péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad, lo más preferiblemente al menos entre 97 – 99% de identidad con cualquiera de las repeticiones R1 a R6 expuestas en la figura 1 (SEC ID N° 1 a 6), o un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos expuesta en la figura 1 (SEC ID N° 1 a 8).

Por consiguiente, en un aspecto de la invención se proporciona una proteína de pareja de fusión que comprende un dominio de unión a colina modificado y un epítipo auxiliar T promiscuo heterólogo en la que el dominio de unión a colina se selecciona del grupo constituido por:

- a) el dominio del extremo C de LytA como se expone en SEC ID N° 7;
- b) La secuencia de SEC ID N° 8;
- c) una secuencia de péptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad, lo más preferiblemente al menos entre 97 – 99% de identidad con cualquiera de las SEC ID N° 1 a 6;
- d) o una secuencia de péptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 o SEC ID N° 8.

En una realización más preferida el C – LytA se extiende desde el aminoácido 177 al 298 que contiene una porción de la primera repetición y las otras cinco completas, como se expone en la figura 1.

El segundo componente de la pareja de fusión, el epítipo de la célula T heterólogo se selecciona preferiblemente del grupo de epítipos que se unirán a un número de individuos que expresan más de una molécula de MHC II en seres humanos. Por ejemplo, los epítipos que se contemplan específicamente son los epítipos P2 y P30 de la toxina del tétanos, Panina – Bordignon Eur. J Immunol 19 (12), 2237 (1989). En una realización preferible el epítipo de células T heterólogo es P2 ó P30 de la toxina del tétanos.

El epítipo P2 tiene la secuencia QYIKANSKFIGITE y corresponde a los aminoácidos 830 – 843 de la toxina del tétanos. El epítipo P30 (restos 947 - 967 de la toxina del tétanos) tiene la secuencia FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE. La secuencia FNNFTV se puede opcionalmente suprimir. Otros epítipos T universales se pueden derivar de la proteína de circunsporocitos de *Plasmodium falciparum* en particular la región 378 – 398 que tiene la secuencia DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS (Alexander J, (1994) Immunity 1 (9), p 751 – 761). Otro epítipo se deriva de la proteína de fusión del virus Measles en el resto 288 – 302 que tiene la secuencia LSEIKGVIVHRLEGV (Partidos CD, 1990, J. Gen. Virol 71 (9) 2099 – 2105). Todavía otro epítipo se deriva del antígeno superficial del virus de la hepatitis B, en particular aminoácidos, que tiene la secuencia FLLTRILTIPQSLD. Otro conjunto de epítipos se deriva de la toxina de la difteria. Cuatro de estos péptidos (aminoácidos 271 – 290, 321 – 340, 331 – 350, 351 – 370) se sitúan en el mapa dentro del dominio T del fragmento B de la toxina y los 2 restantes se sitúan en mapa en el dominio R (411 – 430, 431 – 450):

PVFAGANYAAWAVNVAQVI

VHHNTEEIVAQSIALSSLMV

QSIALLSSLMVAQAIPLVGEL

VDIGFAAYNFVESINLFQV

QGESGHDIKITAENTPLPIA

GVLLPTIPGKLDVNKSKTHI

(Raju R., Navaneetham D., Okita D., Diethelm – Okita B., McCormick D., Conti – Fine B. M. (1995) Eur. J. Immunol. 25: 3207 – 14).

El epítipo T heterólogo se fusiona preferiblemente a C – LytA conteniendo al menos 4 repeticiones, preferiblemente repeticiones 2 – 5 inclusive. Una o más repeticiones posteriores se pueden fusionar opcionalmente al extremo C del epítipo T. Alternativamente, el epítipo T heterólogo se inserta preferiblemente entre dos repeticiones consecutivas de C – LytA conteniendo un total de al menos 4 repeticiones, o se inserta en una de las repeticiones de C – LytA conteniendo un total de al menos 4 repeticiones. Más preferiblemente, el C – LytA contiene 6 repeticiones y el epítipo heterólogo se inserta dentro y al comienzo de la sexta repetición de C – LytA.

Además la presente invención proporciona, en otros aspectos, las proteínas de fusión que comprenden al menos un polipéptido como se ha descrito anteriormente, así como polinucleótidos que codifican dichas proteínas de fusión en forma de composiciones farmacéuticas, por ejemplo, composiciones de vacunas, que comprenden un vehículo y/o un immunoestimulante fisiológicamente aceptables.

De este modo una autoproteína u otra proteína escasamente inmunogénica se puede fusionar bien al extremo N o al C de la pareja de fusión resultante. Alternativamente la autoproteína o proteína escasamente inmunogénica se puede insertar en la pareja de fusión. En una realización opcional un indicador de histidina o al menos cuatro,

preferiblemente más de 6 restos de histidina, se puede fusionar al extremo alternativo de la proteína escasamente inmunogénica. Esto permitiría que la proteína se purifique mediante etapas de cromatografía de afinidad, como una cola de de histidina, típicamente comprendiendo al menos cuatro, preferiblemente seis o más restos se una a iones metálicos y por lo tanto sea adecuada para cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizada (abreviadamente IMAC).

Por lo tanto las construcciones típicas deberían comprender:

- Proteína escasamente inmunogénica – repeticiones₁₋₄ de C – LytA – epítipo P₂ (insertado en o reemplazando la repetición₅ de C – LytA) – repetición₆ de C – LytA.
- Repeticiones₁₋₄ de C – LytA – epítipo P₂ (insertado en o reemplazando la Repetición₅ de C – LytA) – repetición₆ de C – LytA – proteína escasamente inmunogénica
- Proteína escasamente inmunogénica – repeticiones₂₋₅ de C – LytA – epítipo P₂ (insertado en la repetición₆ de C – LytA)
- C – LytA₂₋₅ – epítipo P₂ (insertado en la repetición₆ de C – LytA) – proteína escasamente inmunogénica
- Proteína escasamente inmunogénica – repeticiones₁₋₅ de C – LytA – epítipo P₂ - insertado en la repetición₆ de C – LytA
- Repeticiones₁₋₅ de C – LytA – epítipo P₂ - insertado en la repetición₆ de C – LytA – proteína escasamente inmunogénica
- Proteína escasamente inmunogénica – epítipo P₂ insertado en la repetición₁ de C – LytA – repeticiones₂₋₅ de C – LytA
- Epítipo P₂ insertado en la repetición₁ de C – LytA – repeticiones₂₋₅ de C – LytA – proteína escasamente inmunogénica

- Proteína escasamente inmunogénica – epítipo P_2 insertado en la repetición₁ de C – LytA – repeticiones₂₋₆ de C – LytA
- Epítipo P_2 insertado en la repetición₁ de C – LytA – repeticiones₂₋₆ de C – LytA – proteína escasamente inmunogénica
- Proteína escasamente inmunogénica – repetición₁ de C – LytA – epítipo P_2 insertado en la repetición₂ de C – LytA – repeticiones₃₋₆ de C – LytA
- Repetición₁ de C – LytA – epítipo P_2 insertado en la repetición₂ de C – LytA – repeticiones₃₋₆ de C – LytA – proteína escasamente inmunogénica;

en las que “insertada en” significa en cualquier lugar en la repetición por ejemplo entre el resto 1 y 2, o entre 2 y 3, etc.

El epítipo del auxiliar T promiscuo se puede insertar en una región repetida por ejemplo repeticiones₂₋₅ de C – LytA – repetición 6a de C – LytA – epítipo P_2 – repetición 6b de C – LytA, en la que el epítipo P_2 se inserta en la sexta repetición (véase figura 2).

En otras realizaciones preferidas el extremo del extremo C de CPL 1 (C – CPL 1) se puede usar como alternativa a C – LytA.

Alternativamente el epítipo P_2 en las construcciones anteriores se puede reemplazar por otros epítopos T promiscuos, por ejemplo P_{30} . En una realización de la invención dos o más epítopos promiscuos son parte de la construcción de fusión. Sin embargo se prefiere mantener la pareja de fusión tan pequeña como sea posible, limitando de este modo el número de CD8+ y epítopos B que potencialmente interfieren. De este modo, preferiblemente la pareja de fusión no es mayor de 100 – 140 aminoácidos, preferiblemente no mayor de 120 aminoácidos, típicamente aproximadamente 100

aminoácidos.

El antígeno al que se fusiona la pareja de fusión puede ser procedente de fuentes bacterianas, virales, de protozoos, fúngicas o de mamíferos incluyendo seres humanos.

Las parejas de fusión de la presente invención preferiblemente se fusionan a un autoantígeno tal como a un antígeno asociado a tumores o de tejidos específicos tales como los de próstata, mama, colorrectal, pulmón, ovarios, renal o cánceres de melanoma. Los fragmentos de dichos antígenos auto o de tumores se contemplan expresamente para fusionarse a la pareja de fusión de la invención. Típicamente el fragmento contendrá al menos 20, preferiblemente 50, más preferiblemente 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de longitud completa. Típicamente dichos fragmentos estarán desprovistos de uno o más dominios de transmembrana o pueden tener supresiones en el extremo N o extremo C de aproximadamente 3, 5, 8, 10, 15, 20, 28, 33, 50, 54 aminoácidos. Cuando se presenten adecuadamente, dichos fragmentos serán capaces de generar respuestas inmunes que reconocen la proteína de longitud total. Particularmente los polipéptidos ilustrativos de la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 10 aminoácidos contiguos, preferiblemente 20, más preferiblemente 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180 aminoácidos de una proteína asociada a tumores o de tejidos específicos fusionada a la pareja de fusión.

Los polipéptidos de la invención son inmunogénicos, es decir reaccionan detectablemente con un inmunoensayo (tal como un ELISA o ensayo de estimulación de células T) con antisueros y/o células T de un paciente con cripto que expresa cáncer.

El análisis de la actividad inmunogénica se puede realizar usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, dichos análisis se pueden realizar usando procedimientos tales como los descritos por Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. En un ejemplo ilustrativo, un polipéptido se puede inmovilizar en un soporte sólido y poner en contacto con los sueros de un paciente para permitir la unión de anticuerpos con los sueros al polipéptido inmovilizado. Después los sueros no unidos se puede retirar y detectar los anticuerpos unidos usando, por ejemplo, proteína A marcada con ^{125}I . Como reconocerían los expertos en la técnica, las porciones inmunogénicas del antígeno asociado a tumores o específico de tumores también se comprenden en la presente invención. Una "porción inmunogénica", como se usa en esta memoria descriptiva, es un fragmento que él mismo es inmunológicamente reactivo (es decir, se une específicamente) con las células B y/o receptores de antígenos superficiales de células T que reconocen el polipéptido. En general las porciones inmunogénicas se pueden identificar usando técnicas bien conocidas, tal como las resumidas por Paul, *Fundamental Immunology*, 3ª ed., 243 – 247 (Raven Press, 1993) y las referencias citadas en esta memoria descriptiva. Dichas técnicas incluyen el análisis de polipéptidos por la capacidad para reaccionar con anticuerpos de antígenos específicos, antisueros y/o líneas⁰ o clones de células T. Como se usa en esta memoria descriptiva, antisueros y anticuerpos son "específico del antígeno" si se unen específicamente a un antígeno (es decir, reaccionan con la proteína en un inmunoensayo ELISA u otro, y no reaccionan detectablemente con proteínas no relacionadas). Dichos antisueros y anticuerpos se pueden preparar como se describe en esta memoria descriptiva, usando técnicas bien conocidas.

En una realización preferida, una porción inmunogénica de un polipéptido es una porción que reacciona con antisueros y/o células T a un nivel que sustancialmente no es

inferior a la reactividad del polipéptido de longitud completa (por ejemplo, en un ensayo de reactividad ELISA y/o de células T). Preferiblemente, el nivel de actividad inmunogénica de la porción inmunogénica es al menos de aproximadamente 50%, preferiblemente al menos 70% y más preferiblemente mayor que aproximadamente 90% de la inmunogenicidad del polipéptido de longitud completa. En algunos casos, se identificará que las porciones inmunogénicas preferidas tienen un nivel de actividad inmunogénica mayor que la correspondiente al polipéptido de longitud completa, por ejemplo teniendo una actividad inmunogénica aproximadamente mayor que 100% ó 150%.

En ciertas otras realizaciones, las porciones inmunogénicas ilustrativas pueden incluir péptidos en las que una secuencia conductora del extremo N y/o dominio transmembrana se han suprimido. Otras porciones inmunogénicas ilustrativas contendrán una pequeña supresión en el extremo N- y/o C- (por ejemplo, aproximadamente 1 – 50 aminoácidos, preferiblemente aproximadamente 1 - 30 aminoácidos, más preferiblemente aproximadamente 5 - 15 aminoácidos), relativo a la proteína madura.

Los antígenos ejemplares de fragmentos derivados de ellos incluyen antígenos MAGE 1, Mage 3 y MAGE 4 u otro MAGE tales como los descritos en el documento WO 99/40188, PRAME (documento WO 96/10577), BAGE, RAGE, LAGE 1 (documento WO 98/32855), LAGE 2 (también conocido como NY – ESO – 1, documento WO 98/14464), XAGE (Liu y col, Cancer Res, 2000, 60: 4752 – 4755; documento 02/18584) SAGE, y HAGE (documento WO 99/53061) o GAGE (Robbins y Kawakami, 1996, Current Opinions in Immunology 8, pp 628 – 636; Van den Eynde y col., International Journal of Clinical & Laboratory Research (presentado 1997);

Correale y col., (1997), Journal of the National Cancer Institute 89, p 293. Sin duda estos antígenos se expresan en un amplio intervalo de tipos de tumores tales como melanoma, carcinoma de pulmón, sarcoma y carcinoma de vejiga.

En una realización preferida se utilizan antígenos de próstata, tales como el antígeno específico de próstata (PSA), PAP, PSCA (PNAS 95 (4) 1735 – 1740 1998), PSMA o el antígeno conocido como prostasa.

En una realización particularmente preferida el antígeno de próstata es P501S o un fragmento del mismo. P501S, también llamado prostefina (Xu y col., Cancer Res. 61, 2001, 1563 – 1568), se conoce como SEC ID N° 113 del documento WO98/37814 y es una proteína de 553 aminoácidos. Los fragmentos inmunogénicos y porciones del mismo comprenden al menos 20, preferiblemente 50, más preferiblemente 100 aminoácidos contiguos como se describe en la solicitud de patente referenciada anteriormente y se contemplan específicamente en la presente invención. Los fragmentos preferidos se describen en el documento WO 98/50567 (antígeno PS108) y como proteína asociada a cáncer de próstata (SEC ID N° 9 del documento WO 99/67384). Otros fragmentos preferidos son los aminoácidos 51 – 553, 34 – 553 ó 55 – 553 de la proteína P501S de longitud total. En particular, las construcciones 1, 2 y 3 (véase la figura 2, SEC ID N° 27 – 32) se contemplan expresamente y se pueden expresar en sistemas de levaduras, por ejemplo, secuencias de DNA que codifican dichos polipéptidos se pueden expresar en el sistema de levaduras.

La prostasa es una prostasa de serina específica de la próstata (de tipo tripsina), de 254 aminoácidos de longitud, con una triada H – D – S catalítica de proteasa de serina y una secuencia de prepropéptidos de terminal amino, que indica una función potencial

secretora (P. Nelson, Lu Gan, C. Ferguson, P. Moss, R. Linas, L. Hood y K. Wand, "Molecular cloning and characterisation of prostase, an androgen – regulated serine protease with prostase restricted expresión, en Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1999) 96, 3114 – 3119)." Se ha descrito un sitio de glicosilación putativo. La estructura pronosticada es muy similar a otras proteasas de serina conocidas, que muestran que el polipéptido maduro se pliega en un dominio único. La proteína madura es de 224 aminoácidos de longitud, con un epítipo A2 mostró que se procesaba naturalmente. La secuencia de nucleótidos de la prostasa y la secuencia polipeptídica deducida y homólogos se describen en Ferguson y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 3114 – 3119) y en las solicitudes de patente internacional número de documento WO 98/12302 (y también la correspondiente patente concedida de Estados Unidos 5,955,306), documento WO 98/20117 (y también las correspondientes patentes concedidas de Estados Unidos 5,840,871 y Estados Unidos 5,786,148) (calicreína específica de la próstata) y documento WO 00/04149 (P703P).

Otros antígenos específicos de la próstata se conocen del documento WO98/37418 y documento WO/004149. Otro es STEAP (PNAS 96 14523 14528 7 – 12 1999).

Otros antígenos asociados a tumores útiles en el contexto de la presente invención incluyen: Plu – 1 J. Biol. Chem 274 (22) 15633 – 15645, 1999, HASH – 1, HASH – 2, (Alders, M. y col., Hum. Mol. Genet. 1997, 6, 859 – 867), Cripto (Salomon y col., Bioessays 199, 21 61 – 70, patente de Estados Unidos 5654140), CASB616 (documento WO 00/53216), Criptina (documento de Estados Unidos 5,981,215). Adicionalmente, los antígenos particularmente relevantes para vacunas en la terapia de cáncer también comprenden tirosinasa, telomerasa, P53, NY – Br1,1 (documento WO 01/47959) y los

fragmentos de los mismos como se describen en el documento WO 00/43420, B726 (documento WO 00/60076, SEC ID números 469 y 463; documento 01/79286, SEC ID números 474 y 475), P510 (documento WO 01/34802 SEC ID números 537 y 538) y survivina.

La presente invención también es útil en combinación con antígenos de cáncer de mama tales como Her-2/neu, mamaglobina (patente de Estados Unidos N° 5,668,267), B305D (documento WO 00/61753 SEC ID números 299, 304, 305 y 315), o los descritos en los documentos WO 00/52165, WO 99/33869, WO 99/19479, WO 98/45328. Los antígenos Her-2/neu se describen entre otros en la patente de Estados Unidos 5,801,005. Preferiblemente el Her-2/neu comprende el dominio extracelular entero (que comprende aproximadamente los aminoácidos 1 – 645) o fragmentos del mismo y al menos una porción inmunogénica del o el dominio intracelular entero aproximadamente el extremo C de 580 aminoácidos. En particular, la porción intracelular debe comprender el dominio de fosforilación o fragmentos del mismo. Dichas construcciones se describen en el documento WO 00/44899. Una construcción particularmente preferida se conoce como ECD-PhD, una segunda se conoce como ECD deltaPhD (véase documento WO 00/44899). El Her-2/neu como se utiliza en esta memoria descriptiva se puede derivar de rata, ratón o ser humano.

Ciertos antígenos de tumores son antígenos de péptidos pequeños (es decir menores de 50 aminoácidos). Estos antígenos se pueden conjugar químicamente con la proteína de unión a colina modificada de la presente invención.

Los péptidos ejemplares incluyen péptidos derivados de mucina tales como MUC – 1

(véase por ejemplo el documento de Estados Unidos 5,744,144, e el documento de Estados Unidos 5,827,666, el documento WO 88/05054, el documento de Estados Unidos 4,963,484). Específicamente se contemplan los péptidos derivados de MUC - 1 que comprenden al menos una unidad repetida del péptido MUC - 1, preferiblemente al menos dos de tales repeticiones y que se reconocen mediante el anticuerpo SM3 (documento de Estados Unidos 6,054,438). Otros péptidos derivados de mucina incluyen el péptidos de MUC - 5.

Alternativamente, dicho antígeno es una interleuquina tal como IL 13 e IL 14, que son los preferidos. O dicho antígeno puede ser una hormona de autopéptidos tal como la hormona gonadotropina de longitud entera que libera hormona (GnRH, documento 95/20600), un péptido corto de 10 aminoácidos de longitud, útil en el tratamiento de muchos cánceres o en inmunocastración.

Otros antígenos específicos de tumores que son adecuados para acoplarse con la proteína de unión a colina modificada de la presente invención incluyen, pero no se restringen a gangliósidos específicos de tumores tales como GM2 y GM3.

El acoplamiento covalente del péptido a la proteína de unión a colina modificada se puede llevar a cabo de una manera bien conocida en la técnica. De este modo, por ejemplo, para el acoplamiento covalente directo es posible utilizar una carboddiimida, glutaraldehído o éster de (N-[-maleimidobutiriloxi]succinimida, utilizando enlazadores heterobifuncionales comúnmente disponibles comercialmente tales como CDAP y SPDP (usando las instrucciones de los fabricantes). Después de la reacción de acoplamiento, se puede aislar y purificar fácilmente el inmunógeno por medio de un

procedimiento de diálisis, un procedimiento de filtración en gel, un procedimiento de fraccionamiento, etc.

El antígeno también se puede derivar a partir de fuentes que son patógenas para los seres humanos tales como el virus de inmunodeficiencia humano VIH – 1 (tal como tat, nef, transcriptasa inversa, gag, gp 120 y gp160), los virus del herpes simplex humano, tales como gD o derivados del mismo o proteína inmediata temprana tal como ICP27 de VSH1 o VSH2, citomegalovirus ((especie humana) (tal como gB o derivados del mismo), Rotavirus (incluyendo virus vivos atenuados), virus de Epstein – Barr (tal como gp 350 o derivados del mismo), virus de varicela Zoster (tales como gpI, II e IE63) o virus de hepatitis tales como virus de hepatitis B (por ejemplo antígeno superficial de hepatitis B o un derivado del mismo), virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus: virus respiratorio sincitial (tales como las proteínas F y G o derivados de las mismas), virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de la parotiditis infecciosa, virus del papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, ...), flavivirus (por ejemplo virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus de la encefalitis transmitido por las garrapatas, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la influenza (virus vivo entero o inactivado, virus de la influenza partido, desarrollados en huevos o células MDCK, o viromas flu enteros (como describe R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915 – 920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA o M, o combinaciones de las mismas), o derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión de transferrina, proteínas de unión de lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por

ejemplo proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M catarrhalis* también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo toxina de pertactina, pertusis o derivadas de las mismas, hemaglutinina filamentosa, adenilatociclase, fimbria), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina termolábil o derivados de la misma, toxina termoestable o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo toxina del tipo toxina siga o derivados de la misma); *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp.*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina de vacuolación); *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp.*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp.*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp.*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina del tétanos y derivadas de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivadas de la misma), *C. difficile* (por ejemplo toxinas clostrídicas A o B y derivadas de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina botulínica y derivadas de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae*

(por ejemplo toxina diftérica y derivadas de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la erliquiosis granulocítica humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana externa raras), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o derivadas de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leshmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levaduras tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

Otros antígenos preferidos para *M. tuberculosis* son por ejemplo Tb Ra12, Tb H9, Tb Ra35, Tb38-1, Erd 14, DPV, MTI, MSL, mTTC2 y hTCC1 (WO 99/51748). Proteínas para *M. tuberculosis* también incluyen proteínas de fusión y variantes de las mismas, donde al menos dos, preferiblemente tres polipéptidos de *M. tuberculosis* se fusionan en una gran proteína. Las fusiones preferidas incluyen Ra12-TbH9-Ra35, Erd14-DPV-MTI, DPV-MTI-MSL, Erd14-DPV-MTI-MSL-mTCC2, Erd14-DPV-MTI-MSL, DPV-MTI-MSL-mTCC2, TbH9-DPV-MTI (documento WO 99/51748).

Los antígenos más preferidos para *Clamidia* incluyen por ejemplo la proteína de alto peso molecular (abreviadamente HWMP) (documento WO 99/17741), ORF3 (EP 366 412), y proteínas de la membrana putativas (abreviadamente Prmps). Otros antígenos de *Clamidia* de la formulación de vacunas se pueden seleccionar del grupo descrito en el documento WO 99/28475.

Los antígenos bacterianos preferidos se derivan de *Streptococcus spp.*, incluyendo *S. pneumoniae* (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina) y el antígeno proteico neumolisina (Biochem Biophys Acta, 1989, 67, 1007; Rubins y col., Microbial Pathogenesis, 25, 337-342), y derivados mutantes detoxificados del mismo (documento WO 90/06951; documento WO 99/03884). Otros antígenos bacterianos preferidos se derivan de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo), *H. influenzae* no tipificada, por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y la fimbrina y péptidos derivados de la fimbrina (documento de Estados Unidos 5,843,464) o variantes de múltiples copias o proteínas de fusión de las mismas.

Se conocen bien en la técnica los derivados del antígeno superficial de la hepatitis B e incluyen, entre otros, los antígenos PreS1, PreS2 S indicado y descrito en las solicitudes de patentes europeas EP-A-414 374; EP-A-0304 578 y EP 198-474. En una preferida el antígeno VBH es VBH polimerasa (Ji Hoon Jeong y col., 1996, BBRC 223, 264-271; Lee H.J. et al , Biotechnol. Lett. 15, 821-826). En otro aspecto preferido el antígeno dentro de la fusión es un antígeno VIH - 1, gp120, especialmente cuando se expresa en

las células CHO. En una realización adicional, el antígeno comprende gD2t como se ha definido previamente en esta memoria descriptiva.

En una realización preferida de la presente invención las fusiones comprenden un antígeno derivado del virus del papiloma humano (VPH 6a, 6b, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68), en particular los serotipos VPH que se considera que son responsables de verrugas genitales (VPH 6 ó VPH 11 y otros) y los virus VPH responsables del cáncer cervical (VPH 16, VPH 18 y otros).

Los antígenos VPH adecuados son E1, E2, E4, E5, E6, E7, L1 y L2. Las formas particularmente preferidas de fusiones profilácticas o terapéuticas de verrugas genitales comprenden partículas o capsómeros L1, y proteínas de fusión que comprenden uno o más antígenos seleccionados de las proteínas de VPH 6 y VPH 11 E6, E7, L1, y L2.

Las formas más preferidas de las proteínas de fusión son: L2E7 como se describe en el documento WO 96/26277, y la proteína D(1/3)-E7 descrita en el documento GB 9717953,5 (PCT/EP98/05285).

Una composición preferida de cáncer o infección cervical por VPH, profilaxis o vacuna terapéutica puede comprender 16 ó 18 antígenos de VPH. Por ejemplo los monómeros de los antígenos L1 y L2, o los antígenos L1 o L2 presentados juntos como una partícula de tipo virus (abreviadamente VLP) o la proteína sola de L1 presentada sola en a estructura de VLP o de capsómero. Tales antígenos, partículas semejantes a virus y capsómero se conocen *per se*. Véase por ejemplo el documento WO94/00152, documento WO94/20137, documento WO94/05792 y documento WO93/02184.

Adicionalmente las proteínas tempranas se pueden incluir solas o como proteínas de fusión tales como por ejemplo E7, E2 o preferiblemente E5; las realizaciones particularmente preferidas de esto incluyen una VLP que comprende proteínas de fusión L1E7 (documento WO 96/11272). Los antígenos de VPH 16 particularmente preferidos comprenden las proteínas tempranas E6 o E7 en fusión con un vehículo de proteína D para formar las fusiones proteína D - E6 o E7 del VPH 16 o combinaciones de las mismas; o combinaciones de E6 y E7 con L2 (documento WO 96/26277).

Alternativamente las proteínas tempranas de VPH 16 ó 18 E6 y E7, se pueden presentar en una molécula única, preferiblemente una fusión de proteína D- E6/E7. Opcionalmente otras fusiones contienen bien proteínas E6 y E7 de VPH 18 o ambas, preferiblemente en la forma de una proteína de fusión Proteína D - E6 o Proteína D - E7 o proteína de fusión Proteína D E6/E7. Las fusiones pueden comprender antígenos de otras cepas de VPH, preferiblemente de cepas VPH 31 ó 33.

Las fusiones según la presente invención comprenden antígenos derivados de parásitos que producen malaria. Por ejemplo, los antígenos preferidos de *Plasmodia falciparum* incluyen RTS,S y TRAP. RTS es una proteína híbrida que sustancialmente comprende todas las porciones de extremo C de la proteína de circumsporocitos (abreviadamente CS) de *P.falciparum* unida mediante cuatro aminoácidos de la porción preS2 del antígeno superficial de la hepatitis B al antígeno superficial (abreviadamente S) del virus de la hepatitis B. Su estructura completa se describe en la solicitud de patente internacional N° PCT/EP92/02591, publicada con el número de documento WO 93/10152 reivindicando prioridad de la solicitud de patente del Reino Unido N° 9124390,7. Cuando se expresa en RST de levadura se produce en forma de una partícula de proteína y cuando se coexpresa con el antígeno S de VBH produce una

partícula mezclada conocida como RTS,S. Los antígenos TRAP se describen en la solicitud de patente universal N° PCT/GB89/00895, publicada como documento WO 90/01496. Una realización preferida de la presente invención es una fusión en la que la preparación antigénica comprende una combinación de los antígenos RTS,S y TRAP. Otros antígenos de plasmodios que son probablemente candidatos que van a ser componentes de la fusión son *P. falciparum* MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, secuestrin, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 y sus análogos en *Plasmodium spp.*

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica la pareja de fusión según la presente invención. Además la invención se refiere a un polinucleótido que se hibrida a la secuencia polinucleotídica proporcionada en esta memoria descriptiva en la figura 1 (SEC ID N° 9 a 16). Con relación a esto, especialmente la invención se refiere a polinucleótidos que se hibridan en condiciones rigurosas al polinucleótido descrito en esta memoria descriptiva. Como se usa en esta memoria descriptiva, las expresiones "condiciones rigurosas" y "condiciones de hibridación rigurosas" significa la hibridación que ocurre solamente si hay al menos 95% y preferiblemente 97% de identidad entre secuencias. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación rigurosas es la incubación durante una noche a 42°C en una solución que comprende: formamida al 50%, 5 x de SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x de solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 microorganismos/ml de DNA de esperma de salmón fraccionado desnaturalizado seguido de lavado del soporte de hibridación en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Las condiciones de hibridación y lavado se conocen bien y se ejemplifican en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición,

Cold Sprong Harbor, N. Y., (1989), en particular el su capítulo 11. Se puede usar también hibridación en solución con las secuencias de polinucleótidos proporcionadas por la invención.

La presente invención también proporciona un polinucleótido que codifica el polipéptido que comprende la pareja de fusión según la presente invención fusionada a a un antígeno asociado a tumores o fragmento del mismo. En particular, la presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que codifican una pareja de fusión que comprende un dominio de unión a colina y un epítopo auxiliar T promiscuo heterólogo, preferiblemente cuando el dominio de unión a colina se deriva del extremo C de LytA. En una realización más preferida, el resto C – LytA de los polinucleótidos según la invención comprenden al menos cuatro repeticiones de cualquiera de SEC ID N° 9 – 14, más preferentemente comprenden la secuencia SEC ID N° 15, todavía más preferible la secuencia de SEC ID N° 16. En otras realizaciones relacionadas, la presente invención proporciona variantes de polinucleótidos que son sustancialmente idénticas a las secuencias descritas en esta memoria descriptiva en la SEC ID N° 9 – 16, por ejemplo las que comprenden al menos 70% de identidad de secuencias, preferiblemente al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% o más, de identidad de secuencias comparada con la secuencia polinucleotídica de esta invención usando procedimientos convencionales, por ejemplo, análisis BLAST que usa parámetros estándar. Todavía en una realización adicional el polinucleótido que se reivindica comprende además una proteína heteróloga.

Dichas secuencias de polinucleótidos se pueden insertar en un vector de expresión adecuado y expresarse en un hospedador adecuado. Se pueden proporcionar vectores

que codifican la proteína de unión a colina modificada de la invención y que contiene un sitio de restricción adecuado en el que un DNA que codifica una proteína escasamente inmunogénica se puede insertar para producir una proteína de fusión. En otras realizaciones de la invención, las secuencias de polinucleótidos de fragmentos del mismo que codifican fusiones de polipéptidos de la invención, se pueden usar en moléculas de DNA recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células hospedadoras adecuadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, se pueden producir otras secuencias que codifiquen sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente y estas secuencias se pueden utilizar para clonar y expresar un polipéptido dado.

Como entenderán los expertos en la técnica, en algunos casos puede ser ventajoso producir secuencias de nucleótidos que codifiquen polipéptidos que poseen codones de origen no natural. El código de DNA tiene cuatro letras (A, T, C y G) y utiliza éstas para deletrear "codones" de tres letras que representan los códigos de los aminoácidos de las proteínas en los genes de un organismo. La secuencia lineal de codones junto con la molécula de DNA se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos en la (s) proteína (s) codificada (s) por estos genes. El código es altamente degenerativo, con 61 codones que codifican los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales de "parada". De este modo, la mayoría de los aminoácidos se codifican por más de un codón, de hecho varios se codifican por cuatro o más codones diferentes.

Cuando se dispone de más de un codón para codificar un aminoácido dado, se ha observado que los patrones de uso de codones de organismos son altamente no aleatorios. Las diferentes especies muestran una diferente desviación en su selección de

codones y, además, la utilización de codones puede ser notablemente diferente en una única especie entre genes que se expresan en niveles altos y bajos. Esta desviación es diferente en virus, plantas, bacterias y células de mamíferos, y algunas especies muestran una desviación mayor de una selección de codones aleatoria que otras. Por ejemplo, los seres humanos y otros mamíferos presentan una desviación menos fuerte que ciertas bacterias o virus. Por estas razones existe una probabilidad significativa de que un gen de mamífero expresado en *E. coli* o un gen viral expresado en células de mamíferos tenga una distribución inapropiada de codones para su expresión eficaz. Se cree que la presencia en una secuencia de DNA heteróloga de grupos de codones que se observan raramente en el hospedador en el que se va a producir la expresión, predice niveles bajos de expresión heteróloga en ese hospedador.

En consecuencia, se pueden optimizar los codones preferidos por un hospedador procariótico (por ejemplo *E. coli* o levadura) o eucariótico en particular, esto se selecciona para incrementar la velocidad de expresión de proteínas con el fin de producir una transcripción de RNA recombinante que tiene propiedades deseables, tales como por ejemplo una semivida que es mayor que la de una transcripción generada de la secuencia de origen natural, o para optimizar la respuesta inmune en seres humanos. El procedimiento de la optimización de codones puede incluir cualquier secuencia, generada bien manualmente o por programa de ordenador, donde se modifican alguno o todos los codones de la secuencia nativa. Se han publicado diversos procedimientos (Nakamura y col., *Nucleic Acids Research* 1996, 24: 214 – 215; documento WO98/34640). Un procedimiento preferido según esta invención es el procedimiento Syngene, una modificación del procedimiento Calgene (R. S. Hale y G Thompson (*Protein expresión and Purification* Vol. 12 pp. 185 – 188 (1998))).

Por consiguiente, en una realización preferida la secuencia de DNA de la proteína tiene un RSCU (uso de codones sinónimos relativos (también como índice de codones CI)) de al menos 0,65 y tienen menos de 85% de identidad con la correspondiente región de tipo salvaje.

Este procedimiento de optimización de codones y las construcciones resultantes son ventajosas ya que pueden tener alguno o todos de los siguientes beneficios: 1) mejorar la expresión del producto génico reemplazando los codones raros o infrecuentemente usados con codones usados más frecuentemente, 2) retirar o incluir sitios de enzimas de restricción para facilitar la clonación hacia abajo y 3) reducir el potencial de recombinación homóloga entre la secuencia de inserción en el vector de DNA y las secuencia genómicas y 4) mejorar la respuesta inmune en seres humanos aumentando una respuesta celular y/o de un anticuerpo (preferiblemente ambas respuestas) frente al antígeno diana. Las secuencias de la presente invención han reducido ventajosamente el potencial de recombinación, pero se expresan al mismo nivel que las secuencias de tipo salvaje. Debido a la naturaleza de los algoritmos usados por el programa SynGene para generar una secuencia optimizada de codones, es posible generar un número extremadamente grande de secuencias optimizadas de codones que realizarán una función similar. Brevemente, los codones se asignan usando un procedimiento estadístico para proporcionar genes sintéticos que tengan una frecuencia de codones más próxima que la encontrada naturalmente en *E. coli* altamente expresada y en genes humanos. Brevemente, los codones se asignan usando un procedimiento estadístico para proporcionar un gen sintético que tenga una frecuencia de codones más próxima que la encontrada naturalmente en genes humanos altamente expresados tales como actina . Los ejemplo ilustrativos, aunque no limitantes, de secuencias optimizadas de codones se

proporcionan en las SEC ID N° 19 – 22 y SEC ID N° 24 – 26.

En los polinucleótidos de la presente invención, el patrón de uso de codones se altera del típico del antígeno diana para representar más cercanamente la desviación de codones de un gen altamente expresado en un organismo diana, por ejemplo la actina humana. El “coeficiente de uso de codones” es una medida del nivel de semejanza del patrón de codones de una secuencia polinucleotídica dada con el de una especie diana. Las frecuencias de codones pueden proceder de fuentes bibliográficas para los genes altamente expresados de muchas especies (véase, por ejemplo, Nakamura y col., *Nucleic Acids Research* 1996, 24: 14 – 215). Las frecuencias de codones de cada uno de los 61 codones (expresados como el número de apariciones por 1000 codones de la clase seleccionada de genes) se normalizan para cada uno de los veinte aminoácidos naturales, de manera que el valor para el codón usado más frecuentemente de cada aminoácido se establece en 1 y las frecuencias de los codones menos comunes se gradúan para que estén entre cero y uno. De este modo a cada uno de los 61 codones se le asigna un valor de 1 o inferior para los genes altamente expresados de la especie diana. Con el fin calcular el coeficiente de uso de codones de un polinucleótido específico, relativo a los genes altamente expresados de esa especie, se anota el valor de la escala de cada codón del polinucleótido específico y se toma la media geométrica de todos estos valores (dividiendo la suma de los logaritmos naturales de estos valores por el número total de codones y obteniendo el antilogaritmo). El coeficiente tendrá un valor entre cero y 1 y cuanto más alto sea el coeficiente más serán los codones del polinucleótido que se usan frecuentemente. Si una secuencia polinucleotídica tiene un coeficiente de uso de codones de 1, todos los codones son los codones “más frecuentes” para los genes altamente expresados de la especie diana.

Según la presente invención, el patrón de uso de codón del polinucleótido excluirá preferiblemente codones que representan < 10% de los codones usados para un aminoácido particular. Un valor de uso de codones sinónimo relativo (abreviadamente RSCU) es el número observado de codones dividido por el número esperado si todos los codones para los aminoácidos se usaran con igual frecuencia. Un polinucleótido de la presente invención preferentemente excluirá codones con un valor de RSCU inferior a 0,2 en genes altamente expresados del organismo diana. Un polinucleótido de la presente invención generalmente tendrá un coeficiente de uso de codones para genes humanos altamente expresados mayor que 0,6, preferiblemente mayor que 0,65, más preferiblemente mayor que 0,7. Las tablas de uso de codones para seres humanos se pueden también encontrar en el Genbank (base de datos de secuencias genéticas del Instituto Nacional de la Salud).

En comparación, un gen de actina beta altamente expresado tiene un RSCU de 0,747.

La tabla de uso de codones (tabla 1) para un Homo sapiens se establece a continuación:

Tabla 1. Uso de codones para genes humanos (altamente expresados) 24/1/91 (human_hi.cod)

AmÁc	Codón	Número	/1000	Fracción
Gly	GGG	905,00	18,76	0,24
Gly	GGA	525,00	10,88	0,14

Gly	GGT	441,00	9,14	0,12
Gly	GGC	1867,00	38,70	0,50
Glu	GAG	2420,00	50,16	0,75
Glu	GAA	792,00	16,42	0,25
Asp	GAT	592,00	12,27	0,25
Asp	GAC	1821,00	37,75	0,75
Val	GTG	1866,00	38,68	0,64
Val	GTA	134,00	2,78	0,05
Val	GTT	198,00	4,10	0,07
Val	GTC	728,00	15,09	0,25
Ala	GCG	652,00	13,51	0,17
Ala	GCA	488,00	10,12	0,13
Ala	GCT	654,00	13,56	0,17
Ala	GCC	2057,00	42,64	0,53
Arg	AGG	512,00	10,61	0,18
Arg	AGA	298,00	6,18	0,10
Ser	AGT	354,00	7,34	0,10
Ser	AGC	1171,00	24,27	0,34
Lys	AAG	2117,00	43,88	0,82
Lys	AAA	471,00	9,76	0,18

Asn	AAT	314,00	6,51	0,22
Asn	AAC	1120,00	23,22	0,78
Met	ATG	1077,00	22,32	1,00
Ile	ATA	88,00	1,82	0,05
Ile	ATT	315,00	6,53	0,18
Ile	ATC	1369,00	28,38	0,77
Thr	ACG	405,00	8,40	0,15
Thr	ACA	373,00	7,73	0,14
Thr	ACT	358,00	7,42	0,14
Thr	ACC	1502,00	31,13	0,57
Trp	TGG	652,00	13,51	1,00
End	TGA	109,00	2,26	0,55
Cys	TGT	325,00	6,74	0,32
Cys	TGC	706,00	14,63	0,68
End	TAG	42,00	0,87	0,21
End	TAA	46,00	0,95	0,23
Tyr	TAT	360,00	7,46	0,26
Tyr	TAC	1042,00	21,60	0,74
Leu	TTG	313,00	6,49	0,06
Leu	TTA	76,00	1,58	0,02

Phe	TTT	336,00	6,96	0,20
Phe	TTC	1377,00	28,54	0,80
Ser	TCG	325,00	6,74	0,09
Ser	TCA	165,00	3,42	0,05
Ser	TCT	450,00	9,33	0,13
Ser	TCC	958,00	19,86	0,28
Arg	CGG	611,00	12,67	0,21
Arg	CGA	183,00	3,79	0,06
Arg	CGT	210,00	4,35	0,07
Arg	CGC	1086,00	22,51	0,37
Gln	CAG	2020,00	41,87	0,88
Gln	CAA	283,00	5,87	0,12
His	CAT	234,00	4,85	0,21
His	CAC	870,00	18,03	0,79
Leu	CTG	2884,00	59,78	0,58
Leu	CTA	166,00	3,44	0,03
Leu	CTT	238,00	4,93	0,05
Leu	CTC	1276,00	26,45	0,26
Pro	CCG	482,00	9,99	0,17
Pro	CCA	456,00	9,45	0,16

Pro	CCT	568,00	11,77	0,19
Pro	CCC	1410,00	29,23	0,48

Una secuencia de DNA que codifica las proteínas de fusión o la proteína de unión a colina modificada de la presente invención se puede sintetizar usando técnicas estándar de síntesis de DNA, tales como unión enzimática según describen D. M. Roberts y col., en *Biochemistry* 1985, 24, 5090 – 5098, mediante síntesis química, mediante polimerización enzimática *in vitro*, o mediante tecnología PCR que utiliza, por ejemplo, una polimerasa termoestable, o mediante una combinación de estas técnicas.

La polimerización enzimática de DNA se puede llevar acabo *in vitro* usando una DNA polimerasa tal como la DNA polimerasa I (fragmento Klenow) o Taq polimerasa en un tampón apropiado que contiene los nucleósidos trifosfato dATP, dCTP, dGTP y dTTP según se requiera a una temperatura de 10° -37°C, generalmente en un volumen de 50µl o menos. La unión enzimática de los fragmentos de DNA se puede llevar a cabo usando DNAligasa tal como DNAligasa T4 en un tampón adecuado tal como Tris 0,05M (pH 7,4), MgCl₂ 0,01M, ditiotritol 0,01M, espermidina 1mM, ATP 1mM y albúmina sérica bovina 0,1mg/ml a una temperatura de 4°C hasta ambiente, generalmente en un volumen de 50 µl o menos. La síntesis química del polímero o fragmentos de DNA se puede llevar a cabo mediante la química de los fosfotriésteres, fosfatos o fosforamiditas, que usan técnicas de fase sólida tales como las descritas en 'Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments - A Laboratory Manual' (ed. H.G. Gassen and A. Lang), Verlag Chemie, Weinheim (1982), u otras publicaciones científicas, por ejemplo, M.J. Gait, H.W.D. Matthes, M. Singh, B.S. Sproat, y R.C. Titmas, *Nucleic Acids Research*, 1982, 10, 6243; B.S. Sproat, y W. Bannwarth, *Tetrahedron Letters*, 1983, 24, 5771;

M.D. Matteucci and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters*, 1980, 21, 719; M.D. Matteucci y M.H. Caruthers, *Journal of the American Chemical Society*, 1981, 103, 3185; S.P. Adams y col., *Journal of the American Chemical Society*, 1983, 105, 661; N.D. Sinha, J. Biernat, J. McMannus, y H. Koester, *Nucleic Acids Research*, 1984, 12, 4539; y H.W.D. Matthes y col., *EMBO Journal*, 1984, 3, 801.

El procedimiento de la invención se puede realizar mediante técnicas de recombinación convencionales tales como las descritas en Maniatis y col., *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor, 1982-1989.

En particular el procedimiento puede comprender las etapas de:

- i) preparar un vector de expresión replicable o de integración capaz, en una célula hospedadora, de expresar un polímero de DNA que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína o un derivado inmunogénico de la misma.
- ii) transformar una célula hospedadora con dicho vector
- iii) cultivar dicha célula hospedadora en condiciones que permitan la expresión de dicho polímero de DNA para producir dicha proteína; y
- iv) recubrir dicha proteína

El término "transformador" se usa en esta memoria descriptiva para significar la introducción de un DNA extraño en una célula hospedadora. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante transformación, transfección o infección con un vector plásmido o viral adecuado usando, por ejemplo técnicas convencionales como se describe en *Genetic Engineering*; Eds. S.M. Kingsman y A.J. Kingsman; Blackwell Scientific

Publications; Oxford, England, 1988. El término 'transformado' o 'transformante' se aplicará posteriormente en esta memoria descriptiva a la célula hospedadora resultante que contiene y expresa el gen extraño de interés.

Los vectores de expresión son nuevos y también forman parte de la invención.

Los vectores de expresión replicables se pueden preparar de acuerdo con la invención, mediante el desdoblamiento de un vector compatible con la célula hospedadora para proporcionar un segmento lineal de DNA que tiene un replicón intacto, y combinando dicho segmento lineal con una o más moléculas de DNA que, junto con dicho segmento lineal codifican el producto deseado, tal como el polímero de DNA que codifica la proteína de la invención, o un derivado del mismo, en condiciones de unión.

De este modo, el polímero de DNA se puede producir o formar durante la construcción del vector según se desee.

La elección del vector se determinará en parte por la célula hospedadora, que puede ser procariótico o eucariótico pero preferiblemente *E. coli*, levadura o células CHO. Los vectores adecuados incluyen plásmidos, bacteriófagos, cósmidos y virus recombinantes. Los vectores de expresión y clonación contienen preferiblemente un marcador seleccionable de tal manera que solamente las células hospedadoras que expresen el marcador sobrevivirán en las condiciones selectivas. Los genes de selección incluyen pero no se limitan a la codificación de la proteína que confiere resistencia a la ampicilina, tetraciclina o canamicina. Los vectores de expresión también contienen secuencias de control que son compatibles con el hospedador designado. Por ejemplo,

las secuencias de control de expresión de *E. coli* y más generalmente de procariotas, incluyen sitios de unión a promotores y ribosomas. Las secuencias de promotores pueden ser de origen natural, tales como la lactamasa (penicilinas) (Weissman 1981, en *Interferon 3* (ed. L. Gresser), lactosa (lac) (Chang y col., *Nature*, 1977, 198: 1056) y triptófano (trp) (Goeddel y col., *Nucl. Acids Res.* 1980, 8, 4057) y sistema del promotor P_L lambda derivado. Además, los promotores sintéticos que no se producen en la naturaleza también funcionan como promotores bacterianos. Por ejemplo este es el caso del promotor del híbrido sintético tac que se deriva de las secuencias de los promotores de trp y lac (De Boer y col., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 1983, 80, 21-26). Estos sistemas son particularmente adecuados con *E. coli*.

Los vectores compatibles de levaduras también llevan marcadores que permiten la selección de transformantes exitosos confiriendo fototrofia a mutantes autotróficos o resistencia a metales pesados en cepas salvajes. Las secuencias de control de expresión de vectores de levadura incluyen promotores de enzimas glicolíticas (Hess y col., *J. Adv. Enzyme Reg.* 1968, 7, 149), el gen PHO5 que codifica la fosfatasa ácida, el gen CUP1, el gen ARG3, promotores de los genes GAL y secuencias de promotores sintéticos. Otros elementos de control útiles en la expresión de levaduras son terminadores y secuencias conductoras de mRNA. La secuencia que codifica la posición 5' es particularmente útil ya que típicamente codifica un péptido señal que comprende aminoácidos hidrófobos que dirigen la secreción de la proteína de la célula. Las secuencias señal adecuadas se pueden codificar mediante genes de proteínas secretadas de levaduras tales como el gen de la invertasa de levadura y el gen del factor α , fosfatasa ácida, toxina asesina, el gen del factor de igualamiento α y recientemente la secuencia señal de inulinasa heteróloga derivada del gen INU1A de *Kluyveromyces marxianus*.

Los vectores adecuados se han desarrollado por expresión en *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae*.

Se dispone de una diversidad de vectores de expresión de *P. pastoris* basándose en diversos promotores inducibles o constitutivos (Cereghino and Cregg, FEMS Microbiol. Rev. 2000,24:45-66). Para la producción de proteínas citosólicas y secretadas los vectores de *P. pastoris* comúnmente usados contienen el promotor de alcohol oxidasa (AOX1) regulado muy fuerte y firmemente. Los vectores también contienen el gen histidinol denhidrogenasa (HIS4) de *P. pastoris* para selección en hospedadores de his4. La secreción de proteína extraña requiere la presencia de una secuencia señal y la secuencia señal del factor de igualamiento de prepro alfa de *S. cerevisiae* se ha usado amplia y exitosamente en el sistema de expresión de *Pichia*. Los vectores de expresión se integran en el genoma de *P. pastoris* para maximizar la estabilidad de cepas de expresión. Como en *S. cerevisiae*, el desdoblamiento de un vector de expresión *P. pastoris* con una secuencia compartida por el genoma hospedador (AOX1 o HIS4) estimula los sucesos de recombinación homóloga que dirigen eficazmente la integración del vector en el locus genómico. En general, una cepa recombinante que contiene múltiples copias integradas de un módulo de expresión puede producir proteínas más heterólogas que la cepa de una sola copia. La forma más eficaz de obtener transformantes de alto número de copias requiere la transformación de una cepa receptora de *Pichia* mediante la técnica de esferoplastos (Cregg y col., Mol Cell. Biol. 5: 3376 - 3385).

La preparación del vector de expresión replicable se puede llevar a cabo convencionalmente con enzimas adecuadas para restricción, polimerización y unión de

DNA, mediante procedimientos descritos, por ejemplo, Manialis y col., citado anteriormente.

La célula hospedadora recombinante se prepara, de acuerdo con la invención, mediante la transformación de una célula hospedaora con un vector de expresión replicable de la invención en condiciones de transformación. Las condiciones de transformación adecuadas son convencionales y se describen en, por ejemplo, Maniatis y col., citado anteriormente o "DNA Cloning" Vol. II, D.M. Glover ed., IRL Press Ltd, 1985.

La elección de las condiciones de transformación depende de la elección de la célula hospedadora que se va a transformar. Por ejemplo, la transformación *in vivo* que usa un vector viral vivo como el agente de transformación de los polinucleótidos de la invención se ha descrito anteriormente. La transformación bacteriana de un hospedador tal como *E. coli* se puede hacer mediante absorción directa de los polinucleótidos (que pueden ser los vectores de expresión que contienen la secuencia deseada) después de que el hospedador se ha tratado con una solución de CaCl_2 (Cohen y col., Proc. Nat. Acad. Sci., 1973, 69, 2110) o con una solución que comprende una mezcla de cloruro de rubidio (RbCl), MnCl_2 , acetato potásico y glicerol, y después con ácido 3-[N-morfolino]-propano-sulfónico, RbCl y glicerol o mediante electroporación. La transformación de organismos eucarióticos inferiores tales como células de levaduras en cultivo mediante absorción directa se puede llevar a cabo mediante por ejemplo el uso del procedimiento de Hinnen y col., (Proc. Natl. Acad. Sci. 1978, 75: 1929-1933). Las células de mamíferos en cultivo se pueden transformar usando la coprecipitación del fosfato cálcico del DNA vector en las células (Graham & Van der Eb, Virology 1978, 52, 546). Otros procedimientos para la introducción de polinucleótidos en células de



mamíferos incluyen la transfección mediada por dextrano, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación, encapsulación del (de los) polinucleótido (s) en los liposomas, y la microinyección directa de los polinucleótidos en los núcleos.

La invención también se extiende a una célula hospedadora transformada con un ácido nucleico que codifica la proteína de la invención en un vector de expresión replicable de la invención.

El cultivo de la célula hospedadora transformada que permiten la expresión del polímero de DNA se lleva a cabo convencionalmente, como se describe, por ejemplo, en Maniatis y col., y "DNA cloning" citados anteriormente. De este modo, preferiblemente a la célula se la suministra un nutriente y se cultiva a una temperatura inferior a 50°C, preferiblemente entre 25°C y 42°C, más preferiblemente entre 25°C y 35°C, y más preferiblemente a 30°C. El tiempo de incubación puede variar entre unos pocos minutos y unas pocas horas, según la proporción del polipéptido en la célula bacteriana, según se aprecia mediante SDS – PAGE o transferencia de Western.

El producto se puede recuperar mediante procedimientos convencionales según la célula hospedadora y según la localización del producto de expresión (intracelular o secretada en el medio de cultivo o en el periplasma celular). De este modo, cuando la célula hospedadora es bacteriana, tal como *E. coli* puede, por ejemplo, lisarse físicamente, químicamente o enzimáticamente y el producto de la proteína aislarse a partir del lisado resultante. Cuando la célula hospedadora es de un mamífero, generalmente el mamífero se puede aislar a partir del medio nutriente o a partir de extractos exentos de células.

Cuando la célula hospedadora es una levadura tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*, generalmente el producto se puede aislar a partir de células lisadas o a partir del medio de cultivo, y después purificarse adicionalmente usando técnicas convencionales. La especificidad del sistema de expresión se puede valorar mediante las transferencias de Western o mediante ELISA usando un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de interés.

Las técnicas de aislamiento de proteínas convencionales incluyen precipitación selectiva, cromatografía de adsorción y cromatografía de afinidad que incluye una columna de afinidad de anticuerpos monoclonal. Cuando las proteínas de la presente invención se expresan con una cola de histidina (señal His) se pueden purificar fácilmente mediante cromatografía de afinidad que usa una columna de afinidad de iones metálicos (abreviadamente IMAC). El ión metálico puede ser cualquier ión adecuado por ejemplo cinc, níquel, hierro, magnesio o cobre, pero es preferible cinc o níquel. Preferiblemente el tampón IMAC contiene detergente, preferiblemente un detergente aniónico tal como SDS, más preferiblemente un detergente no iónico tal como Tween 80, o un detergente bipolar tal como Empigen BB, ya que esto puede dar como resultado niveles más bajos de endotoxina en el producto final.

Las etapas cromatográficas adicionales incluyen por ejemplo una etapa de Q – Sepharose que se puede llevar a cabo bien antes o después de la columna IMAC. Preferiblemente el pH está en el intervalo entre 7,5 y 10, más preferiblemente entre 7,7 y 9,5, óptimamente entre 8 y 9.

De este modo, las proteínas de la invención se pueden purificar según el siguiente

protocolo. Después de la ruptura de celular, los extractos celulares que contienen la proteína se pueden solubilizar en un tampón Tris pH 8,5 que contiene urea (8,0 M por ejemplo) y SDS (entre 0,5 y 1% por ejemplo). Después de centrifugación el sobrenadante resultante se puede cargar en una columna de Sepharose FF de IMAC (níquel) equilibrada con un tampón Tris pH 8,5. Después la columna se puede lavar con un tampón que contiene una alta concentración de sal (por ejemplo, NaCl 0,75 – 1,5 M, tampón Tris 15 mM pH 8,5). Opcionalmente la columna se puede lavar otra vez con tampón fosfato sin sal. Las proteínas de la invención se pueden eluir de la columna con solución tamponada que contiene imidazol. Después las proteínas se pueden someter a una etapa adicional de cromatografía, tal como una cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, Sepharose Q).

Las proteínas de la presente invención se proporcionan bien solubles en forma líquida o en forma liofilizada, que es la forma preferida. Generalmente se espera que cada dosis humana comprenda entre 1 y 1000 µg de proteína y preferiblemente entre 30 y 300 µg. El procedimiento de purificación puede también incluir una etapa de carboxiamidación en la que la proteína primero se reduce en presencia de glutatión y después se carboximetila en presencia de yodoacetamida. Esta etapa ofrece la ventaja de controlar la agregación oxidante de la molécula consigo misma o con los contaminante de la proteína de la célula hospedadora a través de un puente covalente con enlaces disulfuro.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas e inmunogénicas que comprenden una proteína de la presente invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Una composición de vacuna preferida comprende al menos una proteína según la invención. Preferiblemente dicha proteína tiene grupos

tioles bloqueados y está altamente purificada, por ejemplo, tiene menos de 5% de contaminación de la célula hospedadora. Dicha vacuna puede opcionalmente contener uno o más otros antígenos asociados a tumores y derivados. Por ejemplo, otro antígeno asociado adecuado incluye próstata, PAP – 1, PSA (antígeno específico de próstata), PMSA (antígeno de membrana específico de próstata), PSCA (antígeno de células madre de próstata), STEAP.

En otra realización, las composiciones ilustrativas inmunogénicas, tales como por ejemplo composiciones de vacunas, de la presente invención comprenden DNA que codifica uno o más de los polipéptidos de fusión como se ha descrito anteriormente, de manera que el polipéptido de fusión se genera *in situ*. Como se ha indicado anteriormente, el polinucleótido se puede administrar en una diversidad de sistemas de administración conocidos por los expertos en la técnica. Sin duda, se conocen bien en la técnica numerosas técnicas de liberación génica, tales como las descritas por Rolland, *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Systems* 15:143-198, 1998, y las referencias citadas en dicho documento. Por supuesto, los sistemas de expresión de polinucleótidos adecuados contienen las secuencias reguladoras de DNA necesarias para la expresión en un paciente (tales como un promotor adecuado y señal de terminación). Alternativamente, los sistemas de administración bacterianos pueden implicar la administración de una bacteria (tal como *Bacillus-Calmette-Guerrin*) que expresa una porción inmunogénica del polipéptido en su superficie celular o que secreta dicho epítipo.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos inmunogénicos descritos en esta memoria descriptiva se introducen en células hospedadoras de mamíferos adecuadas para expresión usando cualquiera de los

numerosos sistemas a base de virus conocidos. En una realización ilustrativa, los retrovirus proporcionan una plataforma conveniente y eficaz de sistemas de administración génica. Una secuencia de nucleótidos seleccionada que codifica un polipéptido de la presente invención se puede insertar en un vector y empaquetarse en partículas retrovirales usando tecnologías conocidas en la técnica. Después el virus recombinante se puede aislar y administrar a un sujeto. Se han descrito numerosos sistemas ilustrativos retrovirales (por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5,219,740; Miller y Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa y col., (1991) *Virology* 180:849-852; Burns y col., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; y Boris-Lawrie y Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109.

Además, también se han descrito numerosos sistemas ilustrativos a base de adenovirus. A diferencia de los retrovirus que se integran en el genoma hospedador, los adenovirus persisten extracromosómicamente minimizando de esta manera el riesgo asociado con la mutagénesis insercional (Haj-Ahmad y Graham (1986) *J. Virol.* 57:267-274; Bett y col., (1993) *J. Virol.* 67:5911-5921; Mittereder y col., (1994) *Human Gene Therapy* 5:717-729; Seth y col., (1994) *J. Virol.* 68:933-940; Barr y col., (1994) *Gene Therapy* 1:51-58; Berkner, K. L. (1988) *BioTechniques* 6:616-629; y Rich y col., (1993) *Human Gene Therapy* 4:461-476). Ya que los seres humanos se infectan a veces con serotipos de adenovirus humanos comunes tales como AdHu5, una proporción significativa de la población tiene una respuesta de anticuerpos neutralizadora al adenovirus, que probablemente efectúa la respuesta inmune a un antígeno heterólogo en un sistema a base de vacunas recombinante. Los vectores adenovirales de primates no humanos tales como el adenovirus 69 de chimpancé (AdC68, Fitzgerald y col., (2003) *J. Immunol*

170(3):1416-22)) pueden ofrecer un sistema adenoviral alternativo sin la desventaja de una respuesta de anticuerpo neutralizante preexistente.

Se han desarrollado también diversos virus asociados a adenovirus (abreviadamente AAV) para la administración de polinucleótidos. Los vectores AAV se pueden construir fácilmente usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5,173,414 y 5,139,941; las publicaciones internacionales números WO 92/01070 y WO 93/03769; Lebkoski y col., (1988) *Molec. Cell. Biol.* 8:3988-3996; Vincent y col., (1990) *Vaccines 90* (Cold Spring Harbor Laboratory Press); Carter, B. J. (1992) *Current Opinion in Biotechnology* 3:533-539; Muzyczka, N. (1992) *Current Topics in Microbiol. and Immunol.* 158:97-129; Kotin, R. M. (1994) *Human Gene Therapy* 5:793-801; Shelling and Smith (1994) *Gene Therapy* 1:165-169; and Zhou y col., (1994) *J. Exp. Med.* 179:1867-1875.

Los vectores virales adicionales útiles para la administración de moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la presente invención mediante transferencia génica incluyen los derivados de la familia del virus de la viruela, tales como virus de vaccinia y poxvirus aviar. Como ejemplo, los recombinantes de virus de vaccinia que expresan las moléculas nuevas se pueden construir como sigue. Primero el DNA que codifica un polipéptido se inserta en un vector adecuado de manera que sea adyacente a un promotor de vaccinia y a secuencias de DNA flanqueantes de vaccinia, tales como la secuencia que codifica la timidinaquinasa (abreviadamente TK). Después este vector se usa para transfectar células que se infectan simultáneamente con vaccinia. La recombinación homóloga sirve para insertar el promotor de vaccinia más el gen que codifica el polipéptido de interés en el genoma viral. El recombinante TK.sup-(-)

resultante se puede seleccionar mediante el cultivo de las células en presencia de 5-bromodesoxiuridina y recogiendo las placas virales restantes del mismo.

Un sistema de infección/transfección a base de vaccinia se puede usar convenientemente para proporcionar expresión o coexpresión inducible y transitoria de uno o más polipéptidos descritos en esta memoria descriptiva en células hospedadoras de un organismo. En este sistema particular, primero las células se infectan *in vitro* con un recombinante de virus de vaccinia que codifica la RNAPolimerasa del bacteriófago T7. Esta polimerasa muestra una especificidad exquisita porque solamente transcribe moldes que soportan promotores T7. Después de la infección, se transfectan las células con el polinucleótido o polinucleótidos de interés, conducidos por un promotor T7. La polimerasa expresada en el citoplasma del recombinante del virus de vaccinia transcribe el DNA trasfectado en RNA que después se traduce en un polipéptido mediante la maquinaria traductora del hospedador. El procedimiento proporciona una producción de alto nivel, transitoria y citoplásmica de grandes cantidades de RNA y sus productos de traducción. Véase por ejemplo, Elroy-Stein y Moss, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990) 87:6743-6747; Fuerst y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:8122-8126.

Alternativamente, los virus de la viruela aviar, tales como los virus de la viruela de las aves de corral y de la viruela de canarios, también se pueden usar para administrar las secuencias de codificación de interés. Se sabe que los virus de la viruela aviar recombinantes, que expresan inmunogenes de patógenos mamíferos, confieren inmunidad protectora cuando se administran a especies no aviares. El uso de un vector Avipox (viruela aviar) se desea particularmente en seres humanos y otras especies de mamíferos ya que los miembros del género Avipox (la viruela aviar) solamente se

pueden replicar productivamente en especies aviares susceptibles y por lo tanto no son infecciosos en células de mamíferos. Los procedimientos para producir virus de la viruela aviar se conocen en la técnica y emplean recombinación genética, como se ha descrito anteriormente con respecto a la producción de virus de vaccinia. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 91/12882; WO 89/03429; y WO 92/03545.

Cualquiera de los numerosos vectores alfavirus se pueden utilizar para la administración de composiciones de polinucleótidos de la presente invención, tales como los vectores descritos en las patentes de Estados Unidos números 5,843,723; 6,015,686; 6,008,035 y 6,015,694. También se pueden usar ciertos vectores basados en la encefalitis equina venezolana (abreviadamente VEE), los ejemplos ilustrativos de éstos se pueden encontrar en las patentes de Estados Unidos números 5,505,947 y 5,643,576.

La composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante numerosas vías tales como intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente o intravenosamente.

En otra realización de la invención, se dispensa/administra un polinucleótido en forma de DNA "desnudo", por ejemplo como se describe en Ulmer y col., *Science* 259:1745-1749, 1993 y revisado por Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. La absorción de DNA desnudo se puede incrementar mediante la aplicación de DNA como un recubrimiento en perlas biodegradables, que se transportan eficazmente en las células. En una realización preferida, la composición se administra intradérmicamente. En particular, la composición se administrar mediante técnicas de administración de pistola génica (en particular bombardeo de partículas) que implican el recubrimiento del vector en una



perla (por ejemplo oro) que se administran después a alta presión en la epidermis; como, por ejemplo, se describe en Haynes y col., J Biotechnology 44: 37-42 (1996).

En un ejemplo ilustrativo, la aceleración de partículas accionada por gas se puede llevar a cabo con dispositivos tales como los fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, UK) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales se describen en las patentes de Estados Unidos números 5,846,796; 6,010,478; 5,865,796; 5,584,807; y la patente de EP N° 0500 799. Este planteamiento ofrece un método de administración sin aguja en el que una formulación de polvo seco de partículas microscópicas, tal como un polinucleótido, se aceleran a alta velocidad en un chorro de gas de helio generado por un dispositivo manual, que impulsa las partículas a un tejido diana de interés, típicamente la piel. Preferiblemente las partículas son perlas de oro encerradas en un cartucho o módulo para colocarlas en el "cañón de genes".

En una realización relacionada, otros dispositivos y procedimientos que pueden ser útiles para la inyección sin aguja accionada por gas de composiciones de la presente invención incluyen los proporcionados por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos ejemplos de los cuales se describen en las patentes de Estados Unidos números 4,790,824; 5,064,413; 5,312,335; 5,383,851; 5,399,163; 5,520,639 y 5,993,412.

Para el componente inmunogénico que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el péptido antigénico es posible que se administre de una vez o que se administre repetidamente, por ejemplo, entre 1 y 7 veces, preferiblemente entre 1 y 4 veces, a intervalos entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 18 meses. Sin embargo, este régimen de tratamiento variará significativamente dependiendo del

tamaño del paciente, la enfermedad que se está tratando/previniendo, la cantidad de secuencia de nucleótido administrada, la vía de administración y otros factores que serán evidentes para el profesional sanitario experto.

Por consiguiente otro aspecto de la presente invención es proporcionar el uso de una proteína o DNA que codifica dichas proteína, como se describe en esta memoria descriptiva en la fabricación de una composición inmunogénica para inducir una respuesta en un paciente. Preferiblemente la respuesta inmune se va a inducir mediante administración secuencial de i) dicha proteína seguido de dicha secuencia de DNA; o ii) dicha secuencia de DNA seguido de dicha proteína. Más preferiblemente la secuencia de DNA se recubre en perlas biodegradables o se administra mediante un método de bombardeo de partículas. Todavía más preferiblemente la proteína con adyuvantes, preferiblemente adyuvante inductor de TH – 1, preferiblemente con una formulación de adyuvante a base de CpG/Qs21.

Los vectores que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican péptidos antigénicos se administran en tal cantidad que sean profiláctica o terapéuticamente eficaces. La cantidad a administrar está generalmente en el intervalo entre un picogramo y 16 miligramos, preferiblemente entre 1 picogramo y 10 microgramos para administración mediada por partículas y entre 10 microgramos y 16 microgramos para otras vías de nucleótidos por dosis. La cantidad exacta puede variar considerablemente dependiendo del peso del paciente que se está inmunizando y la vía de administración.

Las técnicas adecuadas para introducir el polinucleótido o vector desnudo en un paciente también incluye la aplicación tópica con un vehículo apropiado. El ácido

nucleico se puede administrar tópicamente a la piel, o a las superficies mucosas por ejemplo, mediante administración intranasal, oral, intravaginal o intrarrectal. El vector o polinucleótido desnudo puede estar presente junto con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato (abreviadamente PBS). La absorción de DNA se puede adicionalmente facilitar mediante el uso de agentes que lo facilitan tales como bupivacaína, bien separadamente o incluida en la formulación de DNA. Otros procedimientos para administrar el ácido nucleico a un receptor incluyen ultrasonidos, estimulación eléctrica, electroporación y microsiembra que se describe en el documento de Estados Unidos 5,697,901.

La absorción de las construcciones de ácido nucleico se pueden potenciar mediante diversas técnicas de transfección conocidas, por ejemplo las que incluyen el uso de agentes de transfección. Los ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo, fosfato cálcico y DEAE – dextrano y lipofectantes, por ejemplo lipofectam y trasfectam. Se puede alterar la dosificación del ácido nucleico a administrar.

Las proteínas de fusión y polipéptidos codificadores según la invención se pueden también formular en forma de una composición farmacéutica/inmunogénica, por ejemplo como una vacuna. Por lo tanto según el caso, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica/inmunogénica que comprende una proteína de fusión de la presente invención en un excipiente farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, también se proporciona un procedimiento para la preparación de una composición inmunogénica según la presente invención, que comprende la mezcla de la proteína de fusión de la invención o el polinucleótido de codificación con un adyuvante, diluyente u otro vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.

Las proteínas de fusión de la presente invención se proporcionan al menos 80% puras más preferiblemente 90% puras según se visualiza mediante SDS PAGE. Preferiblemente las proteínas aparecen como una banda única mediante SDS PAGE.

En general la preparación de vacunas se describe en Vaccine Design ("The subunit and adjuvant approach" (eds. Powell M.F. y Newman M.J). (1995) Plenum Press New York). La encapsulación con liposomas se describe en Fullerton, Patente de Estados Unidos 4,235,877.

Preferiblemente, a las proteínas de fusión de la presente invención y a los polipéptidos codificadores se les añaden adyuvantes en la formulación de vacuna de la invención. Ciertos adyuvantes están comercialmente disponibles como, por ejemplo, el adyuvante incompleto y el adyuvante completo de Freund (Difco Laboratories, Detroit, MI); adyuvante 65 de Merck (Merck and Company, Inc., Rahway, NJ); AS-2 (SmithKline Beecham, Philadelphia, PA); las sales de aluminio tales como el gel de hidróxido de aluminio (alumbre) o fosfato de aluminio; las sales de calcio, hierro cinc; una suspensión insoluble de tirosina acilada; azúcares acilados; polisacáridos catiónica o aniónicamente derivatizados; polifosfacenos; microsferas biodegradables; monofosforil lípido A y quil A. También se pueden usar como adyuvante las citoquinas tales como GM-CSF, interleuquina - 2, -7, -12, y otros factores de crecimiento similares.

Con ciertas realizaciones de la invención, la composición de adyuvantes es preferiblemente una que induce una respuesta inmune predominantemente del tipo Th 1. Altos niveles de citoquinas de tipo Th 1 (por ejemplo, IFN- γ , TNF α , IL-2 e IL-12)

tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes mediadas por células a un antígeno administrado. En contraste, altos niveles de citoquinas de tipo Th2 (por ejemplo, IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10) tienden a favorecer la inducción de respuestas inmunes humorales. Después de la aplicación de una vacuna como se proporciona en esta memoria descriptiva, un paciente soportará una respuesta inmune que incluye respuestas de tipo Th1- y de tipo Th2. En una realización preferida, en la que predominantemente la respuesta es del tipo Th1, el nivel de las citoquinas de tipo Th1 se incrementará hasta un grado mayor que el nivel de las citoquinas de tipo Th2. Los niveles de estas citoquinas se pueden valorar fácilmente usando ensayos estándar. Para una revisión de las familias de citoquinas véase Mosmann y Coffman, Ann. Rev. Immunol. 7: 145 – 173, 1989.

Los adyuvantes preferidos que inducen TH – 1 se seleccionan del grupo de adyuvantes constituido por: 3D – MPL. QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, y un oligonucleótido CpG o una mezcla de dos o más de dichos adyuvantes. Ciertos adyuvantes preferidos para inducir una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, una combinación de lípido A monofosforilo, preferiblemente lípido A monofosforilo 3-de-O-acilado, junto con una sal de aluminio. Los adyuvantes MPL[®] están disponibles de Corixa Corporation (Seattle, WA; véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente Th1. Se conocen bien dichos oligonucleótidos y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y en las patentes de Estados Unidos números 6,008,200 y 5,856,462. Las secuencias de DNA inmunoestimuladoras también las describen, por ejemplo, Sato y

col., Science 273: 352, 1996. Otro adyuvante preferido comprende una saponina, tal como Quil A o derivados de la misma, que incluyen QS21 y QS 7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonina; o *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa saponins*. Otras formulaciones preferidas incluyen más de una saponina en las combinaciones de adyuvantes de la presente invención, por ejemplo, las combinaciones de al menos dos del siguiente grupo que comprende QS21, QS7, Quil A, escina β , o digitonina.

Alternativamente las formulaciones de saponina se pueden combinar con vehículos de vacunas compuestos de quitosana u otros polímeros policationicos, partículas de polilactida y polilactida – co – glicolida, matriz polimérica a base de poli-N-acetil glucosamina, partículas compuestas de polisacáridos o polisacáridos químicamente modificados, liposomas y partículas a base de lípidos, partículas compuestas de monoésteres de glicerol, etc. Las saponinas también se pueden formular en presencia de colesterol para formar estructuras de partículas tales como liposomas o ISCOMs. Además, las saponinas se pueden formular junto con un éter o éster de polioxietileno, bien en una solución o suspensión no particulada, o en una estructura particulada tal como un liposoma oligolamelar o ISCOM. Las saponinas también se pueden formular con excipientes tales como Carbopol^R para incrementar la viscosidad, o se pueden formular en forma de polvo seco con un excipiente en polvo tal como la lactosa.

En una realización preferida, el sistema adyuvante incluye la combinación de un lípido A monofosforilo y un derivado de saponina, tal como la combinación de adyuvante QS21 y 3D – MPL[®], como se describe en el documento WO 94/00153, o una composición de menor reacción en la que QS21 se inactiva con colesterol, como se

describe en WO 96/33739. Otras formulaciones preferidas comprenden una emulsión de aceite en agua y tocoferol. Otra formulación de adyuvante particularmente preferida que emplea el QS21, adyuvante 3D-MPL[®] y tocoferol en una emulsión aceite en agua se describe en el documento WO 95/17210.

Otro sistema adyuvante potenciado implica la combinación de un oligonucleótido que contiene CpG y un derivado de saponina particularmente la combinación de CpG y QS21 como se describe en el documento WO 00/09159 y en el documento WO 00/62800. Preferiblemente, la formulación adicionalmente comprende una emulsión de aceite en agua y tocoferol.

Todavía en otra realización adicional la presente invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una proteína de fusión según la invención, y que, además, comprende D3 – MPL, una saponina preferiblemente QS21 y un oligonucleótido CpG, formulada opcionalmente en una emulsión aceite en agua.

Los adyuvantes ilustrativos adicionales para uso en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen Montanide ISA 720 (Seppic, France), SAF (Chiron, California, Estados Unidos), ISCOMS (CSL), MF-59 (Chiron), la serie de adyuvantes SBAS (por ejemplo, SBAS-2 o SBAS-4, disponible de SmithKline Beecham, Rixensart, Bélgica), Detox (Enhancyn[®]) (Corixa, Hamilton, MT), RC-529 (Corixa, Hamilton, MT) y otros 4-fosfatos de glucosaminida de alquilo (abreviadamente AGP), tales como los descritos en la solicitud de patente de Estados Unidos pendiente números de serie 08/853,826 y 09/074,720 las descripciones de las cuales se incorporan en esta memoria descriptiva como referencia en su totalidad, y adyuvantes de éter de polioxietileno tales como los

descritos en el documento WO 99/52549A1.

Otros adyuvantes preferidos incluyen moléculas adyuvantes de fórmula general (I): $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$, en la que n es 1-50, A es un enlace o $-\text{C}(\text{O})-$, R es alquilo($\text{C}_1 - \text{C}_{50}$) o fenilalquilo($\text{C}_1 - \text{C}_{50}$). Una realización de la presente invención consiste en una formulación de vacunas que comprende un éter de polioxietileno de fórmula general (I), en la que n está 1 y 50, preferiblemente entre 4 y 24, más preferiblemente 9; el componente R es $\text{C}_1 - \text{C}_{50}$ preferiblemente alquilo($\text{C}_4 - \text{C}_{20}$) y más preferiblemente alquilo C_{12} , y A es un enlace. La concentración de los éteres de polioxietileno debe estar en el intervalo 0,1 – 20%, preferiblemente entre 0,1 y 10% y más preferiblemente en el intervalo entre 0,1 y 1%. Los éteres de polioxietileno preferidos se seleccionan del grupo siguiente: 9-lauriléter de polioxietileno, 9-esteariléter de polioxietileno, 8-esteariléter de polioxietileno, 4-lauriléter de polioxietileno, 35-lauriléter de polioxietileno y 23-lauriléter de polioxietileno. Los éteres de polioxietileno tales como lauriléter de polioxietileno se describen en el índice Merck (edición 12: entrada 7717). Estas moléculas de adyuvantes se describen en el documento WO 99/52549. El éter de polioxietileno según la fórmula general (I) anterior puede, si se desea, combinarse con otro adyuvante. Por ejemplo, una combinación preferida de adyuvantes es preferiblemente con CpG como se describe en la solicitud de patente de Reino Unido pendiente 9820956,2.

Una realización de la invención es que los antígenos, incluyendo el vector de ácido nucleico, de la invención se utilicen con un agente inmunoestimulador. Preferiblemente el agente inmunoestimulador se administra al mismo tiempo que los antígenos de la invención y en realizaciones preferidas se formulan juntos. Otra realización de la

invención es que el antígeno y el agente inmunoestimulador (o viceversa) se administren de forma secuencial en el mismo o sitios adyacentes, separados en tiempo por períodos entre 0 y 100 horas. Dichos agentes inmunoestimuladores incluyen pero no se limitan a: imidazoquinolinas sintéticas tales como el imiquimod [S - 26308, R - 837], (Harrison, y col., Vaccine 19: 1820-1826, 2001; y el resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, y col., Cellular immunology 204: 64-74, 2000.; bases de Schiff de carbonilos y aminas que se expresan constitutivamente en el antígeno que presenta superficies de células y de células T, tales como tucaresol (Rhodes, J. y col., Nature 377: 71-75, 1995), citoquina, quemoquina y moléculas coestimuladoras bien como proteína o como péptido, que incluyen por ejemplo citoquinas proinflamatorias tales como interferón, GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF- alfa y TGF - beta, inductores de Th1 tales como el interferón gamma, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otra quemoquina y genes coestimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 y CD40L, otros ligandos de diana inmunoestimuladores tales como CTLA-4 y selectina L, proteínas y péptidos estimuladores de apoptosis tales como Fas, (49), adyuvantes a base de lípidos sintéticos tales como el vaxfectin, (Reyes y col., Vaccine 19: 3778-3786, 2001) esqualeno, tocoferol alfa, polisorbato 80, DOPC y colesterol, endotoxina, [LPS], (Beutler, B., Current Opinion in Microbiology 3: 23-30, 2000); CpG oligo- y di-nucleótidos (Sato, Y. y col., Science 273 (5273): 352-354, 1996; Hemmi, H. y col., Nature 408: 740-745, 2000) y otros ligandos potenciales que inducen a los receptores Toll para que produzcan citoquinas inductoras de la Th1, tales como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, la proteína micobacteriana p19, peptidoglicano, ácido teicoico y un lípido A.

Otro adyuvante adecuado incluye CT (tóxina colérica, subunidades A y B) y LT (enterotoxina termolábil de *Ec coli*, subunidades A y B), la familia de proteínas de choque térmico (abreviadamente HPS) y LLO (listeriolisina O; documento WO 01/72329).

Cuando el agente inmunoestimulador es una proteína, el agente se puede administrar bien como una proteína o como un polinucleótido que codifica al proteína.

Otros sistemas de administración adecuados incluyen microesferas en las que el material antigénico se incorpora en o se conjuga con polímeros/microesferas biodegradables de forma que el material antigénico se puede mezclar con un vehículo farmacéutico adecuado y usarse como una vacuna. El término "microesferas" generalmente se emplea para describir partículas coloidales que son sustancialmente esféricas y tienen un diámetro en el intervalo entre 10 nm y 2 mm . Se ha encontrado que las microesferas hechas de un amplio rango de polímeros naturales y sintéticos tienen uso en una diversidad de aplicaciones médicas. Este sistema de administración es especialmente ventajoso para proteínas que tienen semividas cortas *in vivo* requiriendo múltiples tratamientos para proporcionar eficacia, o son inestables en fluidos biológicos o no se absorben totalmente en el tracto gastrointestinal debido a sus pesos moleculares relativamente altos. Se han descrito diversos polímeros como matriz para la liberación de proteínas. Los polímeros adecuados incluyen gelatina, colágeno, alginatos, dextrano. Los sistemas de administración preferidos incluyen poli(ácido láctico DL) (abreviadamente PLA), poli(lactida-co-glicolida) (abreviadamente PLG), poli(ácido glicólico) (abreviadamente PGA), poly(caprolactona) (abreviadamente PCL), y copolímeros poli(ácido láctico DL-co-glicólico) (abreviadamente PLGA). Otros

sistemas preferidos incluyen hidrogeles heterogéneos tales como copolímeros multibloque poli (éter éster) que contienen bloques de repetición a base de poli(etilenglicol) hidrófilo (abreviadamente PEG) y poli(tereftalato de butileno) hidrófobo (abreviadamente PBT), o tereftalato de poli(etilenglicol)/poli(tereftalato de butileno) (abreviadamente PEGT/PBT) (Sohier y col., Eur. J. Pharm y Biopharm, 2003, 55, 221-228). Se prefieren los sistemas que proporcionan una liberación mantenida durante 1 a 3 meses tales como PLGA, PLA y PEGT/PBT.

Es posible para la composición inmunogénica o de vacunas que se administre de una vez o, preferiblemente, que se administre repetidamente tantas veces como sea necesario, por ejemplo, entre 1 y 7 veces, preferiblemente entre 1 y 4 veces, a intervalos entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 18 meses, preferiblemente un mes. Opcionalmente a esto puede seguir una dosificación a intervalos regulares entre 1 y 12 meses durante un período hasta el resto de la vida del paciente. En una realización preferida, el paciente recibe el antígeno de diferentes maneras en un régimen de "cabado-refuerzo". Así por ejemplo, el antígeno, la proteína de fusión, se administra primero como una formulación a base de adyuvantes de proteínas y después se administran posteriormente en forma de una vacuna a base de DNA. Se prefiere este modo de administración. El adyuvante preferido es una combinación de un oligonucleótido que contiene CpG y un derivado de saponina, particularmente la combinación de CpG y QS21 como se describe en el documento WO 00/09159 y en el documento WO 00/62800. La absorción de DNA desnudo se puede potenciar mediante recubrimiento del DNA en perlas biodegradables, que son transportadas eficazmente en las células. Alternativamente el DNA se puede administrar mediante un método de bombardeo de partículas, por ejemplo, aceleración de partículas accionada por gas con

dispositivos tales como los fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, Reino Unido) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI) como se ha enseñado en esta memoria descriptiva. Este planteamiento ofrece un método de administración sin aguja en el que una formulación de polvo seco de partículas microscópicas, tales como partículas de polinucleótidos o de polipéptidos, se aceleran hasta una alta velocidad en un chorro de gas helio generado por un dispositivo manual, impulsando las partículas en el tejido diana de interés.

En otra realización preferida la vacuna a base de DNA se administrará primero, seguido de la formulación a base de adyuvantes de proteínas. Todavía en otra realización los autores se preocupan de la administración de la construcción de DNA mediante vectores de administración especializados, preferiblemente mediante los medios del sistema viral, más preferiblemente mediante los medios de los sistemas a base de adenovirus. Otros sistemas a base de virus adecuados de administración de DNA incluyen sistemas a base de retrovirus, lentivirus, virus asociados a adeno, virus del herpes y de virus de vaccinia.

En otra realización preferida, la formulación a base de adyuvantes de proteínas y vacunas a base de DNA se puede coadministrar en sitios adyacentes o de superposición. Dependiendo de la formulación de la vacuna de DNA, esto se puede llevar a cabo mediante la mezcla del DNA y formulaciones adyuvantes de proteínas antes de la administración o mediante la administración simultánea del DNA y formulación de adyuvantes de proteínas.

El régimen de tratamiento variará significativamente dependiendo del tamaño y especie

del paciente considerado, la cantidad de vacuna de ácidos nucleicos y / o composición de proteínas administrada, la vía de administración, la pureza y dosis de cualquier compuesto adyuvante usado y otros factores que serían aparentes para un experto profesional sanitario.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para estimular una respuesta inmune en un paciente, preferiblemente una respuesta de células T en un paciente humano, que comprende la administración de una composición farmacéutica descrita en esta memoria descriptiva. El paciente puede estar afligido con un cáncer de pulmón o colon o cáncer colorrectal o cáncer de mama, en cuyo caso los procedimientos proporcionan el tratamiento de la enfermedad o del paciente considerado con riesgo de dicha enfermedad para que se pueda tratar profilácticamente.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprende la administración a un paciente de una composición farmacéutica como se ha indicado anteriormente. El paciente puede estar afligido con, por ejemplo, sarcoma, cáncer de próstata, ovarios, vejiga, pulmón, colon, colorrectal o mama en cuyo caso los procedimientos proporcionan tratamiento de la enfermedad; o el paciente considerado con riesgo de dicha enfermedad, se pueda tratar profilácticamente.

Además la presente invención además también proporciona, en otros aspectos, procedimientos para eliminar células tumorales de una muestra biológica, que comprende poner en contacto una muestra biológica con células T que reaccionan específicamente con un polipéptido de la presente invención, en la que la etapa de

contacto se realiza en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la eliminación de las células que expresan la proteína de la muestra.

En aspectos relacionados, los procedimientos se proporcionan para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprende la administración a un paciente de una muestra biológica tratada como se ha descrito anteriormente.

Además los procedimientos se proporcionan, en otros aspectos, para estimular y/o expandir células T específicas de un polipéptido de la presente invención que comprende poner en contacto las células T con uno o más de: (i) un polipéptido como se ha descrito anteriormente; (ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y/o (iii) un antígeno que presenta células que expresan dicho polipéptido; en condiciones y durante un tiempo suficiente para que permita la estimulación y/o expansión de células T. También se proporcionan las poblaciones de células T aisladas que comprenden las células T preparadas como se ha descrito anteriormente.

En aspectos adicionales, la presente invención proporciona procedimientos para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente que comprende la administración a un paciente de una cantidad eficaz de una población de células T como se ha descrito anteriormente. Además la presente invención proporciona procedimientos para inhibir el desarrollo de un cáncer en un paciente, que comprende las etapas de: (a) incubar células CD4+ y/o CD8+ aisladas de un paciente con uno o más de: (i) un polipéptido descrito en esta memoria descriptiva; (ii) un polinucleótido que codifica dicho polipéptido; y (iii) una célula que presenta un antígeno que expresaba dicho polipéptido; y (b) administrar al paciente una cantidad eficaz de las células T multiplicadas y que, por lo tanto, inhiben el

desarrollo de un cáncer en el paciente. Las células proliferadas se pueden, pero no necesariamente, clonar antes de la administración al paciente.

Según otra realización de esta invención, una composición inmunogénica descrita en esta memoria descriptiva se administra a un hospedador mediante células (APCs) que presentan un antígeno, tales células dendríticas, macrófagos, células B, monocitos y otras células que se pueden modificar genéticamente para que sean eficaces APCs. Dichas células pueden, pero no es necesario, modificarse genéticamente para aumentar la capacidad de presentar el antígeno, con el fin de mejorar la activación y/o mantener la respuesta de las células T, para que tengan efectos antitumorales *per se* y/o que sean inmunológicamente compatibles con el receptor (es decir, igualado al halotipo HLA). En general las APCs se pueden aislar de cualquiera de una diversidad de fluidos y órganos biológicos, que incluyen tejidos tumorales y peritumorales y pueden ser células autólogas, alogénicas, singénicas o xenogénicas.

Ciertas realizaciones preferidas de la presente invención usan células dendríticas o progenitores de las mismas como células presentadoras de antígenos. Las células dendríticas son altamente potentes APCs (Banchereau y Steinman, Nature 392: 245 – 251, 1998) y han mostrado que son eficaces como un adyuvante fisiológico para inducir inmunidad profiláctica o terapéutica antitumoral (véase Timmerman y Levy, Ann. Rev. Med. 50: 507 – 529, 1999). En general, las células dendríticas se pueden identificar en función de su forma típica (estrellada *in situ*, con procesos (dendritas) citoplásmicos marcados visibles *in vitro*), su capacidad para recoger, procesar y presentar antígenos con alta eficacia y su capacidad para activar las respuestas de células T inexpertas. Por supuesto, las células dendríticas se pueden modificar genéticamente para expresar los

receptores superficiales de las células específicas o ligandos que no se encuentran comúnmente sobre las células dendríticas *in vivo* o *ex vivo*, y dichas células dendríticas modificadas se contemplan en la presente invención. Como alternativa a las células dendríticas, se pueden usar en una vacuna las células dendríticas de vesículas de secreción cargadas de antígenos (llamadas exosomas) (véase Zitvogel y col., Nature Med. 4: 594 – 600, 1998).

Las células dendríticas y progenitoras se pueden obtener de sangre periférica, tuétano de huesos, células infiltradas en tumores, células infiltradas en tejidos peritumorales, ganglios linfáticos, columna vertebral, piel, sangre del cordón umbilical o cualquier tejido o fluido adecuado. Por ejemplo, las células dendríticas se pueden diferenciar *ex vivo* añadiendo una combinación de citoquinas tales como GM - CSF, IL - 4, IL - 13 y/o THF a cultivos de monocitos recogidos de sangre periférica. Alternativamente, las células CD34 positivas recogidas de sangre periférica, sangre de cordón umbilical o tuétano de hueso se pueden diferenciar en células dendríticas mediante la adición a un medio de cultivo combinaciones de GM - CSF, IL - 3, THF , ligando CD40, LPS, ligando flt3 y/u otro (s) compuesto (s) que inducen diferenciación, maduración y proliferación de células dendríticas.

Las células dendríticas se catalogan convenientemente como células “inmaduras” y “maduras”, que permite una forma sencilla de discriminar entre dos fenotipos bien caracterizados. Sin embargo, esta nomenclatura no se debe construir para excluir todas las etapas intermedias posibles de diferenciación. Las células dendríticas inmaduras se caracterizan como APC con una alta capacidad para la absorción y procesamiento de antígenos y, que se correlaciona con la alta expresión del receptor Fc y receptor de

manosa. El fenotipo maduro se caracteriza típicamente por una expresión menor de estos marcadores, pero una alta expresión de moléculas superficiales celulares responsable de la activación de células T tales como MHC de clase I y clase II, moléculas de adhesión (por ejemplo CD54 y CD11) y moléculas coestimuladoras (por ejemplo, CD40, CD80, CD86 y 4-1BB).

Generalmente las APCs se pueden transfectar con un polinucleótido de la invención (o porción u otras variantes del mismo) de manera que el polipéptido codificado, o una porción inmunogénica del mismo se exprese en la superficie celular. Dicha transfección puede tener lugar *ex vivo*, y después se puede usar una composición farmacéutica que comprende dichas células transfectadas para propósitos terapéuticos como se describe en esta memoria descriptiva. Alternativamente, un vehículo de administración génica que dirige una célula dendrítica o que presenta otro antígeno se puede administrar a un paciente, dando como resultado la transfección que se produce *in vivo*. Por ejemplo, la transfección *in vivo* y *ex vivo* de células dendríticas generalmente se puede realizar usando cualquier procedimiento conocido en la técnica, tales como los descritos en el documento WO 97/14447 o el método de la pistola génica descrito por Mahvi y col., *Immunology and cell Biology* 75: 456 – 460, 1997. La carga de antígeno en las células dendríticas se puede llevar a cabo incubando las células dendríticas o células progenitoras con el polipéptido del tumor, DNA (desnudo o dentro de un vector de plásmido) o RNA; o con bacteria o virus recombinantes que expresan el antígeno (por ejemplo, vectores de vaccinia, virus de pollo, adenovirus o lentivirus). Antes de la carga, se puede conjugar covalentemente el polipéptido a una pareja inmunológica que proporciona un auxiliar de células T (por ejemplo una molécula de vehículo). Alternativamente, una célula dendrítica se puede someter a pulsos con una pareja

inmunológica no conjugada, separadamente o en presencia del polipéptido.

Definiciones

La invención también proporciona procedimientos para el análisis de secuencias de caracteres o cadenas, particularmente secuencias genéticas o secuencias de proteínas codificadas. Los procedimientos preferidos de análisis de secuencias incluyen, por ejemplo, los procedimientos de análisis de homología de secuencias, tal como el análisis de identidad y similitud, análisis de estructura de DNA, RNA y proteínas, conjunto de secuencias, análisis cladísticos, análisis de motivos de secuencias, determinación del cuadro de lectura abierta, llamada de bases de ácidos nucleicos, análisis de uso de codones, afinamiento de bases de ácidos nucleicos, y secuenciación de análisis de los picos del cromatograma.

Se proporciona un procedimiento computarizado para realizar la identificación de homología. Este procedimiento comprende las etapas de: proporcionar una primera secuencia de poli nucleótidos que comprende la secuencia de un polinucleótido de la invención en un medio legible en ordenador; y comparar dicha primera secuencia polinucleotídica con al menos una secuencia polinucleotídica o polipéptido para identificar la homología. También se proporciona un procedimiento computarizado para realizar la identificación de la homología, dicho procedimiento comprendiendo las etapas de: proporcionar una primera secuencia polipeptídica que comprende la secuencia de un polipéptido de la invención en un medio legible de ordenador; y comparar dicha primera secuencia polipeptídica con al menos una secuencia polinucleotídica o polipeptídica para identificar la homología.

“Identidad” como se conoce en la técnica, es una relación entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, como puede ser el caso, según se determina comparando las secuencias. En la técnica “identidad” también significa el grado de la relación de secuencias entre las secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, como puede ser el caso, según se determina por la coincidencia entre cadenas de dichas secuencias. La “Identidad” se puede calcular fácilmente mediante procedimientos conocidos, incluyendo pero no limitándose a los descritos en (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing: Informatics and Genome Projects*, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Parte I, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48: 1073 (1988). Los procedimientos para determinar la identidad se diseñan para conseguir la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Además, los procedimientos para determinar la identidad se codifican en programas de ordenador disponibles públicamente. Los procedimientos de programas de ordenador para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan al programa GAP en el paquete de programas GCG (Devereux, J., y col., *Nucleic Acids Research* 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN (Altschul, S.F. y col., *J. Molec. Biol.* 215: 403-410 (1990), y FASTA(Pearson y Lipman *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85; 2444-2448 (1988). La familia de programas BLAST está públicamente disponible de NCIB y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., y col., NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., y col., *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 (1990). También se puede utilizar para

determinar la identidad el bien conocido algoritmo de Smith Waterman.

Los parámetros para la comparación de secuencias de polipéptidos incluyen lo siguiente:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: BLOSSUM62 de Henikoff y Henikoff,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992)

Penalización de la ausencia: 8

Penalización de longitud de la ausencia: 2

Un programa útil con estos parámetros está públicamente disponible como el programa "ausencia" de Genetics Computer Group, Madison WI. Los parámetros anteriormente mencionados son los parámetros de omisión de comparaciones de péptidos (junto con ninguna penalización para las ausencias del extremo)

Los parámetros para la comparación de polipéptidos incluyen lo siguiente:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48: 443-453 (1970)

Matriz de comparación: coincidencias = + 10, no coincidencias = 10

Penalización de la ausencia: 50

Penalización de longitud de la ausencia: 3

Disponible como: el programa "ausencia" de Genetics Computer Group, Madison WI.

Estos son los parámetros de omisión de las comparaciones de ácidos nucleicos.

Un significado preferente de "identidad" de polinucleótidos y polipéptidos, como puede ser el caso, se proporcionan en (1) y (2) a continuación.

(1) Además las realizaciones de polinucleótidos incluyen un polinucleótido que comprende una secuencia polinucleotídica que tiene al menos 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95,

97 ó 100% de identidad con cualquiera de las secuencias de referencia de SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16, en las que dicha secuencia polinucleotídica puede ser idéntica a cualquiera de las secuencias de referencia de SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de nucleótidos comparada con la secuencia de referencia, en la que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una supresión, sustitución de nucleótidos, que incluye la transición y transversión, o inserción, y en la que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia de nucleótidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, interespaciadas bien individualmente entre los nucleótidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos con la secuencia de referencia y en la que dicho número de alteraciones de nucleótidos se determina multiplicando el número total de nucleótidos en cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16 por un número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de nucleótidos en cualquiera de las SEC ID N° 9 a SEC ID N1 16, ó:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que n_n es el número de alteraciones de nucleótidos, x_n es el número total de nucleótidos en cualquiera de las SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16, y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,97 para 97% ó 1,00 para 100%, y $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea hacia abajo al número más próximo entero antes de restarlo de x_n . Las alteraciones de las secuencias de polinucleótidos que codifican los polipéptidos de cualquiera de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8 puede crear mutaciones sin sentido, de sentido erróneo o de desplazamiento de fase en esta secuencia de codificación y por lo tanto altera el polipéptido codificado por

polinucleótido que sigue a dichas alteraciones.

Como ejemplo, una secuencia polinucleotídica de la presente invención puede ser idéntica a cualquiera de las secuencias de referencia de SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16 que puede ser 100% idéntico, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de ácidos nucleicos comparada con la secuencia de referencia de manera que el porcentaje de identidad es inferior al 100% de identidad. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una supresión, sustitución de ácidos nucleicos, que incluye transición y transversión, o inserción y en la que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones terminales 5' ó 3' de la secuencia polinucleotídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, interespaciadas bien individualmente entre los ácidos nucleicos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos con la secuencia de referencia. El número de alteraciones de ácidos nucleicos para un porcentaje de identidad establecido se determina multiplicando el número total de ácidos nucleicos en cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16 por un número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos en cualquiera de las SEC ID N° 9 a SEC ID N1 16, ó:

$$n_n \leq x_n - (x_n \cdot y),$$

en la que n_n es el número de alteraciones de ácidos nucleicos, x_n es el número total de ácidos nucleicos en cualquiera de las SEC ID N° 9 a SEC ID N° 16, y es por ejemplo 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, etc., $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de x_n e y se redondea hacia abajo al número más próximo entero antes de restarlo de x_n .

(2) Además las realizaciones de polipéptidos incluyen un polipéptido aislado que comprende una polipéptido que tiene al menos 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97 ó 100% de identidad con la secuencia de referencia de polipéptidos de cualquiera de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8, en las que dicha secuencia polipeptídica puede ser idéntica a cualquiera de las secuencias de referencia de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8 o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia, en la que dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una supresión, sustitución de aminoácidos, que incluye una sustitución conservadora y no conservadora, o inserción y en la que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones terminales amino o carboxi de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, interespaciadas bien individualmente entre los aminoácidos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos con la secuencia de referencia y en la que dicho número de alteraciones de aminoácidos se determina multiplicando el número total de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8 por un número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de aminoácidos en cualquiera de las SEC ID N° 1 a SEC ID N1 8, ó:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en cualquiera de las SEC ID N° 2, y es 0,50 para 50%, 0,60 para 60%, 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, 0,90 para 90%, 0,95 para 95%, 0,97 para 97% ó 1,00 para 100%, y $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de x_a e y se redondea hacia abajo al número más próximo entero antes de restarlo de x_a .

Como ejemplo, una secuencia polipeptídica de la presente invención puede ser idéntica a cualquiera de las secuencias de referencia de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8 que puede ser 100% idéntico, o puede incluir hasta un cierto número entero de alteraciones de aminoácidos comparada con la secuencia de referencia de manera que el porcentaje de identidad es inferior al 100% de identidad. Dichas alteraciones se seleccionan del grupo constituido por al menos una supresión, sustitución de aminoácidos, que incluye una sustitución conservadora y no conservadora, o inserción y en la que dichas alteraciones pueden producirse en las posiciones terminales amino o carboxi de la secuencia polipeptídica de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, interespaciadas bien individualmente entre los aminoácidos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos con la secuencia de referencia. El número de alteraciones de aminoácidos para un porcentaje de identidad establecido se determina multiplicando el número total de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8 por un número entero que define el porcentaje de identidad dividido por 100 y después restando ese producto de dicho número total de ácidos nucleicos en cualquiera de las SEC ID N° 1 a SEC ID N1 8, ó:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot y),$$

en la que n_a es el número de alteraciones de aminoácidos, x_a es el número total de aminoácidos en cualquiera de las SEC ID N° 1 a SEC ID N° 8, y es por ejemplo 0,70 para 70%, 0,80 para 80%, 0,85 para 85%, etc., $\cdot$ es el símbolo del operador de multiplicación, y en la que cualquier producto no entero de x_a e y se redondea hacia abajo al número más próximo entero antes de restarlo de x_a .

Leyendas de las figuras

Figura 1: Información de la secuencia de C-LytA. Cada repetición se ha definido en base a tanto la alineación de las secuencias múltiples como a la predicción de las secuencias secundarias usando los siguientes programas de alineación: 1) MatchBox (Depiereux E y col., (1992) Comput Applic Biosci 8:501-9); 2) ClustalW (Thompson JD y col., (1994) Nucl Acid Res 22:4673-80); 3) Block-Maker (Henikoff S et al (1995) Gene 163:gc17-26)

Figura 2: CPC y construcciones nativas (SEC ID N° 27-36)

Figura 3: Estructura esquemática de la proteína de fusión CPC-p501 His expresada en *S. cerevisiae*

Figura 4: Estructura primaria de la proteína de fusión CPC-P501 His (SEC ID N° 41)

Figura 5: Secuencia de nucleótidos de CPC P501 His (pRIT15201) (SEC ID N° 42)

Figura 6: Estrategia de clonación para la generación del plásmido pRIT 15201

Figura 7: Mapa del plásmido de pRIT15201

Figura 8. Expresión comparativa de CPC P501 y P501 en *S.cerevisiae* cepa DC5

Figura 9: Producción de CPC-P501S HIS (Y1796) a pequeña escala. La Fig. 9A representa al productividad de antígenos estimada por SDS-PAGE con tinción con plata; La Fig. 9B representa la productividad de antígenos estimada por las transferencias de Western.

Figura 10: Esquema de purificación de CPC-P501-His producida por Y1796.

Figura 11: Patrón de la proteína purificada CPC P501 His (geles de poliacrilamida premoldeados 4-12% de Novex Nu-Page).

Figura 12: Secuencia P501S de longitud completa nativa (SEC ID N° 17)

Figura 13: Secuencia del módulo de expresión CPC-P501S de JNW735 (SEC ID N° 18)

Figura 14: Dos secuencias P501S optimizadas de codones (SEC ID N° 19-20)

Figura 15: Secuencia optimizada de codones remodeladas genéticamente 19 (SEC ID N°

21)

Figura 16: Secuencia optimizada de codones remodeladas genéticamente 20 (SEC ID N° 22)

Figura 17: La secuencia de partida para la optimización de CPC (SEC ID N° 23)

Figura 18: Secuencias CPC optimizadas de codones representativas (SEC ID N° 24-25)

Figura 19: Secuencia optimizada de codones CPC modificado genéticamente (SEC ID N° 26)

Figura 20: Secuencias y construcciones candidatas de fusión P501S CPC (SEC ID N° 37-40 y 45-48)

Figura 21: Análisis de transferencias de Western de células CHO seguido de transición transitoria con P501S (JNW680), CPC-P501S (JNW735) y control de vector vacío.

Figura 22: Respuestas de anticuerpos de Anti-P501S seguido de inmunización los días 0, 21 y 42 con pVAC-P501S (JNW680, ratones B1-9) o vector vacío (pVAC, ratones A1-6). Se hizo un presangrado en el día -1. Posteriormente se hicieron sangrados en los días 28 y 49 (ratones A1-3, B1-3) y día 56 (ratones A4-6, B4-9). Todos los sueros se ensayaron a dilución 1/100. Se promediaron los resultados de los ratones inmunizados con pVAC – P501S. Se muestran los resultados promediados de los ratones inmunizados con pVAC – P501S. Como control positivo, se incluyen sueros de ratones inmunizados con adeno – P501S (Corixa, Corp, diluidos 1/100).

Figura 23: Análisis de biblioteca de péptidos que usan ratones C57BL/6 inmunizados los días 0, 21, 42, y 70 con pVAC-P501S (JNW680). Todos los péptidos se usaron a una concentración final de 50µg/ml. Los péptidos 1-50 15-20meros solapantes obtenidos de Corixa. Los péptidos 51 – 70 son epítomos 8 – 9meros Kb y Db previstos y se pidieron a Mimotopos (Reino Unido). Las muestras 71 - 72 y 73 – 78 son controles DMSO y controles sin péptidos respectivamente. El gráfico A muestra las respuestas de IFN-γ

mientras que el gráfico B muestra las respuestas de IL-2. Los péptidos seleccionados para uso en inmunoensayos posteriores se muestran en negro.

Figura 24: Respuestas celulares mediante ELISPOT el día 77 seguido de inmunización con PMID los días 0, 21, 42, y 70 con pVAC-P501S (JNW680, B6-9) y pVAC vacío (A4-6). Los péptidos 18, 22 y 48 se usaron a 50µg/ml. La proteína CPC-P501S se usó a 20µg/ml. El gráfico A muestra las respuestas de IFN-γ mientras que el gráfico B muestra las respuestas de IL-2.

Figure 25: Comparación de P501S y CPC-P501S. Las respuestas celulares se midieron mediante IL-2 ELISPOT usando el péptido 22 (10µg/ml) el día 28. Los ratones se inmunizaron con PMID el día 0 y 21 con pVAC vacío (control), pVAC-P501S (JNW680) y CPC-P501S (JNW735).

Figura 26: Respuesta inmune (linfoproliferación en células de bazo) seguido de inmunización de proteínas con CPC-P501S.

Figura 27: Evaluación de la respuesta inmune a diferentes construcciones CPC-P501S. Las respuestas celulares se midieron mediante IL-2 ELISPOT el día 28. Los ratones se inmunizaron mediante PMID el día 0 y 21 con p 7313-ie vacío (control), JNW735 y construcciones de CPC-P501S (JNW770, 771 y 773)

Figura 28: Secuencias MUC-1 CPC (SEC ID N° 49 y 50)

Figura 29: Secuencias ss-CPC-MUC-1 (SEC ID N° 51 y 52)

Adicionalmente la invención se describirá por referencia a los siguientes ejemplos:

EJEMPLO I: Preparación de la cepa de levadura recombinante Y1796 que expresa la proteína de fusión P501 que contiene un C-LytA-P2-C-LytA (CPC) como pareja de fusión

1.- Diseño de proteínas

La estructura de la proteína de fusión C-P2-C-p501 (alternativamente denominado CPC-P501) que se va a expresar en *S. cerevisiae* se muestra en la figura 3. Esta fusión contiene la región extremo C del gen *LytA* (restos 187 – 306) en la que se ha insertado el fragmento P2 de la toxina de tétanos (restos 830 – 843). El fragmento P2 se sitúa entre los restos 277 y 278 de C-Lyt-A- Al fragmento C-lytA que contiene la inserción P2 le sigue P501 (restos de aminoácidos 51 a 553) y la cola His.

La estructura primaria de la proteína de fusión resultante tiene la secuencia descrita en la figura 4 y la secuencia de codificación que corresponde al diseño de proteínas anterior se muestra en la figura 5.

2.- Estructura de clonación para la generación de un plásmido de levaduras que expresa la proteína de fusión CPC-P501 (51-553)-His

- El material de partida es el vector de levaduras pRIT15068 (solicitud de patente de Reino Unido 0015619,0).
- Este vector contiene el promotor de levaduras *Cup1*, la secuencia de codificación de la señal prepro alfa de levaduras y la secuencia de codificación correspondiente a los restos 55 – 553 de P501S seguido de la cola His.
- La estrategia de clonación indicada en la figura 6 incluye las siguientes etapas:
 - a) La primera etapa es la inserción de la secuencia P2 (optimización de codones para expresión de levaduras) en cuadro, dentro de la secuencia de codificación

C-lytA. La secuencia de codificación C-lytA. La secuencia de codificación C-lytA se encubre por el plásmido pRIT 14662 (PCT/EP99/00660). La inserción se hace usando un adaptador formado por dos oligonucleótidos complementarios llamados P21 y P22 en el plásmido pRIT 14662 previamente abierto por NcoI. La secuencia de P21 y P22 es:

P21 5' catgcaatacatcaaggctaactctaagttcattggtatcactgaaggcgt 3'

P22 3' gttatgtagttccgattgagattcaagtaaccatagtgacttccgcagtag 5'

Después de la unión y transformación de *E. coli* y caracterización transformante, se obtiene el plásmido llamado pRIT15199.

b) La segunda etapa es la preparación del fragmento de DNA C-lytA-P2-C-lytA mediante ampliación por la PCR. La amplificación se realiza usando pRIT15199 como molde y los oligonucleótidos llamados C-LytANOTATG y C-LytA-aa55. Siendo la secuencia de ambos nucleótidos:

C-LytANOTATG

=5'aaaacatggcgccgcttacgtacattccgacggctcttatccaaaagacaag 3'

C-LytA-aa55 =5'aaacatgtacutgaacttttctggcctgtctgccagtggtc 3'

Se trata el fragmento amplificado con las enzimas de restricción NcoI y Afl III para generar los extremos de cohesión respectivos.

c) La siguiente etapa es la unión del fragmento anterior con el vector pRIT15068 (fragmento más largo obtenido después del tratamiento de NcoI) para generar la secuencia que codifica la proteína de fusión completa. Después de la unión y transformación de *E. coli* se obtiene el plásmido llamado pRIT15200. En este plásmido el único sitio restante Nco I contiene el ATG que codifica el codón de partida.

- d) En la siguiente etapa un fragmento NcoI que contiene el promotor CUP1 y una porción de secuencias de plásmidos de 2 μ se prepara a partir del plásmido PRIT15202. El plásmido PRIT15202 es un derivado de levaduras de 2 μ que contiene el promotor CUP1 con un sitio NcoI en ATG (secuencia ATG: AAACC ATG)
- e) El fragmento NcoI aislado a partir de pRIT 15202 se liga a pRIT15200, previamente abierto con NcoI, en la orientación derecha, de tal manera el promotor pCUP1 está en el lado 5' de la secuencia de codificación. Esto da como resultado la generación de un plásmido de expresión final llamado pRIT15201 (véase la figura 7).

3.- Preparación de la cepa de levadura recombinante Y1796 (RIX4440)

Se usa el plásmido pRIT 15201 para transformar la cepa DC5 (ATCC 20220) de *S. cerevisiae*. Después de la selección y caracterización de los transformantes de levadura que contienen el plásmido pRIT 15201 se obtiene una cepa de levadura recombinante llamada Y1796 que expresa la proteína de fusión CPC-P501-His. Después de la reducción y carboxilación, la proteína se aísla y purifica mediante cromatografía de afinidad (abreviadamente IMAC) seguida de una cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose FF).

Ejemplo II

De manera análoga, pueden expresarse construcciones de proteínas como las representadas en la figura 2 utilizando las correspondientes secuencias de DNA

mostradas en dicha figura. En particular, la cepa de levadura SC333 (construcción 2) corresponde a la cepa Y1796 pero que expresa P501₅₅₋₅₅₃ desprovista de la pareja de fusión de CPC. La cepa de levadura Y1800 (construcción 2) corresponde a la cepa Y1796 pero adicionalmente comprende la secuencia de señal nativa para P501S (aa1 – aa34), mientras la cepa de levadura Y1802 (construcción 4) comprende la secuencia de señal alfa pre hacia arriba de la secuencia CPC-P501S. La cepa de levadura Y1790 (construcción 5) expresa una construcción P501S desprovista de CPC y que tiene la secuencia de señal alfa prepro.

Ejemplo III. Preparación de CPC-P501 purificada

1.- Producción a pequeña escala de CPC-P501S HIS (Y1796)

Para Y1796, en medio mínimo suplementado con histidina, la expresión se induce en fase logarítmica mediante la adición de CuSO₄ que varía entre 100 y 500 μ M y el cultivo se mantiene a 30°C. Se recogen las células después de 8 ó 24 horas de inducción. Se añade cobre justo antes de su uso y no se mezcla con el medio por adelantado.

Para el análisis de SDS PAGE, se realiza la extracción de las células de levaduras en tampón fosfato citrato pH 4,0 + NaCl 130 mM. Se realiza la extracción con perlas de vidrio para una pequeña cantidad de células y con prensa francesa para una cantidad mayor de células y después se mezcla con tampón de muestra y se analiza por SDS – PAGE. Los resultados del análisis comparativo sobre SDS PAGE de las diferentes construcciones se muestran en la figura 8 y se resumen en la tabla 2 más adelante.

Como se muestra en la tabla 1 más adelante, el nivel de expresión del cultivo es mucho

mayor para la cepa Y1796 comparada con el nivel de expresión de la cepa parental SC333, una cepa que expresa la correspondiente P501S-His desprovista de la pareja CPC. Del mismo modo, la presencia de una secuencia señal (alfa pre) no afecta a los resultados descritos anteriormente: el nivel de expresión del cultivo es mucho mayor para la cepa Y1802 comparado con el nivel de expresión de la cepa Y1790 correspondiente, una cepa que expresa la correspondiente P501S-His desprovista de pareja CPC.

Tabla 2

Cepa recombinante	Plásmido	Promotor	Secuencia señal	Pareja de fusión	Secuencias de aa de P501	Nivel de expresión
SC333	Ma333	CUP1	—	—	55-553-His	ND
Y1796	pRIT 15201	CUP1	—	CPC	51-553-His	+++
Y1802	pRIT 15219	CUP1	α pre	CPC	51-553-His	++++
Y1790	pRIT 15068	CUP1	α prepro	-	55-553-His	+

CPC = clyta P2 clyta

ND= no detectable, incluso en las transferencias de Western

+ = detectable en las transferencias de Western

+++ / ++++ = detectable en las transferencias de Western y visible en geles teñidos con plata.

2.- Fermentación a gran escala de Y1796 (RIX4440)

Se extienden 100 µl de siembra de trabajo en un medio sólido y se hacen crecer durante

aproximadamente 24 horas a 30°C. Después este cultivo previo se usa para inocular un cultivo previo en matraces vibratorios.

Este cultivo previo líquido se hace crecer durante 20 horas a 30°C y se transfiere a un fermentador de 20 l. La fermentación en cultivo discontinuo incluye una fase de crecimiento de aproximadamente 44 horas y una fase de inducción de aproximadamente 22 horas.

La fuente de carbono (glucosa) se proporcionó al cultivo mediante una alimentación continua. Se mantuvo la concentración de glucosa residual muy baja (50 mg/l) con el fin de minimizar la producción de etanol por fermentación. Esto se realizó reduciendo el desarrollo del microorganismo limitando la velocidad de alimentación de glucosa.

Al final de la fase de crecimiento, el promotor CUP1 se induce mediante la adición de CuSO₄ con el fin de producir el antígeno.

La ausencia de contaminaciones se comprobó inoculando 10⁶ células en TSB estándar y los viales de THI suplementados con nistatina se incubaron respectivamente durante 14 días a 20 - 25°C y a 30 – 35°C. Como se esperaba no se detectó ningún crecimiento.

3.- Caracterización de antígenos y productividad

Se prepararon homogeneizados de células mediante prensado francés de las muestras de fermentación recogidas a tiempos diferentes durante la fase de inducción y se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencias de Western. Se mostró que la mayor parte de la proteína de interés se localizaba en la fracción insoluble obtenida del homogeneizado de

células después de la centrifugación. Los análisis de SDS-PAGE y transferencias de Western mostrados en las figuras más adelante se realizaron en los sedimentos obtenidos después de la centrifugación de estos homogeneizados de células.

Las figuras 8 A y B muestran una cinética de la producción de antígenos durante la fase de inducción para el cultivo PRO127. Parece que no se produce ninguna expresión de antígenos durante la fase de crecimiento. La productividad del antígeno específico parece incrementarse a partir del comienzo de la fase de inducción hasta alcanzar las 6 horas y después permanece completamente estable hasta el final. Pero la productividad volumétrica aumentó por un factor entre 1,5 y 2 debido a la acumulación de biomasa observada durante el mismo período de tiempo. La productividad del antígeno se estimó en aproximadamente 500 mg por litro de caldo de fermentación comparando la referencia purificada del antígeno y los extractos brutos en análisis SDS – PAGE con tinción con plata (figura 9) y transferencias de Western usando un anticuerpo anti-P501S (un ascites murino dirigido contra P501S aa439-aa459 usado a una dilución de 1/1000) (figura 9 B).

Ejemplo IV. Purificación de la proteína de fusión CPC-P501 (51-553)-His producida por Y1796

Después de la ruptura celular, la proteína se asocia con la fracción sedimentada. Se ha introducido en el procedimiento una carbaimidometilación de la molécula con el fin de hacer frente a la agregación oxidante de la molécula consigo misma o con los contaminantes de la proteína de la célula hospedadora mediante un puente covalente con enlaces disulfuro. También se ha requerido el uso de detergentes para manejar el

carácter hidrófobo de esta proteína (12 dominios transmembrana pronosticados).

El protocolo de purificación, desarrollado para la escala de 1 l de cultivo de 120 de DO (densidad óptica) se describe en la figura 10. Todas las operaciones se realizan a temperatura ambiente (TA).

Según el ensayo de proteínas DOC TCA BCA, el rendimiento de purificación global es 30 – 70 mg de antígeno purificado/l de cultivo de 120 de DO. El rendimiento está unido al nivel de expresión del cultivo y es mayor comparado con el rendimiento de purificación de la cepa parental que expresa la PS-His no fusionada.

El ensayo de proteínas se realizó como sigue: primero las proteínas se precipitan usando TCA (ácido tricloroacético) en presencia de DOC (desoxicolato) después se disuelve en medio alcalino en presencia de SDS. Después la proteína se hace reaccionar con BCA (ácido bicinconínico) (Pierce) para formar un complejo púrpura soluble que presenta una alta absorbancia a 562 nm, que es proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra.

El análisis SDS – PAGE de tres masas purificadas (figura 11) no muestra diferencia en condiciones reductoras y no reductoras (franjas cf. 2,3 y 4 frente a las franjas 5, 6 y 7).

El patrón consta de una banda mayor a 70 kDa, una mancha de mayor peso molecular y bandas de degradación tenues. Todas las bandas se detectan mediante un anticuerpo monoclonal específico anti P501S.

Ejemplo V. Preparación de vacunas usando la proteína CPC-P501S His

La proteína del ejemplo 3 ó 4 se puede formular en una vacuna que contiene QS21 y 3D-MPL en una emulsión aceite en agua.

1.- Preparación de vacunas:

El antígeno producido como se muestra en los ejemplos 1 a 3 es una C-LytA-P2-P501S His. Como adyuvante, la formulación comprende una mezcla monofosforil lípido A 3 des-O-acilado (3D-MPL) y QS21 en una emulsión aceite/agua. El sistema adyuvante SBAS2 se describió previamente en el documento WO 95/17210.

3D-MPL: es un inmunoestimulante derivado del lipopolisacárido (abreviadamente LPS) de la bacteria Gram negativa *Salmonella minnesota*. El MPL se ha desacilado y está carente de un grupo fosfato en el resto del lípido A. Este tratamiento químico reduce drásticamente la toxicidad mientras conserva las propiedades inmunoestimulantes (Ribi, 1986). Ribi Immunochemistry produce y suministra MPL a SB- Biologicals.

Los experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han mostrado que 3D-MPL combinado con diversos vehículos potencia fuertemente la inmunidad celular tanto humoral como de tipo TH1.

QS21: es una molécula de saponina natural extraída de la corteza del árbol sudamericano *Quillaja saponaria* Molina. Una técnica de purificación desarrollada para separar las saponinas individuales de los extractos brutos de la corteza permitió el aislamiento de la saponina particular QS21, que es un glicósido triterpeno que demuestra una mayor actividad adyuvante y una menor toxicidad comparada con el componente parental. La QS21 ha mostrado que activa las CTL restringidas de clase I MHC a diversas subunidades Ags, así como estimula la proliferación linfocítica específica de Ag (Kensil, 1992). Aquila (formalmente Cambridge Biotech Corporation) produce y suministra QS21 a SB-Biologicals.

Los experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han demostrado un claro efecto sinérgico de combinaciones de MPL y QS21 en la inducción de respuestas inmunes celulares tanto humorales como del tipo TH1.

La emulsión aceite en agua se compone de una fase orgánica hecha de 2 aceites (tocoferol y escualeno) y una fase acuosa de PBS que contiene Tween 80 como emulsionante. La emulsión comprendía escualeno al 5% tocoferol al 5% Tween 80 al 0,4% y tenía un tamaño medio de partícula de 180 nm y se conoce como SB62 (véase el documento WO 95/17210).

Los experimentos realizados en SmithKline Beecham Biologicals han probado que la adición de esta emulsión de aceite/agua a 3D-MPL/QS21 (SBAS2) incrementa además las propiedades inmunoestimulantes de la última frente a diversas subunidades antigénicas.

2.- Preparación de la emulsión SB62 (concentrado 2 veces):

Se disolvió Tween 80 en solución salina tamponada con fosfato (abreviadamente PBS) para proporcionar una solución al 2% en PBS. Para proporcionar 100 ml de emulsión concentrada dos veces, se agitaron hasta crear vórtice 5 g de de alfatocoferol DL y 5 ml de escualeno hasta mezclar completamente. 90 ml de solución de PBS/Tween se añade y se mezcla completamente. Después la emulsión resultante se pasa a través de una jeringa y finalmente se microfluidifica usando una máquina de microfluidificación M110S. Las gotitas de aceite resultantes tienen un tamaño de aproximadamente 180 nm.

3.- Formulaciones

Una formulación típica que contiene 3D-MPL y QS21 en una emulsión agua aceite se prepara como sigue: se diluyen 20 µg – 25 µg de C-LytA P2-P501S en PBS 10 veces concentrada pH 6,8 y H₂O antes de la adición consecutiva de SB62 (50µl), MPL (20µg), QS21 (20µg), que opcionalmente comprende el oligonucleótido CpG (100 µg) y 1 µg/ml de tiomersal como conservante. La cantidad de cada componente puede variar según sea necesario. Todas las incubaciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente con agitación.

Ejemplo VI. Secuencias optimizadas de codones P501S

1.- Generación de los plásmidos recombinantes de control:

La secuencia de longitud completa P501S se clonó en pVAC (Thomsen, Immunology, 1998; 95: 51OP105), generando el plásmido de expresión JNW680. La SEC ID N° 17 representa el módulo de expresión P501S en el plásmido JNW680 y se ilustra en la figura 12. La secuencia de proteínas de SEC ID N° 17 se muestra en un formato de letras únicas, los codones de inicio y de parada se muestran en negrita. La secuencia Kozak se designa por los símbolos de almohadilla. El índice de uso del codón de la secuencia humana P501S (SEC ID N° 17) es 0,618 según se calculó con el programa SynGene.

Programa SynGene

Básicamente, los codones se asignan usando un procedimiento estadístico para

proporcionar el gen sintético que tiene una frecuencia de codones próxima a la encontrada naturalmente en *E. coli* altamente expresados y genes humanos.

El SynGene es una versión actualizada del programa en Visual Basic llamado CalcGene, escrito por R. S. Hale y G Thompson (Protein Expression and Purification Vol. 12 pp,185-188 (1998). Para cada resto de aminoácido en la secuencia original, se asignó un codón en función de la probabilidad de que aparezca en genes altamente expresados de *E. coli*. Los detalles del programa CalcGene, que funciona en Microsoft Windows 3.1, se pueden obtener de los autores. Como el programa aplica un procedimiento estadístico para asignar codones al gen sintético, no todos los codones resultantes son los más frecuentemente usados en el organismo diana. Más bien, la proporción de codones frecuente e infrecuentemente usados del organismo diana se refleja en la secuencia sintética mediante la asignación de codones en las proporciones correctas. Sin embargo, cada vez que se ejecuta el programa producirá un gen sintético diferente aunque cada uno tendrá el mismo patrón de uso de codón y cada uno codificará la misma secuencia de aminoácidos. Si el programa se ejecuta varias veces para una secuencia de aminoácidos dada y un organismo diana dado, se producirán varias secuencias diferentes de nucleótidos que se pueden diferenciar en el número, tipo y posición de sitios de restricción, señales de empalme de intrones etc., algunas de las cuales pueden ser indeseables. El experto en la técnica será capaz de seleccionar una secuencia apropiada para uso en la expresión del polipéptido en base a sus características.

Además, ya que los codones se asignan al azar en base estadística, es posible (aunque quizás improbable) que dos o más codones que se usan relativamente rara vez en el organismo diana se puedan agrupar en una proximidad cercana. Se cree que tales grupos pueden perturbar la maquinaria de traducción y dar como resultado una

velocidad particularmente baja de expresión, de este modo el algoritmo para elegir los codones en el gen optimizado excluye cualquier codón con un valor de RSCU inferior a 0,2 para los genes altamente expresados con el fin de evitar cualquier grupo de codones raros que fortuitamente se seleccionen. Después la distribución de los codones restantes se localiza según las frecuencias para *E. coli* altamente expresado para proporcionar una distribución global en el gen sintético que es típica de dichos genes (coeficiente = 0,85) y también para los genes humanos altamente expresados (coeficiente = 0,50).

Syngene (Meter Ertl, no publicado), una versión actualizada del programa Calgene, permite que la exclusión de codones raros sea opcional y también se usa para localizar codones según el patrón de frecuencia de codones de genes humanos altamente expresados.

La secuencia del módulo CPC-P501S clonado a partir del vector pRIT15201 (véase la figura 7) en pVAC, por lo tanto generando el plásmido JNW735, se indica en la SEC ID N° 18 y se ilustra en la figura 13. Esta secuencia es idéntica a la secuencia pRIT15201 con la excepción de la eliminación de la señal His y la adición de una secuencia Kozak (GCCACC) y sitios de enzimas de restricción apropiados. La secuencia de aminoácidos SEC ID N° 18 se muestra en un formato de una sola letra, los codones de inicio y de parada se muestran en negrita. Los restos encuadrados son el epítipo auxiliar P2 del toxoide del tétanos. Los restos subrayados son la señal de purificación Clyta. La secuencia Kozak se marca por los símbolos de almohadilla.

2.- Generación de los plásmidos recombinantes con secuencias optimizadas de codones de P501S:

178

Aunque el índice de coeficiente de codones (abreviadamente CI) de la secuencia nativa de P501S es ya alta (0,618), es posible incrementar el valor de CI posteriormente. Esto tendrá dos beneficios potenciales mejorar la expresión y/o inmunogenicidad del antígeno y reducir la posibilidad de recombinación entre el vector de P501S y las secuencias genómicas.

Usando el programa Syngene se obtuvo una selección (SEC ID N° 19 a SEC ID N° 20) de secuencias optimizadas de codones (figura 14). La tabla 3 más adelante muestra una comparación del índice de coeficiente de codones, seleccionado en base a un perfil de sitios de enzimas de restricción adecuados y un buen índice de CI.

Tabla 3 – Comparación de índices de coeficiente de codones de dos genes de P501S optimizados de codones

Secuencia	Índice de coeficiente de codones (IC)
P501S	0,618
SEQ ID NO:19	0,725
SEQ ID NO:20	0,755

3.- Evaluación adicional de las secuencias optimizadas de codones

Secuencia SEC ID N° 19

Aunque la SEC ID N° 19 tiene un buen índice de CI (0,725) contiene un doblete de codones raros en los aminoácidos de posición 202 y 203. Estos codones se sustituyeron manualmente con codones más frecuentes cambiando la secuencia de DNA de

121

TTGTTG a CTGCTG. Para facilitar la clonación y expresión, se añadieron los sitios de las enzimas de restricción y una secuencia Kozak. La secuencia final modificada genéticamente (SEC ID N° 21) se muestra en la figura 15. Se utilizó el programa Syngene para fragmentar esta secuencia en oligonucleótidos con una superposición mínima de 19 – 20 bases. Por lo tanto, la figura 15 muestra la SEC ID N° 19 optimizada de codones P501S remodificada genéticamente. Los sitios de las enzimas de restricción están subrayados, la secuencia Kozac está en negrita, la secuencia de DNA remodificada genéticamente para retirar un doblete de codones raro esta encuadrada.

Usando un protocolo de la PCR de dos etapas, los cebadores de superposición generados por el programa Syngene primero se ensamblaron usando el protocolo de ensamblaje (detallado mas adelante). El fragmento de longitud completa correcto se recuperó/amplificó usando el protocolo de recuperación de la PCR y los cebadores terminales. El fragmento de PCR resultante se eliminó a partir de un gel de agarosa, se purificó, se restringió con NheI y XhoI y se clonó en pVAC. Los clones positivos se identificaron mediante análisis de enzimas de restricción y se confirmaron mediante secuenciación de doble cadena. Esto genera el plásmido JNW766, que, debido a la naturaleza propensa al error del procedimiento de la PCR, contenía una única mutación silenciosa (C a T en la posición 360 de la SEC ID N° 21).

1. Condiciones de la reacción de ensamblaje – PCR, protocolo genérico

Mezcla de reacción (volumen total = 50µl):

- 1x Tampón de reacción (Pfx o comienzo de la prueba)
- 1µl Conjunto de oligo (mezcla igual de todos los oligos superpuestos)
- dNTPs 0,5mM

- DNAPolimerasa (Pfx o comienzo de la prueba, 2,5-5U)
- MgSO_4 +/- 1 mM
- +/- 1x de solución potenciadora (potenciador de Pfx o tampón de comienzo de la prueba Q)

1. 94°C durante 120 seg. (solamente comienzo de la prueba)
2. 94°C durante 30 seg.
3. 40°C durante 120 seg.
4. 72°C durante 10 seg
5. 94°C durante 15 seg
6. 40°C durante 30 seg
7. 72°C durante 20 seg. + 3 seg./ciclo
8. Ciclo a etapa 5, 25 veces
9. Mantenido a 4°C

2. Condiciones de la reacción de recuperación – PCR (protocolo genérico)

Mezcla de reacción (volumen total = 50µl):

- 1x Tampón de reacción (Pfx o comienzo de la prueba)
- 5-10µl mezcla de reacción de ensamblaje
- dNTPs 0,3 - 0,75mM
- 50 pmol de cebador (cebador del terminal 5', orientación con sentido)
- 50 pmol de cebador (cebador del terminal 3', orientación antisentido)
- DNAPolimerasa (Pfx o comienzo de prueba, 2,5 - 5U)
- MgSO_4 +/-1mM

- +/- 1x de solución potenciadora (potenciador de Pfx o tampón de comienzo de la prueba Q)

1. 94°C 120 seg. (solamente comienzo de la prueba)
2. 94°C 45 seg.
3. 60°C 30 seg.
4. 72°C 120 seg.
5. Ciclo a etapa 2, 25 veces
6. 72°C 240 seg.
7. Mantenido a 4°C

Secuencia SEC ID N° 20

Aunque la SEC ID N° 20 tiene un muy buen índice de CI (0,755) se observó que contenía un doblete de codones raros en los aminoácidos de posición 131 y 132. Estos codones se sustituyeron manualmente con codones más frecuentes cambiando la secuencia de DNA de TTGTTG a CTGCTG. Para facilitar la clonación, se retiró un sitio BamHI interno mediante la mutación de G a C (véase el nucleótido doblemente subrayado de la figura 16). Para facilitar la clonación y expresión se añadieron los sitios de las enzimas de restricción y una secuencia Kozak. La secuencia final modificada genéticamente (SEC ID N° 22) se muestra en la figura 16. Se utilizó el programa Syngene para fragmentar esta secuencia en oligonucleótidos con una superposición mínima de 19 – 20 bases.

La figura 16 muestra la secuencia 20 (SEC ID N° 22) optimizada de codones P501S remodificada genéticamente. Los sitios de las enzimas de restricción están subrayados, la secuencia está en negrita, la secuencia de DNA remodificada genéticamente para

132

retirar un doblete de codones raros esta encuadrada y una mutación puntual silenciosa para retirar un sitio BamHI está doblemente subrayada..

Usando un protocolo de la PCR de dos etapas similar al descrito anteriormente, el fragmento de longitud completa de P501 se amplificó y se clonó en pVAC. Los clones positivos se identificaron mediante análisis enzimático de restricción y se confirmaron mediante secuenciación de doble cadena. Esto genera el plásmido JNW764. La secuencia del módulo que codifica P501S se muestra en la figura 16 (SEC ID N° 22).

Similitud de secuencias de DNA

Las distancias pares que siguen a la alineación mediante el procedimiento ChustalV (en peso) se muestran en la tabla 3 más adelante. La tabla 4 más adelante muestra el porcentaje de similitud entre la secuencia de comienzo humana de P501S y las dos secuencias optimizadas de codones SEC ID N° 21 y 22 seleccionadas para posterior investigación. Los datos confirman que las secuencias de DNA optimizadas de codones son aproximadamente 80% similares a la secuencia original de P501S.

Tabla 4

SEC ID N°	% de similitud con la secuencia de inicio de P501S
21	79,6
22	79,4

Ejemplo VII. Secuencias CPC optimizadas de codones

1.- Planteamiento

136

Ya que la secuencia CPC original se diseñó originalmente para la expresión óptima en levaduras. Esta sección describe el procedimiento de optimización de codones para expresión humana.

2.- Diseño de secuencias

La secuencia de inicio para la optimización de CPC se muestra en la figura 17 (SEC ID N° 23). Esto se deriva completamente del pRIT15201 y contiene la secuencia de codificación completa de CPC más cuatro aminoácidos de P501S para facilitar la clonación hacia abajo. Usando el programa Syngene, se obtuvieron una selección de secuencias optimizadas de codones de las que las secuencias representativas se muestran en la figura 18 (SEC ID N° 24 – 25). La tabla 5 más adelante muestra una comparación del índice de coeficiente de codones para la secuencia CPC de inicio y las dos secuencias optimizadas representativas de codones.

Tabla 5. Índice de coeficiente del codón para dos secuencias optimizadas CPC

Secuencia	Índice de coeficiente de codones (CI)
CPC Original = SEC ID N° 23	0,506
SEC ID N° 24	0,809
SEC ID N° 25	0,800

Además de la optimización de codones, todas las secuencias se analizaron también para los sitios de clonación de enzimas de restricción. En base a los valores de CI más altos y un perfil de sitios de enzimas de restricción favorables, se seleccionó para construcción

la SEC ID N° 24. Para facilitar la clonación y expresión se añadieron los sitios de clonación en 5' y 3' y se insertó una secuencia Kozak (GCCACC) en 5' del codón de inicio ATG. Esta secuencia modificada genéticamente se muestra en la figura 19 (SEC ID N° 26). Esta secuencia incluye cuatro aminoácidos de P501S (encuadrados), sitios de clonación de enzimas de restricción (NheI y XhoI, subrayados), una secuencia Kozak (en negrita), un codón de parada (en itálica) y 4 pares de bases de DNA flanqueante irrelevante para facilitar la clonación.

Se usó el programa Syngene para fragmentar esta secuencia en oligonucleótidos de 50 – 60 – meros con una superposición mínima de 18 – 20 bases.

Usando un protocolo de la PCR de dos etapas similar al descrito anteriormente, se recuperó/amplificó el fragmento correcto y se clonó en pVAC. Los clones positivos se identificaron mediante el análisis de enzimas de restricción y se verificó la secuencia generando el vector JNW759.

4.- Similitud de DNA

Las distancias pares que siguen a la alineación mediante el procedimiento ClustalV (en peso) se muestran en la tabla 6 más adelante. La tabla muestra el porcentaje de similitud a nivel de DNA entre la secuencia de comienzo de CPC y la secuencia optimizada de codones y confirma que las secuencias optimizadas de codones son aproximadamente 80% similares a la secuencia original de CPC.

Tabla 6

Secuencia SEC ID N°	% de similitud con la secuencia CPC de inicio
24	80,2

25	81,6
----	------

Ejemplo VIII. Construcción del candidato de fusión de P501S

Todos los candidatos mostrados en el esquema más abajo codones optimizados y contruidos usando metodologías de superposición de PCR a partir de los plásmidos JNW764 y JNW759 como moldes (SEC ID N° 22 y SEC ID N° 26 respectivamente) y se clonan en el vector de expresión p7313 ie.

Los cuatro candidatos mostrados esquemáticamente más adelante se basan en CDP-P501S. El codón optimizado CPC-P501S es la construcción A. Los candidatos B, C, D también incluyen la secuencia que codifica los 50 aminoácidos del extremo N de P501S, posicionados bien en el extremo N de CPC-P501S (construcción D), el extremo C de CPC-P501S (construcción C), o entre CPC y P501S (construcción B). Una representación esquemática de las construcciones se proporciona en la figura 20.

La secuencia de nucleótidos y proteínas de cada uno de las cuatro construcciones se muestra en la SEC ID N° 37 – 40 para las secuencias de nucleótidos, y la SEC ID N° 45 – 48 para las correspondientes secuencias de polipéptidos. En las construcciones A, C y D, el codón subrayado codifica preferentemente tirosina (bien TAC o TAT) pero la secuencia de nucleótidos se puede alterar para que codifique treonina (bien ACA, ACC, ACG o ACT). En la construcción B, el codón subrayado subrayado codifica preferentemente treonina (bien ACA, ACC, ACG o ACT), pero la secuencia de nucleótidos se puede alterar para que codifique tirosina (bien TAC o TAT). En todas las construcciones la secuencia de codificación está flanqueada por sitios de clonación de enzimas de restricción adecuadas (en este caso, NotI y BamHI), y una secuencia Kozak

inmediatamente hacia arriba de ATG de inicialización. La tabla 7 más adelante muestra la identificación de plásmidos para las construcciones detalladas anteriormente:

Tabla 7

Construcción	Aminoácido en el codón subrayado	Secuencia de codón	Plásmido ID
A	Tirosina	TAC	JNW771
B	Tirosina	ACA	JNW773
B	Tirosina	TAC	JNW770
C	Tirosina	TAC	JNW777
D	Tirosina	TAC	JNW769

Las respuestas celulares que siguen a la inmunización con p7313-ie (vector vacío), pVAC-P501S (JNW735), JNW770, JNW771 y JNW773 se valoraron mediante ELISPOT seguido de una inmunización principal mediante PMID el día 0 y tres refuerzos los días 21, 42 y 70. Los ensayos se llevaron a cabo 7 días después del refuerzo. La figura 27 muestra que se detectaron buenas respuestas de IL-2 ELISPOT en ratones inmunizados con JNW770, JNW771 y JNW773.

Ejemplo IX. Experimentos de inmunogenicidad usando estudios de administración intradérmica mediada por partículas

El P501S de longitud completa cuando se administra mediante administración

intradérmica mediada por partículas (abreviadamente PMID), genera buenas respuestas de anticuerpos y celulares. Estos datos demuestran que la PMID es una muy eficaz vía de administración. Además, la comparación de P501S y CPC-P501S confirma que CPC-P501S induce una respuesta inmune más fuerte como se determina por ELISPOT de péptidos.

1. Materiales y métodos

1.1. Inmunización mediante cañón de genes cutáneo

DNA de plásmido se precipitó en perlas de oro de 2 μm de diámetro usando cloruro cálcico y espermidina. Las perlas cargadas se revistieron en un tubo Tefel como se ha descrito (Eisenbraun y col., 1993; Pertmer y col., 1996). El bombardeo por partículas se realizó usando el sistema de administración génica Accell (PCT documento WO 95/19799). Para cada plásmido, se inmunizaron hembras de ratones C57BL/6 los días 0, 21, 42 y 70. Cada administración constaba de dos bombardeos con DNA/oro proporcionando una dosis total de aproximadamente 4 – 5 μg de plásmido.

1. 2. Ensayos ELISPOT para las respuestas de células T al producto génico de P501S

a) Preparación de esplenocitos

Se obtuvieron bazo de animales inmunizados a los 7 – 14 días después del refuerzo. Los bazo se procesaron oprimiendo entre dos portaobjetos de vidrio para producir una suspensión celular. Se lisaron los glóbulos rojos mediante tratamiento cloruro amónico y los desechos se retiraron para dejar una suspensión fina de esplenocitos.

Las células se volvieron a suspender a una concentración de 8×10^6 /ml en medio completo de RPMI para uso en los ensayos de ELISPOT.

b) Análisis de biblioteca de péptidos

Se obtuvo de Corixa Corp una biblioteca de péptidos que cubría una mayoría de la secuencia de P501S. La biblioteca contenía cincuenta péptidos de 15 – 20 meros que se superponen con 4 – 11 aminoácidos. Los péptidos se numeraron 1 – 50. Además, un programa de predicción (H-G. Rammensee, et al.: Immunogenetics, 1999, 50: 213-219) (<http://syfpeithi.bmi-heidelberg.com/>) se usó para predecir los supuestos epítomos Kb y Db de la secuencia P501S. Los diez mejores epítomos de Kb y Db se pidieron a Mimotopes (Reino Unido) y se incluyeron en la biblioteca (péptidos 51 – 70). Para analizar la biblioteca de péptidos, se usaron los péptidos a una concentración final de 50 µg/ml (aproximadamente 25 – 50 µM) en ELISPOTS de IFN γ e IL – 2 usando el protocolo descrito más adelante. Para ELISPOTS de IFN γ , se añadió IL – 2 a los ensayos a 10 ng/ml. Los esplenocitos usados para el análisis se cogieron el día 84 de ratones C57Bl/6 inmunizados los días 0, 21, 42 y 70. Se identificaron tres péptidos del análisis de la biblioteca - péptidos 18 (HCRQAYSVYAFMISLGGCLG), 22 (GLSAPSLSPHCCPCRARLAF) y 48 (VCLAAGITYVPPLLLEVG). Estos péptidos se usaron posteriormente en los ensayos de ELISPOT.

c) Ensayo ELISPOT

Se cubrieron las placas con 15 µg/ml (en PBS) de IFN γ de rata anti ratón o IL – 2 de ratas anti ratón (Pharmingen). Se cubrieron las placas durante una noche a +4°C. Antes de usar las placas se lavaron tres veces con PBS. Se añadieron esplenocitos a las placas a 4×10^5 células/pocillo. Los péptidos se identificaron en el análisis de la

biblioteca se volvieron a perder a Genemed Synthesis y se usaron a una concentración final de 50 µg/ml. La proteína CPC – P501S (GSKBio) se usó en el ensayo a 20 µg/ml. Los ensayos ELISPOT se llevaron a cabo en presencia bien de IL – 2 (10 ng/ml), IL – 7 (10 ng/ml) o sin citoquina. El volumen total en cada pocillo fue de 200 µl. Las placas que contenían células estimuladas de péptidos se incubaron durante 16 horas en un incubador humidificado a 37°C.

d) Desarrollo de las placas de ensayo de ELISPOT

Las células se retiraron de las placas mediante el lavado una vez con agua (poniendo en remojo 10 minutos para asegurar la lisis de las células) y tres veces con PBS. El IFN de rata anti ratón conjugado con Biotina o IL – 2 (Pharmingen) se añadió a 1 µg/ml en PBS. Se incubaron las placas en agitación con vibración durante 2 horas a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron tres veces con PBS antes de la adición de fosfatasa alcalina de Estreptavidina (Caltag) a una dilución de 1/1000. Después de tres lavados en PBS se revelaron las manchas mediante incubación con sustrato BCICP (Biorad) durante 15 – 45 minutos. Se lavó el sustrato usando agua y se dejó que las placas se secaran. Se enumeraron las manchas usando un sistema de análisis proyectado por Brian Hayes, Asthma Cell Biology unit, GSK.

1. 3. Ensayo ELISA para anticuerpos del producto génico de P501S

Se obtuvieron las muestras de suero de los animales mediante punción en vena los días - 1, 28, 49 y 56 y se ensayaron para la presencia de anticuerpos anti – P501S. Se realizó ELISA usando placas de Nunc Maxisorp cubiertas durante una noche a 4°C con 0,5 µg/ml de proteína de CPC - P501S (GSKBio) en tampón bicarbonato sódico. Después

de lavar con TBS – Tween (solución salina tamponada con Tris, pH 7,4 que contenía 0,05% de Tween 20) se bloquearon las placas con tampón de bloqueo (BSA al 3% en tampón TBS – Tween) durante 2 horas a temperatura ambiente. Todos los sueros se incubaron a una dilución 1:100 durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de bloqueo. Se detectó la unión de anticuerpo usando inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjugadas con HRP (#P0260, Dako) a dilución 1:2000 en tampón de bloqueo. Se lavaron las placas de nuevo y se detectó el conjugado unido usando reactivos de color Fast OPD (Sigma, Reino Unido). Se detuvo la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 3M y el producto OPD se cuantificó midiendo la absorbancia a 490 nm.

1. 4. Ensayos de transfección transitoria

Se analizó la expresión de P501S humano da partir de diversas construcciones de DNA mediante transfección transitoria de los plásmidos en células de CHO (ovario de hámster chino) seguido de transferencias de Western en la proteína celular total. Las trasfecciones transitorias se realizaron con el reactivo Transfectan (Promega) según las instrucciones del fabricante. Brevemente, placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos se sembraron con 5×10^4 células CHO por pocillo en 1 ml de medio completo DMEM (DMEM, FCS al 10%, L-glutamina 2mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomicina 100 µg/ml) y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Se añadieron 0,5 µg de DNA a 25 µl de NaCl 0,3 M (suficiente para un pocillo) y se añadieron 2 µl de Transfectam a 25 µl de Milli-Q. Las soluciones de DNA y Transfectam se mezclaron suavemente y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Durante esta etapa de incubación, se lavaron las células una vez en PBS y se cubrieron con 150 µl de medio exento de suero (DMEM, L - glutamina 2 mM). La solución de DNA – Transfectam se añadió gota a gota a las células, la placa se agitó con vibración suavemente y se incubó

a 37°C durante 4 – 6 horas. Se añadieron 500 µl de medio completo de DMEM y se incubaron las células durante 48 – 72 horas adicionales a 37°C.

2. Análisis de transferencias de Western de células de CHO transfectadas transitoriamente con plásmidos de P501S

Las células de CHO transfectadas transitoriamente se lavaron con PBS y se trataron con Verseno (1:5000)/solución de tripsina al 0,025% para transferir las células a la suspensión. Después de tripsinización, las células de CHO se sedimentaron y se volvieron a suspender en 50 µl de PBS. Se añadió un volumen igual de 2 x de tampón de lisis NP40 y se incubaron las células en hielo durante 30 minutos. Se añadieron 100 µl de 2 x de tampón de muestra TRIS – glicina SDS (Invitrogen) que contenía DTT 50 mM y se calentó la solución hasta 95°C durante 5 minutos. Se cargó 1 – 20 µl de muestra en una columna de gel de TRIS – glicina al 4 – 20% de 1,5 mm (Invitrogen) y se sometió a electroforesis a una tensión constante (125 V) durante 90 minutos en 1 x de tampón TRIS – glicina (Invitrogen). Se usó un marcador preteñido de amplio rango (Nueva Inglaterra Biolabs, #P7708S) para calibrar las muestras. Después de la electroforesis, se transfirió la muestra a una membrana de Immobilon-P (Millipore), se prehumedeció en metanol, usando un módulo Xcell III Blot (Invitrogen), 1 x tampón de transferencia (Invitrogen) que contenía metanol al 20% y una tensión constante de 25 V durante 90 minutos. Se bloqueó la membrana durante una noche a 4°C en TBS – Tween (solución salina tamponada con TRIS, pH 7,4 conteniendo 0,05% de Tween 20) que contenía leche desnatada seca (Marvel). Se diluyó el anticuerpo principal (10E3) 1:1000 y se incubó con la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado abundante en TBS – Tween, el anticuerpo secundario (inmunoglobulinas de

conejo anti-ratones conjugadas con HRP (#P260, Dako)) se diluyó 1:2000 en TBS – Tween que contenía 3% de leche desnatada seca y se incubó con la membrana durante una hora a temperatura ambiente. Después de un lavado abundante, se incubó la membrana con sustrato Supersignal West Pico Chemiluminescent substrate (Pierce) durante 5 minutos. Se retiró el exceso de líquido y se selló la membrana entre dos hojas de láminas adherentes y se expuso a una lámina de Hyperfilm ECL (Amersham-PharmaciaBiotech) durante 1 – 30 minutos.

3. Generación del módulo de expresión P501S humano de longitud completa

El punto de inicio de la construcción de un módulo de expresión de P501S era el plásmido pcDNA3,1-P501S (Corixa Corp), que tiene un eje central pcDNA3,1 (Invitrogen) que contenía un módulo P501S cDNA de longitud completa entre los sitios EcoRI y NotI. Este vector también se denomina JNW673. La presencia de P501S se confirmó mediante secuenciación fluorescente. La secuencia del módulo de cDNA se proporciona mediante la secuencia NCBI/Genbank (número de acceso AY033593). El P501S humano era PCR amplificado a partir del DNA de molde JNW673, restringido con XbaI y Sall y clonado en los sitios NheI/XhoI de pVAC generando el vector JNW680. La correcta orientación del fragmento relativa al promotor de CMV se confirmó mediante PCR y por secuenciación de DNA. La secuencia del módulo de expresión se muestra en la figura 12 (SEC ID N° 17).

Para construir un módulo de expresión CPC-P501S, se amplificó CPC-P501S mediante PCR a partir del vector pRIT15201 (véase la figura 7), restringido con XbaI y Sall y se clonó en los sitios NheI y XhoI de pVAC, generando el plásmido JNW735. Se confirmó la correcta orientación mediante PCR y secuenciación. La secuencia del módulo de

expresión CPC-P501S se muestra en la figura 13 (SEC ID N° 18).

4. Expresión de P501S humano de plásmidos JNW680 y JNW735

Los plásmidos de expresión de P501S se trasfectaron transitoriamente en células CHO y se preparó un lisado total de células como se describe en los procedimientos. Unas transferencias de Western de un lisado de células total identificó bandas únicas de aproximadamente 55 kDa y 62 kDa para muestras transfectadas con JNW680 y JNW735 respectivamente (figura 21). Esto es consistente con los pesos moleculares predichos de 59,3 kDa y 63,3 kDa para P501S y CPC – P501S respectivamente. La adición de CPD tag no afecta adversamente la expresión de P501S.

5. Resultados

5. 1. Respuestas anticuerpo a P501 humano seguido de inmunización con PMID

Las respuestas anticuerpo después de inmunización con pVAC (vector vacío) y pVAC – P501S (JNW680) se valoraron mediante análisis ELISA seguido de una inmunización primaria por PMID el día 0 y tres estimulaciones los días 21 y 42 y el día 70. La figura 22 muestra las respuestas anticuerpo de sueros recogidos los días -1, 28 y 49 (ratones A1-3, B1-3) y el día 56 (ratones A4-6, B4-9). Mientras tres eran respuestas algo no específicas para el vector pVAC vacío, respuestas específicas a la construcción P501S se veían en 5 de 9 ratones.

5. 2. Identificación de epítomos de células T nuevos de P501S humano en ratones

C57BL/6 mediante análisis de una biblioteca de péptidos de P501S

Después de la inmunización con JNW680 (pVAC - P501S) mediante PMID el día 0 y tres estimulaciones el día 21 y el día 42 y el día 70, se llevaron a cabo ensayos ELISPOT el día 84. Los péptidos de la biblioteca P501S se ensayaron a una concentración final de 50 µg/ml. De este primer análisis, se encontró que tres péptidos estimulaban la secreción de IFN-γ y/o IL-2. Los péptidos 18, 22 y 48 (figura 23). Estos péptidos se utilizaron en posteriores ensayos celulares.

5. 3. Respuestas celulares a pVAC – P501S (JNW680) seguido de inmunización con PMID

Las respuestas celulares después de inmunización con pVAC (vector vacío) y pVAC – P501S se valoraron mediante ELISPOT seguido de una inmunización primaria mediante PMID el día 0 y tres estimulaciones los días 21, 42 y 70. Se llevaron a cabo los ensayos 7 días después de la estimulación. Se utilizaron dos condiciones de ensayo diferentes: 1) los péptidos 18, 22 y 48 identificados en la selección de la biblioteca de péptidos se usaron a 50 µg/ml de concentración final y 2) la proteína CPC – P501S usada a 20 µg/ml de concentración final. La figura 24A muestra que mientras no había respuestas específicas de P501S al vector vacío (A4-6), la construcción pVAC – 501S inducía respuestas específicas de IFN-γ a los péptidos 18 y 22 en todos los ratones (B6-9) mientras un ratón (B7) también mostró una respuesta de IFN-γ al péptido 48. La figura 24B muestra que todos los ratones mostraban respuestas específicas de IL-2 a los péptidos 18, 22 y 48. Además, los ratones (B6-9) inmunizados con pVAC-P501S también mostraron respuestas moderadas de IL-2 a CPC – P501S, mientras que los ratones (A4-6) inmunizados con el vector vacío no mostraron respuestas.

5. 4. Comparación de respuestas celulares a P501S y CPC – P501S seguido de inmunización con PMID

Las respuestas celulares después de inmunización con pVAC (vector vacío) y pVAC – P501S (JNW680) y CPC – P501S (JNW735) se valoraron mediante ELISPOT seguido de una inmunización primaria mediante PMID el día 0 y refuerzos los días 21 y 42. Se llevaron a cabo los ensayos 7 días después de los refuerzos. Se utilizaron dos condiciones de ensayo diferentes: 1) los péptidos 18, 22 y 48 identificados en la selección de la biblioteca de péptidos se usaron a 50 µg/ml de concentración final y 2) la proteína CPC – P501S usada a 20 µg/ml de concentración final. La figura 25 muestra que el día 28, CPC - P501S inducía buenas respuestas de IL – 2 a 10 µg/ml del péptido 22, mientras que no había respuestas específicas de P501S bien al vector vacío o al pVAC – 501S. Estos resultados también se veían usando proteína CPC-P501S para volver a estimular los esplenocitos. El día 49 (después de la 2ª estimulación) las respuestas inducidas por P501S y CPC – P501S eran equivalentes. Estos datos sugieren que la adición de la señal CPC mejora la cinética y/o la magnitud de la respuesta a P501S.

Ejemplo IX. Estudios de experimentos de inmunogenicidad en ratones usando proteína P501S + adyuvante

1. Diseño y formulación de adyuvantes

La respuesta inmune inducida por vacunación que usa la proteína CPC – P501S recombinante purificada formulada en adyuvantes se caracteriza en experimentos realizados en ratones.

Se vacunaron grupos de 5 a 10 hembras de ratones C57BL6 de 8 semanas de edad, 2 – 6 veces intramuscularmente a intervalos de 2 semanas con 10 µg de la proteína CPC – P501S formulada en diferentes sistemas de adyuvantes. El volumen administrado corresponde a 1/10 de una dosis humana (50 µl).

La serología (respuesta de Ig total) y respuesta celular (linfoproliferación de células T y producción de citoquina) se analizaron en células de bazo, 6 – 14 día después de la última vacunación usando protocolos estándar como describen Gérard, C. y col., 2001, Vaccine 19, 2583 – 2589.

Se muestran los datos de un experimento representativo. Incluyó 5 grupos de ocho hembras de ratones C57BI/6 que recibieron 4 inyecciones intramusculares de CPC P501S (10 µg) + adyuvante (A, B, C) los días 0, 14, 28, 42. El ejemplo V proporciona un protocolo experimental de cómo llevar a cabo las formulaciones. Brevemente las formulaciones de adyuvantes son como siguen (cantidades dadas por una dosis de 100 µl):

- **Adyuvante A:** QS21 (10µg), MPL (10µg) y CpG7909 (100 µg) realizado según el procedimiento descrito en el documento WO 00/62800;
- **Adyuvante B:** formulación de QS21 (20µg), MPL (20µg), CpG7909 (100 µg) y 50 µf SB62 de emulsión aceite en agua (documento WO 95/17210);
- **Adyuvante C:** formulación de QS21 (10µg), MPL (10µg), CpG7909 (100 µg) y 10 µl SB62 de emulsión aceite en agua (documento WO 99/12565).

2. Serología

La respuesta total de Ig inducida por vacunación se midió mediante análisis ELISA usando bien la CPC-P501 o RA12 -P501 (extremo C, que es una forma truncada de la proteína P501 correspondiente al extremo C de la proteína fusionada a su extremo N, a una proteína RA12 – Ra12 derivada de TB se deriva a partir del antígeno MTB32A descrito en Skeiky y col., Infection and Immun. (1999) 67: 3998 – 4007).

Las proteínas CPC – P501S con adyuvantes proporcionan una buena respuesta de anticuerpo después de la vacunación.

3. Respuesta celular

3. 1. Linfoproliferación

Se realizó la linfoproliferación siete días después de la última vacuna sobre células de bazo individualmente. Se sembraron células $2,10 \times 10^5$ por cuadruplicado en microplacas de 96 pocillos, en medio RPMI que contenía suero de ratones normal al 1%. Después de 72 horas de reestimulación bien con el inmunógeno (CPC-P501) o bien con la proteína truncada (RA12 P501) a concentración diferente, se añadió 1 μ Ci de ^{3} H timidina (Amersaham 5 Ci/ml). Después de 16 horas, se recogieron las células en placas de filtro. La radiactividad incorporada se contó en un contador . Los resultados se expresan en CPM o como índices* de estimulación (media geométrica de CPM en cultivos con antígeno/media geométrica de CPM en cultivos sin antígeno).

La reestimulación con ConA (2 μ g/ml) como control positivo se incluyó como control positivo.

Como se muestra en la figura 26, una linfoproliferación específica de P501S se ve en el bazo de todos los grupos de ratones que reciben la proteína con adyuvantes después de

una reestimulación bien con el inmunógeno o bien con otra proteína de P501S realizado en otro sistema de expresión (*E. coli*), indicando que las células T se han cebado *in vivo* mediante la vacunación.

3. 2. Producción de IFN γ medida mediante tinción intracelular de células de bazo

Células dendríticas de tuétano de hueso (abreviadamente BMDC) se obtuvieron de un cultivo de PBL de ratón durante 7 días en presencia de GMCSF.

Siete días después de la última vacuna, el bazo o PBL se recogen y se prepara una suspensión celular. 10^6 (10^6) células (1 conjunto por grupo) se incubaron $\pm$ 18 horas con 10^5 (10^5) de BMDC pulsadas durante una noche con 10 μ g/ml bien de la proteína CPCp501 o de la RA12.

Después de un tratamiento con el anticuerpo 2,4.G,2, se tiñeron las células de bazo con anticuerpos antiCD4 y CD8 fluorescentes (anti CD4-APC y anti CD8PerCP). Después de una etapa de permeabilización y fijación, se tiñeron las células con un anticuerpo anti IFN γ -FITC.

En ratones vacunados con CPC P501 en diferentes adyuvantes , tanto las células T CD4 como las CD8 se muestran para producir IFN γ en respuesta a pulsos de DC tanto con el inmunógeno como con el p501 C terminal realizado en *E. coli* (como se muestra mediante tinción intracelular de bazo y PBLs). Existe un incremento de 4 – 10 x en el % de células que producen esta citoquina en los grupos que reciben la CPD con adyuvantes (adyuvantada) comparada con la proteína sola y entre 0,1 y 10% de células T de CD4 o CD8 se muestran para producir IFN γ .

En conclusión, estos datos permiten concluir que la proteína CPC – P501 con

adyuvantes (adyuvantada) es inmunogénica en ratones.

Tanto unas respuestas humores y celulares específicas de P501 que incluyen la producción de IFN γ mediante células T de CD4 y CD8 se pueden detectar después varias vacunaciones intramusculares con CPC P501 en adyuvantes.

Ejemplo X. Construcciones y secuencias de CPC-MUC-1

La secuencia CPC se coge del nucleótido SEC ID N° 28.

La secuencia MUC1 está disponible de la base de datos de Genbank (número de acceso NM_002456).

1. Construcción MUC1-CPC

Debido a la presencia de una secuencia señal en MUC1 que se desdobla después de la traducción, el motivo CPC se situó en el extremo C. La secuencia de DNA MUC1-CPC resultante se muestra en la SEC ID N° xx (figura 28A) y la secuencia de la proteína MUC1-CPC correspondiente SEC ID N° yy (figura 28B).

2. Construcción ss-CPC-MUC1

Debido a la presencia de una secuencia señal en MUC1 que se desdobla después de la traducción, la secuencia señal se reemplazó mediante una secuencia conductora heteróloga (a partir de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana) y el motivo CPC se insertó entre la secuencia conductora heteróloga y la secuencia MUC1, generando una secuencia llamada ss-CPC-MUC1 como se muestra en la figura 29.

Habiendo descrito la invención como antecede, se declara como propiedad lo contenido en las siguientes

Reivindicaciones

1. Una proteína de la pareja de fusión que comprende un dominio de unión a colina y un epítipo auxiliar T promiscuo.
2. Una proteína de la pareja de fusión según la reivindicación 1 en la que el dominio de unión a colina se deriva del extremo C de LytA.
3. Una proteína de la pareja de fusión según la reivindicación 2 en la que el C-LytA o derivados comprende al menos cuatro repeticiones de cualquiera de las SEC ID N° 1 a 6.
4. Una proteína de la pareja de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el dominio de unión a colina se selecciona del grupo constituido por:
 - a) el dominio del extremo C de LytA como se expone en la SEC ID N° 7; o
 - b) la secuencia de SEC ID N° 8; o
 - c) una secuencia de péptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad, preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 95% de identidad, lo más preferible al menos 97 – 99% de identidad a cualquiera de las SEC ID N° 1 a 6; o
 - d) una secuencia de péptidos que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 15, 20, 30, 40, 40, 50 ó 100 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7 o SEC ID N° 8.
5. Una proteína de la pareja de fusión como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que comprende además una proteína heteróloga.

6. Una proteína de fusión según la reivindicación 5, en la que la proteína heteróloga se conjuga químicamente al la pareja de fusión.
7. Una proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6 en la que la proteína heteróloga se deriva de un organismo seleccionado del grupo siguiente: el virus de inmunodeficiencia humano VIH – 1, los virus del herpes simplex humano, citomegalovirus, Rotavirus, virus de Epstein – Barr, virus de varicela Zoster, de un virus de hepatitis tales como virus de hepatitis B, virus de hepatitis A, virus de hepatitis C y virus de hepatitis E, de virus respiratorio sincitial, virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de la parotiditis infecciosa, virus del papiloma humano, flavivirus o virus de la influenza, de *Neisseria spp*, *Moraxella spp*, *Bordetella spp*, *Mycobacterium spp*, incluyendo *M. tuberculosis* *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica; *Salmonella spp*, *Listeria spp*; *Helicobacter sp*; *Staphylococcus spp*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Borrelia spp*; *Chlamydia spp*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*; *Plasmodium spp*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp*, *Candida spp*.
8. Una proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6 en la que la proteína heteróloga es una proteína asociada a tumores o proteína específica de tejidos o fragmento inmunogénico de la misma.
9. Una proteína de fusión según la reivindicación 8 en la que la proteína o fragmento heterólogo se selecciona de MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, PRAME, BAGE, LAGE 1, LAGE 2, HAGE, XAGE, PSA, PAP, PSCA, proteína, P501S, HASH2, Cripto, B726, NY-BR1,1, P510, MUC-1, Prostasa, STEAP, tirosinasa, telomerasa, survivin, CASB616, P53 o her 2 neu.
10. Una proteína de fusión según una cualquiera de la reivindicaciones 6 a 9 que comprende una señal de afinidad de al menos cuatro restos de histidina.

11. Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de la reivindicación 1 a 10.
12. Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 11.
13. Un hospedador transformado con una secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 11 o con un vector de expresión de la reivindicación 12.
14. Una composición inmunogénica que comprende una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una secuencia de DNA según la reivindicación 11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Una composición inmunogénica según la reivindicación 14 que comprende adicionalmente un adyuvante que induce TH-1.
16. Una composición inmunogénica según la reivindicación 15 en la que el adyuvante que induce TH-1 se selecciona del grupo de adyuvantes constituido por: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, un oligonucleótido CpG o una mezcla de dos o más de dichos adyuvantes.
17. Un procedimiento para la preparación de una composición inmunogénica según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que comprende la mezcla de la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 o un polinucleótido de codificación de la reivindicación 11 con un adyuvante, diluyente u otro vehículo farmacéuticamente aceptable adecuado.
18. Un procedimiento para producir una proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende el cultivo de una célula hospedadora de la reivindicación 13 en condiciones suficientes para la producción de dicha proteína de fusión y recuperando la proteína de fusión del medio de cultivo.
19. Una proteína de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una secuencia de

DNA de la reivindicación 11 para uso en medicina.

20. Uso de una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una secuencia de DNA de la reivindicación 11 en la fabricación de una composición inmunogénica para inducir una respuesta inmune en un paciente.
21. Uso según la reivindicación 20, en la que dicha respuesta inmune se va a inducir mediante la administración secuencial de i) la proteína dicha seguido de dicha secuencia de DNA; o ii) la secuencia dicha de DNA seguido de la proteína dicha.
22. Uso según la reivindicación 21 en el que dicha secuencia de DNA se recubre sobre perlas biodegradables o se administran mediante un método de bombardeo de partículas.
23. Uso según la reivindicación 21 o reivindicación 22 en el que a dicha proteína se le han añadido adyuvantes.
24. Uso de una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una secuencia de DNA de la reivindicación 11 en la fabricación de una composición inmunogénica para el tratamiento inmunoterapéutico de un paciente que padece o es susceptible de cáncer.
25. Uso según la reivindicación 24 en la que dicho cáncer es cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de mama o melanoma.
26. Un procedimiento para tratar un paciente que padece de cáncer mediante la administración de una cantidad segura y eficaz de una composición según la reivindicación 12.
27. Un procedimiento según la reivindicación 26 en el que dicho cáncer es cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de mama o melanoma.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GlaxosmithKline Biologicals sa
Glaxo Group Ltd

<120> Composiciones inmunogénicas

<130> B45311

<160> 52

<170> FastSEQ para Windows Version 4,0

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 1

Gly Trp Gln Lys Asn Asp Thr Gly Tyr Trp Tyr Val His Ser Asp
1 5 10 15

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 2

Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr
1 5 10 15
Tyr Phe Asp Ser Ser
20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 3

Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp
1 5 10 15
Tyr Trp Phe Asp Asn Ser
20

<210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 4

Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr
1 5 10 15
Phe Asn Glu Glu
20

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 5

Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr
1 5 10 15

Leu Asp Ala Lys Glu
20

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 6
Gly Ala Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly
1 5 10 15
Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp
20

<210> 7
<211> 142
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 7
Gly Trp Gln Lys Asn Asp Thr Gly Tyr Trp Tyr Val His Ser Asp Gly
1 5 10 15
Ser Tyr Pro Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr
20 25 30
Phe Asp Ser Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr
35 40 45
Asp Gly Asn Trp Tyr Trp Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly
50 55 60
Trp Lys Lys Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala
65 70 75 80
Met Lys Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp
85 90 95
Ala Lys Glu Gly Ala Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp
100 105 110
Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg
115 120 125
Pro Glu Phe Thr Val Glu Pro Asp Gly Leu Ile Thr Val Lys
130 135 140

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 8
Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile
1 5 10 15
Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp
20 25 30
Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp Phe Asp Asn Ser
35 40 45
Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr
50 55 60
Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp
65 70 75 80
Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met Val Ser Asn Ala
85 90 95
Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp
100 105 110

<210> 9
<211> 45
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 9

196

ggctggcaga agaatgacac tggctactgg tacgtacatt cagac 45

<210> 10
<211> 63
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 10
ggctcttctc caaaagacaa gttgagaaa atcaatggca ctgggtacta cttgacagt 60
tca 63

<210> 11
<211> 66
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 11
ggctatatgc ttgcagaccg ctggaggag cacacagacg gcaactggta ctggttcgac 60
aactca 66

<210> 12
<211> 60
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 12
ggcgaaatgg ctacaggctg gaagaaaac gctgataagt ggtactatt caacgaaga 60

<210> 13
<211> 63
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 13
ggcgccatga agacaggctg ggtcaagta aaggacacti ggtactacti agacgctaaa 60
gaa 63

<210> 14
<211> 69
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 14
ggcgccatgg tatcaaatgc ctatatccag tcagcggacg gaacaggctg gtactacctc 60
aaaccagac 69

<210> 15
<211> 429
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 15
ggctggcaga agaatgacac tggctactgg tacgtacatt cagacggctc ttatccaaa 60
gacaagtgtg agaaaatcaa tggcacttgg tactactttg acagticagg ctatatgctt 120
gcagaccgct ggaggaagca cacagacggc aactgggtact ggcticgaaa ctacggcgaa 180
atggctacag gctggaagaa aatcgctgat aagtgggtact attcaacga agaagggtcc 240
atgaagacag gctgggtcaa gtacaaggac acttgggtact acttagacgc taaagaaggc 300
gccatgggtat caaatgctt tatccagta gcggacggaa caggctggta ctacctcaa 360
ccagacggaa cactggcaga caggccagaa ttacagtag agccagatgg ctgattaca 420
gtaaaataa 429

<210> 16
<211> 336
<212> DNA
<213> Streptococcus pneumoniae

<400> 16
tacgtacatt ccgacggctc ttatccaaa gacaagtgtg agaaaatcaa tggcacttgg 60
tactactttg acagticagg ctatatgctt gcagaccgct ggaggaagca cacagacggc 120

159

aactggtact ggttcgacaa ctacggcgaa atggctacag gctggaagaa aatcgctgat 180
 aagtggtact atttaacga agaaggtgcc atgaagacag gctgggtcaa gtacaaggac 240
 acttggtact acttagacgc taaagaaggc gccatggtat caaatgcctt tatccagica 300
 gcggacggaa caggctgcta ctacctaaa ccagac 336

<210> 17
 <211> 1674
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gccaccatgg tccagaggct gtgggtgagc cgcctgctgc ggcaccggaa agcccagctc 60
 ttgctggta acctgtaac cttggcctg gaggtgtgtt tggccgagg catcacctat 120
 gtgcccctc tgcgtctgga agtgggggta gaggagaagi lcatgacct ggtgctggc 180
 attggtccag tgcgtggcct ggtctgtgtc ccgtctctag gctcagccag tgaccactgg 240
 cgtggacgct atggccgccg ccggcccttc atcgggcac tgccttggg catcctgtc 300
 agcctcttc lcatccaag ggcgggctgg ctacgagggc tgcgtgccc ggaaccagg 360
 cccctggagc tggcactgct catcctgggc gtggggctgc tggactctg tggccagggtg 420
 tgcctcac cactggaggc cctgctctt gacctcttc gggaccggaa ccactgtgc 480
 caggcctact ctgtctatgc cttatgac agcttgggg gctgcctggg ctacctctg 540
 cctgccatg actgggacac cagtgcctg gcccccacc tgggcacca ggaggagtc 600
 ctcttggcc tgcacacct catctctc acctgcgtg cagccacct gctggtggt 660
 gaggaggcag cgtggggccc caccgagcca gcagaagggc tgcggccc ctctgtgtg 720
 cccactgct gtccatgccc ggcggctg gctttccgga acctgggcgc cctgctccc 780
 cggctgacc agctgtctg ccgatgcc cgcacctgc gccggctct cgtggctgag 840
 ctgtcagct ggaatggcact catgacctc acgtgttt acacggatt cgtgggcgag 900
 gggctgacc agggcgtgccc cagagctgag ccgggcaccg agggccggag acactatg 960
 gaaggcgtc ggaatggcag cctggggctg ttctgcagt gcgccatc cctgtctc 1020
 tcttggta tggaccggt ggtgcagca ttggcactc gagcagtcta ttggccagt 1080
 gtgcagctt tccctgtggc tgcgggtgcc acatgcctg cccacagtgt ggcgggtg 1140
 acagcttcc ccgccctac cgggttacc ttctagccc tgcagatct gccctacaa 1200
 ctggcctccc tctaccacg ggaagacag gtgttctgc ccaataccg aggggacact 1260
 ggagggtcta gcagtaggaa cagcctgatg accagcttc tccaggccc taagcctgga 1320
 gctcccttc ctaatggaa cgtgggtgt ggaggcagt gccgtctcc acctccacc 1380
 gcgctctgc gggcctctgc ctgtatgtc tccgtacgt tgggtgtgg tgagcccacc 1440
 gaggccagg tggttccgg ccggggcact tgcctggacc tcgccatct ggaatgtgc 1500
 ttctgtgt cccagggtgc ccatccctg ttatgggt ccatgtcca gtcagccag 1560
 tctgtact cctatgtgt gtctcgca gccctgggtc tggctgcat ttacttct 1620
 acacagtag tattgacaa ggcgacttg gccaaatct cagcgtaggt ctag 1674

<210> 18
 <211> 1947
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen híbrido entre C-LytA de St. pneum., epítopo auxiliar de T P2 y P501S humano.

<400> 18
 gccaccatgg cggccgctta cgtacatcc gacggctct atccaaaaga caagtttag 60
 aaatcaatg gcacttggta ctacttgac agtccaggct atatgctgc agaccgctg 120
 aggaagcaca cagacggcaa ctgtactgg ttgacaact caggcgaat ggtacaggc 180
 tggaaagaaa tgcgtatga gtgtactat ttaacgaag aaggtgcat gaagacaggc 240
 tgggtcaagt acaaggacac ttgtactac ttgacgcta aagaaggcgc catgcaatc 300
 atcaaggcta acttaagtt catggatc actgaaggc tcatggatc aatgccttt 360
 atccagtac cggacggaa aggctgtac taactaaac cagacggaa actgacagac 420
 aggcagaaa agtcatgta catgtgtc ggcattggtc cagtgtggg cctgtctgt 480
 gtcccgtcc taggtcagc cagtaccac tggcgtggc gctatggcg ccgccggccc 540
 ttcatctgg cactgtcct gggcatcct ctgagcctt ttctatccc aaggccggc 600
 tggctagcag ggtgtctgt cccgatccc aggccctgg agctggcact gctatcctg 660
 ggcgtggggc tgcggactt ctgtggccag gtgtctca ctccactga ggcctgtc 720
 tctgacctt tccgggacc ggaacctgt gccaggcct actgtcta tgcctcatg 780
 atcagtctt ggggtgctt gggctacct ctgcctgcca ttactggga caccagtgc 840
 ctggccccc acctgggac ccaggaggag tgcctcttg gctgtcac cctcatctc 900
 ctacctgc tagcagccac actgtgtgt gctgaggag cagcgtggg cccaccagg 960
 ccagcagaag ggtgtgagg cccctctg tgcctcact gcttccatg cggggcccgc 1020
 ttgcttcc ggaacctgg cccctgctt cccggctgc accagctgt ctgccgatg 1080
 cccgcacc tgcggcgtt ctctgtgt gagctgtca gctggtgac actatgacc 1140
 ttacgtgt ttacacga ttctgtggc gagggtgt accagggct gccagagct 1200
 gagccggca ccaggcccg gagacatat gatgaaggc ttggatggg cagcctggg 1260

ctgttctgc agtgcgcat ctccctggc ttctcttgg tcatggaccg gctggtcag 1320
 cgattcggca ctgcagcagt ctatttggcc agtgtggcag ctctccctgt ggtgcgggt 1380
 gccacatgcc tgtccacag tgtggccgtg gtgacagctt cagccgacct caccgggttc 1440
 accttctcag cctgcagat cctgcccctac acactggcct cctctacca ccgggagag 1500
 cagggtttcc tgcacaaata ccgaggggac actggagggtg ctacagatga ggacagcctg 1560
 atgaccagct tcttccagg cctaagcct ggagctccct tccctaatgg acacgtgggt 1620
 gctggaggca gtggcctgt cccacctca ccgcgcctt gcggggcctc tgcctgtat 1680
 gtctccgtac gtgtgggtgt gggtagccc accgaggcca ggggtgttcc gggccggggc 1740
 atctgcctgg acctcgcat cctggatagt gccttctgc tgtccagggt gggcccatcc 1800
 ctgttatgg gtccattgt ccagtcagc cagtcttca ctgcctatat ggtgtctgcc 1860
 gcaggcctgg gtctgttgc catttactt gctacacagg tagtatitga caagagcgac 1920
 ttggccaaat actcagcga ggtcag 1947

<210> 19
 <211> 1662
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Codón optimizado humano P501S

<400> 19
 atggtgcagc ggcttgggt gagccgctc ctgcggcatc gcaaggccca gctcctgctg 60
 gtgaattgc tcacattcg cctggagggtg tgcctggccg ccggcatcac ctacgtgcc 120
 cccctctgc tggagggtgg agtcaggag aagtcatga caatgggtct gggcatggg 180
 cccgtctgg gcctctgtg cgtgccttc ctggcagcg ctccgacca ttggcgggc 240
 cggatggcc gcaggagacc ctcatctgg gtctgagtc tggcatctt gctgagcctg 300
 ttctgatcc ctggggcgg ctggtggcc gggctgctgt gcccgaacc tggccctg 360
 gagctggccc tctgtatct cggcgtggg ctctggact tctgcggcca ggtgtgttc 420
 acgcccctg aggcactgt ggcgacctg ttccgggacc ccgaccattg ccgccaggcg 480
 tacagctgt acgcttcat gatctcctg ggaggctgcc tgggtacct gtccccgcc 540
 atcgattgg acaccagcg cctgcggccc tctcggaa cacaggagga atgcctgttc 600
 ggattgtga cgtcatctt cctcacgtc gtgcggcca cctgttgtt ggcgaggag 660
 gccgcccctg gggccaccga gccggccgag ggaatgagc ccccgagct gattccacac 720
 tctgtccct gccggggccg cctggccttc cgtaatctgg gcgcccctt gcctcggctc 780
 catcagctgt gttgcagaat gccaggagc ctgcggcgcc tgtctgtgc tgaattgtg 840
 tctggatgg ctctatgac ctacacctg tttaacgg actctgtcg gaggggcctg 900
 taccaggggg tgcgcgcgc cgagcccggg acagaggcg gcgcacaa cagcaggga 960
 gtgcgtatg gtctcctgg cctctcttg cagtgcgcca tcatctgtt ttctctctg 1020
 gtcatgaca ggtgtgtga gcgttcgga accggggcg tttacctgg gagcgtggc 1080
 gccttcccg tggctggcg cggcacttc ctcttact cggtagccgt ggtaccgcc 1140
 agcggcgccc tgaccgggtt cacttctct gccctgcaga ttctgctta caccctggc 1200
 agcctgtacc atcgcgaga acagggttt cttcccaat acagaggca caccggggc 1260
 gcctccagcg aggcagcct catgacctc ttctgcctg gcccgaagc cggcgccct 1320
 ttcccaacg ggcagtggt cgcggcggg agtgggctc tggccccc tctgcgtg 1380
 tgcggggcca gcgcctgca cgtgagcgt cgcgtgttg tggcgagcc caccgagcc 1440
 cgcgtgtgc cggcgagag cattgtctg gacctggca tctcagctc gccttctc 1500
 ctacgcagg tggcccgct cctctcatg ggtctatg tccagctgc tcagagctc 1560
 accgttaca tgggtccg tctgagctg ggttgggtg ctattatt cggcaccag 1620
 gtgtgttgc acaagagca cctggccaa tctccgct ga 1662

<210> 20
 <211> 1662
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Codón optimizado humano P501S

<400> 20
 atggtgcagc ggcttgggt gtccggctg ctgcgcata gaaaggccca gttctgctg 60
 gtgaacctg tgaattcgg actggagggtg tgcctggctg ccggcatcac gtacgtgcc 120
 cccctctgc tggagggtgg cgtggaggag aagtcatga caatgggtct gggcatggc 180
 cccgtctgg gcctctgtg tgtccctc ctgggagtg cgtccatca ttggcgggc 240
 cgtacggcc gccgagacc gtcatctgg gccctgagc tgggatctt gctctctc 300
 ttctgatcc cccggcggg ctggtggcc ggcctgctgt gtccgacc ccgcccctg 360
 gagctggccc tctgtatct gggcgtggg ttgtggact tctgcggca ggtgtgttc 420
 actcccttg aggtctgtc ctccgactc ttccgacc ccgaccattg taggcaggct 480
 tacagctgt acgcttcat gatcagctg ggggatgcc tgggtatct gctcccgct 540
 atcgactgg acaccagcg cctggcccc taccgggga ctcaggagga gtgcctgttc 600

ggcctgtca ccttgatctt cctgacgtgc gtcgcccca cctgtgtgt ggcggaggag 660
 gcggccctgg ggcaccga gcccgccgag gccctgagcg ctccagcct gaggcccat 720
 tctgcccgt gcaggagcag gctgccttc aggaatcgg gcgtttgt gcccgcctg 780
 catcagctgt gctgtcgtat gctcgcacc ctgcgccgc tgttcgtgc tgaactctgt 840
 tcttgatgg cctgatgac gttaccctc ttctacacc acttcgtgg gaggggcctg 900
 taccaggcg tgcacaggc cgagcccgcc accgaggcta ggcgcatia cgacgaggc 960
 gtcaggatgg gctcttggg cctcttcctg cagtgcgcca tcaacttgt gttctctg 1020
 gtgatggacc ggctgtgca gcgttcggc acccgggcg tttacctgc ctctgtggc 1080
 gcttcccg tgcggccg cgagacctg ctgtcatt ctgtgccgt ggtgaccgc 1140
 agcgccgcc tgcaggctt cacttcagt gcgtccaga ttctgacct caccgtggc 1200
 ttctgtacc atcgagaa gcagggttc ctgccagt acccgggga caccgggga 1260
 gcttctgt aggacagct gatgaccg ttctgccc gcccaagcc gggggccct 1320
 ttcccaacg gccatgagg gcggggcg agcgccctg tccctccc cccgccc 1380
 tgcggcgta gtgctgca cgtgagcgt cgggtgtgg tgggggagc caccgagct 1440
 aggtgtgtc ctggccggg gatctgctg gacctggca tctcagct cgcttctg 1500
 ctctccagg tggcgccag cctgtcatg ggcagtatc tgcagctag ccagagcgt 1560
 accgctaca tggtagcgc cgccggcct ggggtgtgg ccatctat tgcaccag 1620
 gtcgtgtc acaagagca tctgccaag tatagcct ga 1662

<210> 21
 <211> 1688
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Codón optimizado humano P501S

<400> 21
 gacggctag gccaccatgg tgcagcggt ctgggtgag cgctctgc ggcacgcaa 60
 ggcacgct ctgctgtga atctgtcac attcgccctg gagggtgccc tggcgccgg 120
 catcactac gtgcccctc tctgctgga ggtgggagtc gaggagagat tcatgacat 180
 ggtgtgtggc attggcccg tctgggctt cgtgtgtgt cctctctc gcagccttc 240
 cgaccatgg cgcgcccg atggccgag gagaccctc atctggctc tgaactcgg 300
 catctgtct agcctgttc tgaactcgc ggcgggctg ctggccggc tctgtgccc 360
 cgactctcg cccctggag tggcctgtc gatctggc gtgggcttc tggactctg 420
 cggcagggt tgttcacgc cctggaggc actgtgagc gacctgttc gggaccgca 480
 ccatgccc caggcgta cgtgtacgc ctcatgat tccctggag gctgctggg 540
 ctactgtc cccgcatg attgggac cagcgact gccctatc tgggaaca 600
 ggaggaatgc ctgtggag tctgacgt catctctc actgtgtg cgccaccct 660
 gtgtgtgccc gaggaggcg cctggggcc caccgagcc gccgaggac tgaagcccc 720
 gacgtgag ccaactgt gccctggc ggcggcctg gccttcga atctgggct 780
 cctctgtct cggctccat agctgtgt cagaatgct aggcgtgc ggcgctgt 840
 cgtgtgtg ttgtctct gatgctct catgacct accctgttt atacgact 900
 cgtggggag ggcctgtacc aggggtgccc gcgcgccg cccgggacg aggcgcgccc 960
 ccactacg gaggagagc gtatggctc cctgggctc ttctgagt gcgcatcag 1020
 tctgtttc tctgtgta tggacagct ggtcagcgc ttgggaacc gggcggtga 1080
 cctggcagc gtggccgct tccccgtgc tgcgggcc acctgctct ctactggt 1140
 ggcgtgttc accgacgc ccgcccgtac cgggttacc ttctgtccc tgcagattc 1200
 gccttacc ctggccagc tttaccatg cgagaacag gtgttctc ccaagtacg 1260
 aggcgacac gggggcgct ccagcgagga cagctcatg acctcttc tccctggcc 1320
 caagcccg gcccttcc caacggga cgtggcgcc ggcgggagtg gctctgccc 1380
 cccctctc gcgtgtgc ggcagcgc ctgcagct agcgtgccc tgggtgtgg 1440
 cgagccacc gaggccgct tgggtggcg cagaggcat tcttgacc tggcatct 1500
 cgactcgc ttctctca gccagggtg cccgtccc ttatgggt ctatgtca 1560
 gctgtcag agcgtacc ctataggt gtccgtgt gactgggt tgggtgtat 1620
 ttattgcc acccaggtg tttgacaa gacgacct gccaatat ccgctgact 1680
 cgaggcag 1688

<210> 22
 <211> 1688
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Codón optimizado humano P501S

<400> 22
 gacggctag gccaccatgg tgcagcggt gtgggtgccc cgctgtgc gccatagaa 60
 ggcacagtg ctgctgtga acctgtgac ttggagct gagggtgccc tggctgccc 120
 gatcacgac gtgccccct tctgtgga ggtggcgtg gaggagagat tcatgacat 180

160

gggtctgggc atcgccccg tcttggcct cgtgtgtgtg cccctctctg ggagtgcgtc 240
 cgtacttgg cggggccgct acggccgccg cagaccgttc atctgggcc ttagcctggg 300
 catctgtctc tctctctcc tcatccccg ggccggctgg ctggccggcc tctgtgtcc 360
 cgacccccg cctctggagc tggccctctt gatctgggc gtgggctgc tggacttctg 420
 cggccagggtg tgttctactc ccttggaggc tctgtctcc gacctctcc gcgaccccg 480
 ccactgtagg caggcttaca gcgtgtacgc ctctatgac agtctggggg gatgcctggg 540
 ctatctgtg cccgtatcg actgggacac cagcgccctg gccccctacc tggggactca 600
 ggaggagtgc ctgttcggcc tgtcacctt gatcttctg acgtgcgtcg ccgccacct 660
 gctgggtggc gaggaggcgg ccttggggcc caccgagccc gccgaggggc ttagcgctcc 720
 cagcctgagc cccattgtt gccctgcag ggctaggctc gccttcagga atctggggc 780
 ttgtgtccc cgcctgcatc agctgtgtg tgcctgctt cgcacctgc gccgctgtt 840
 cgtcgttag ctctgttct ggtggccct gatgacgtc acctcttct acaccgactt 900
 cgtggggag ggccgttacc agggcggtgc caggcccgag ccgggaccc aggttaggcg 960
 ccattagac gagggcgta ggttggctc tctggccct tctctgagt gcgccatcag 1020
 tctgtgttc tctgtgtga tggaccggt ggtgcagcg ttcggcacc gggccgtga 1080
 cctgcctct gtggcggtt tccccgtgc cggcgcgcg acctgcctgt ctattctgt 1140
 cgccgtgtg accgccagcg ccgccctgac cggcttacc ttactgtgc tccagattct 1200
 gccctacac ctgggtctc tttaccatc cgaagagcag gtgttctgc ccaagtacc 1260
 cggggacaca gggggagctt cctttagga cagcctgat accagcttct tgcgggccc 1320
 caagccgggg gccctttcc ccaacggcca tctcggggc ggccggcagc gccgtctcc 1380
 tcccccccc gccctgtgc gcgtagtgc ctgcagcgt agcgtcggg tgggtgtgg 1440
 ggagccacc gaggttaggg tctgtcctg ccgggggac tgcctggacc tggcatcct 1500
 cgactccgc tctctgtct cccagggtgc gccagcctg ttatgggca gtatcgtca 1560
 gctagccag agcgtgacc cctataggt gagcgccgc gccctgggt tggtagccat 1620
 ctacttgc accaggctg tgttgacaa gagcgatc gcgaagata gcgcctgact 1680
 cagggcag 1688

<210> 23
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Gen híbrido entre C-LytA de St. pneum., epítipo auxiliar de T P2 y una pequeña porción del extremo 5' de P501S humano

<400> 23
 atggcgccg ctactgaca ttccgacggc tctatccaa aagacaagt ttagaanaac 60
 aatggcactt ggtactactt tgacagtca ggtatagc ttgcagacc ctggaggaa 120
 cacacagac gcaactgga ctgttcgac aactcaggc aatggctac aggttggaa 180
 aaatcgtct ataagtgtt ctattcaac gaagaagggt ccatgaagac aggttgggt 240
 aagtacaag acatttggta ctacttagc gctaaagaag gcgcatgca atacatcaag 300
 gctaaccta agttcattg taccctgaa ggcgtcatg tatcaaatg ctatccag 360
 ttagcgagc gaacaggctg gtactactt aaaccagac gaacactggc agacaggcca 420
 gaaagtica tttac 435

<210> 24
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Gen híbrido entre C-LytA de St. pneum., epítipo auxiliar de T P2 y una pequeña porción del extremo 5' de P501S humano – codones optimizados

<400> 24
 atggcgccg cctactgca tagcgacggg agctacccca aggacaagt cgagaagatc 60
 aacgggacat ggtactactt cgactctcc ggtatagc tgcggaccg ctggcggaag 120
 cacaccgac gcaactgga ctgttcgac aactcaggc agatggccac cggcttggaa 180
 aagatcgcg acaagtgtt ctattcaac gaggaggcg ccatgaagac cggcttgggt 240
 aagtataag acacctgga ctactcgc gccaggagg gcgcatgca gtatatcaag 300
 gccaacgca agttcattg catcaccgag ggagtgtgg ttagcaacgc ctatccag 360
 agcggcgac gcaccgagt gtactactt aagccggac gcaccctgc ggtatggccc 420
 gagaagtica tttac 435

<210> 25
 <211> 435
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

162

161

<220>

<223> Gen híbrido entre C-LytA de St. pneum., epítipo auxiliar de T P2 y una pequeña porción del extremo 5' de P501S humano – codones optimizados

<400> 25

atggccgccc cctacgtgca cagcgacggg tctacccaa aggacaagt cgagaagatc 60
 aacggcacgt ggtactatt cgacagcagc ggctacatgc tcgccgatcg ctggcgcaag 120
 cacaccgacg ggaactggta ctggttcgac aactctggcg agatggctac ggggtggaag 180
 aagatcgccg acaagtggta ctactcaac gaggagggcg ccatgaagac cgggtgggtg 240
 aagtacaagg acacctggta ctactggac gctaaggagg gcgccatgca gtacatcaag 300
 gccaaactga agttcatgg gatcaccgag ggcgtgatgg ttagtaacgc tticattcag 360
 agcgcgagcg gcacaggctg gtattacctg aagcccgatg gcaccctggc ggacagacct 420
 gagaattica tgtac 435

<210> 26

<211> 464

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gen híbrido entre C-LytA de St. pneum., epítipo auxiliar de T P2 y una pequeña porción del extremo 5' de P501S humano – codones optimizados

<400> 26

gacggctagc gccaccatgg ccgccgcta cgtgcatagc gacgggagct accccaagga 60
 caagtgcag agatcaacg ggaactggta ctacttcgac tcttcggct acatgctgc 120
 cgaccctgg cgaagcaca ccgacggcaa ctggtactgg ttcatgact cggagagat 180
 ggccaccggc tggagaaga tcgcggaaca gtgtactat ttaacgagg agggcgccat 240
 gaagaccggc tgggtgaagt ataaggacac ctggtactac ctgacgcca agagggcgcg 300
 catgcagat atcaaggcca acagcaagt catcgcatc accgaggag tgaatgtcag 360
 caacgcttt atccagagcg ccgacggcac cggatgttac tactgaagc cggacggcac 420
 cctcgccgat cggcccgaga agttcatgta ctgactcgag gcag 464

<210> 27

<211> 652

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína híbrida entre C-LytA de St. pneum., epítipo auxiliar de T P2 y aminoácidos 51 - 53 de P501S humano

<400> 27

Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val
 100 105 110
 Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys Phe Met
 130 135 140
 Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg
 165 170 175
 Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe
 180 185 190
 Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro

164

195 200 205
 Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp
 210 215 220
 Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile
 260 265 270
 Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu
 275 280 285
 Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala
 290 295 300
 Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His
 340 345 350
 Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala
 355 360 365
 Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr
 370 375 380
 Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro
 385 390 395 400
 Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser
 405 410 415
 Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val
 420 425 430
 Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala
 435 440 445
 Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His
 450 455 460
 Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe
 465 470 475 480
 Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg
 485 490 495
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro
 515 520 525
 Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu
 530 535 540
 Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser
 545 550 555 560
 Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly
 565 570 575
 Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu
 580 585 590
 Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser
 595 600 605
 Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val
 610 615 620
 Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ser Ala Gly Gly His His His His His His
 645 650

<210> 28
 <211> 1959
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica la proteína híbrida entre C-LytA de St. pneum.,
 epítipo auxiliar de T P2 y los aminoácidos 51-553 de P501S
 humano

<400> 28

162

165

163

atggcggcgg ctatcgtaca ttccgacggc tcttatccaa aagacaagtt tgagaaaatc 60
 aatggcactt ggtactactt tgacagthca ggctatatgc ttgcagaccg ctggaggaag 120
 cacacagacg gcaactggta ctggttcgac aactcaggcg aatggctac aggcgggaag 180
 aaaatcgtg ataagtgga ctatttaac gaagaaggcg ccatgaagac aggcgggctc 240
 aagtacaagg acacttggta ctacttagac gctaaagaag gcgcatgca atacatcaag 300
 gctaaactta agtcatgg tatcactgaa ggcgctatgg tatcaaatgc ctttatccag 360
 tcagcggacg gaacaggctg gtactacctc aaaccagacg gaacactggc agacaggcca 420
 gaaaagthca tgtacatggt gctgggcatt ggtccagtgc tggccctggt ctgtgtcccg 480
 ctcttaggct cagccagtga ccactggcgt ggacgctatg gcgcccggcg gcccttcatc 540
 tgggcactgt ccttgggcat cctgctgagc ctcttttca tccaaggcg cggctggcta 600
 gcaggcgctg tgtgccgga tccaggccc ctgagctgg cactgctcat cctggcgctg 660
 gggctgctg acttctggtg ccagggtgct ttacctccac tggaggccct gctctctgac 720
 ctcttccggg acccggacca ctgtcgccag gctactctg tctatgctt catgatcagt 780
 ctgggggct ccttgggcta cctctgctt gccattgact ggacaccag tggcctggcc 840
 ccttacttgg gcacccagga ggagtgcctc ttggcctgc tcacctcat ctctctacc 900
 tgcgtagcag ccacactgct ggtggctgag gaggcagcg tggcccccac cagccagca 960
 gaaggcgctg cggcccccct ctgtcgccc cactgctgt catgccggcg ccgctggct 1020
 ttccgaacc tggcgccct gcttcccgg ctgcaccagc tgtctgccc catgccccg 1080
 accctggcc ggtcttctgt ggtgagctg tgcagctga tggcactcat gaccttacc 1140
 ctgttttaca cggatttctt gggcgagggg ctgtaccagg gcgtgccag agctgagccg 1200
 ggcaccgagg cccggagaca ctatgatga ggcttccga tggcagcct gggctgttc 1260
 ctgcagtgcg ccacttccct ggtcttctt ctggctagg accgctggt gcagcgatc 1320
 ggcactcag cagcttattt ggccagtgt gcagcttcc ctgtgctgc cgtgcccaca 1380
 tgctgtccc acagtgtggc cgtggtgaca gctcagccg cctcaccgg gttacctc 1440
 tcagccctgc agatcttct ctacacactg gcttccctt accaccggga gaagcaggtg 1500
 ttctgtccca aataccgagg gacactgga ggtgctaga gtgaggacag cctgatgacc 1560
 agcttctgc caggccctaa gcttggagct ccttcccta atggacactt ggtgtctgga 1620
 ggcagtggcc tgcctccacc tccaccgcg ctctcgggg ccttgcctg tgatgtccc 1680
 gtacgttgg tgggtggta gccaccgag gccagggtg ttccggcgcg ggcacttgc 1740
 ctggacctg ccactctgga tagtgcctc ctgtctccc aggtggccc atccctgtt 1800
 atggctcca ttgtcagct cagccagct gtactgctt atatggtg tggcgagcg 1860
 ctgggtctg tggcatita ctgtctaca caggtagtat ttgacaagag cgacttggc 1920
 aaatactag cgggtggaca ccataccat caccatata 1959

<210> 29

<211> 507

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P501S humano (aminoácidos 55-553) fusionado a 6 restos de histidina

<400> 29

Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro Leu
 1 5 10 15
 Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg Arg
 20 25 30
 Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe Leu
 35 40 45
 Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro Arg
 50 55 60
 Pro Leu Glu Leu Ala Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp Phe
 65 70 75 80
 Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp Leu
 85 90 95
 Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala Phe
 100 105 110
 Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Asp
 115 120 125
 Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu Cys
 130 135 140
 Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala Thr
 145 150 155 160
 Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala Glu
 165 170 175
 Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg Ala
 180 185 190
 Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His Gln
 195 200 205

166

164

Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala Glu
 210 215 220
 Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr Asp
 225 230 235 240
 Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro Gly
 245 250 255
 Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser Leu
 260 265 270
 Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val Met
 275 280 285
 Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala Ser
 290 295 300
 Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His Ser
 305 310 315 320
 Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe Ser
 325 330 335
 Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg Glu
 340 345 350
 Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro Gly
 370 375 380
 Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu Leu
 385 390 395 400
 Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser Val
 405 410 415
 Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly Arg
 420 425 430
 Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu Ser
 435 440 445
 Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser Gln
 450 455 460
 Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val Ala
 465 470 475 480
 Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala Lys
 485 490 495
 Tyr Ser Ala Gly Gly His His His His His His
 500 505

<210> 30

<211> 1524

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA que codifica P501S humano (aminoácidos 55-553)
 fusionado a 6 restos de histidina

<400> 30

atgtgtctgg gcatgtgtcc agtctctggc ctgtgtctgtg tcccgtctct aggtctagcc 60
 agtgaccact ggcgtggacg ctatggccgc ccccgccct tcatctgggc actgtcttg 120
 ggcattctgc tgagccctt tctatccca agggccggct agctagcagg gctgtgtgc 180
 ccgatccca ggcctctga gctggcactg ctatctctgg gctggggct gctggactc 240
 tgtggccagg tgtgttcac tccactggag gccctgtct ctgacctt cgggacctg 300
 gaccactgc gccaggccta ctgtgtat gccctcatga tcatcttg gggctgctg 360
 ggtacctcc tgcctgcat tgcctggac accagtccc tgccccct cctgggcacc 420
 caggaggagt gcccttgg cctgtcacc ctatctcc taccctgct agcagccaca 480
 ctgtgtggg ctgaggagg agcgtggg cccaccgag cagcagaagg gctgtgggc 540
 cctctctgt cgcctcactg ctgtcatgc cgggccgct tggcttccg gaacctggc 600
 gccctgtc cccgctgca ccagctgtg tgcgcatg cccgacct gcgcggctc 660
 ttcgtggctg agctgtcag ctggtggca ctatgacct taccgtgt ttacaggat 720
 ttcgtggcg agggctgt ccaggcggtg cccagagct agccgggcac caggcccg 780
 agacactatg atgaaggct tggatggg agcctgggg tttctctga gtgcgccatc 840
 tccctggt tctctctgt catggaccg ctgtgcagc gaticggcac tggagcgtc 900
 tatttgcca gtgtggcag tttccctgt gctgccagt ccacatgct gtcccacagt 960
 gtggccgtg tgacagctc agccgccct accgggttca ccttctcag cctgcagatc 1020
 ctgccctaca cactggcct cctctaccac cgggagaag aggtgttct gcccaatac 1080
 cgaggggaca ctggaggctc tagcagtga gacagccta tgaccagct cctgccaggc 1140
 cctaagcctg gagctccct ccctaattga cactgggtg ctggaggcag tggcctgctc 1200

167

ccacctccac ccgcgctctg cggggccctt gctgtgatg tctccgtacg tgtggtggtg 1260
 ggtgagccca ccgagggccag ggtggttccg ggccggggca tctgcctgga cctcggcatc 1320
 ctggatggtg ccttctgct gtcacagtg gcccatccc tgttatggg ctccattgtc 1380
 cagctcagcc agtctgtcac tgcctatag gtgtctgcc caggccctgg tctggtgcc 1440
 atttactttg ctacacaggt agtatttgac aagagcgact tggccaata ctacaggggt 1500
 ggacaccatc accatcacca ttaa 1524

<210> 31

<211> 685

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P501S humano (aminoácidos 1-34 fusionados a los 55-553)
 fusionado a 6 restos de histidina

<400> 31

Met Ala Ala Val Gln Arg Leu Trp Val Ser Arg Leu Leu Arg His Arg
 1 5 10 15
 Lys Ala Gln Leu Leu Leu Val Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu Glu Val
 20 25 30
 Cys Leu Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp
 35 40 45
 Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly
 50 55 60
 Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr
 65 70 75 80
 Trp Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala
 85 90 95
 Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp
 100 105 110
 Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala
 115 120 125
 Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly
 130 135 140
 Val Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp
 145 150 155 160
 Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys Phe
 165 170 175
 Met Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val
 180 185 190
 Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg
 195 200 205
 Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu
 210 215 220
 Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp
 225 230 235 240
 Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu
 245 250 255
 Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser
 260 265 270
 Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr
 275 280 285
 Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala
 290 295 300
 Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu
 305 310 315 320
 Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala
 325 330 335
 Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro
 340 345 350
 Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys
 355 360 365
 Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu
 370 375 380
 His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val
 385 390 395 400
 Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr
 405 410 415
 Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu

420 425 430
 Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly
 435 440 445
 Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu
 450 455 460
 Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu
 465 470 475 480
 Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser
 485 490 495
 His Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr
 500 505 510
 Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His
 515 520 525
 Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly
 530 535 540
 Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys
 545 550 555 560
 Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly
 565 570 575
 Leu Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val
 580 585 590
 Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro
 595 600 605
 Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu
 610 615 620
 Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu
 625 630 635 640
 Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu
 645 650 655
 Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu
 660 665 670
 Ala Lys Tyr Ser Ala Gly Gly His His His His His His
 675 680 685

<210> 32

<211> 2058

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA que codifica P501S humano (aminoácidos 1-34 fusionados a los 55-553) fusionado a 6 restos de histidina

<400> 32

atggcggccg tgcagaggct atgggtatcg agactgctaa gacaccgcaa agctcagttg 60
 ttgttggtta acttggtgac ctccgggctg gaagctgtgt tggcggccgc ttacgtacat 120
 tccgacggct ctatccaaa agacaagtt gagaaatca atggcacttg gtactacttt 180
 gacagttcag gctatgtct tgcagaccgc tggaggaaac acacagacgg caactggtag 240
 tggttcgaca actcaggcga aatggctaca ggctggaaga aaatcgctga taagtggtag 300
 tatttcaacg aagaagggtc catgaagaca ggctgggtca agtacaagga cacttggtag 360
 tacttagacg ctaaaagaag cgcctatcaa tacatcaagg ctactcttaa gtccattgtg 420
 atcactgaag gcgtatggt atcaaatgcc ttatccagt cagcggacgg aacaggctgg 480
 tactaccica aaccagacgg aacactggca gacaggccag aaagtticat gtacatggg 540
 ctgggcattg gtccagtgt gggcctggc tgtgtccgc tctaggctc agccagtac 600
 cactggcgtg gacgctatg ccgccgccg cccttcatct gggcactgtc ctgggcatc 660
 ctgtgagcc tcttttcat cccaaggcc ggctggctag cagggtgtgt gtgccggat 720
 cccaggcccc tggagctggc actgctatc ctgggcgtg ggctgtgga ctctgtggc 780
 caggtgtgtc tcatccact ggaggccctg ctcttgacc tctccggga cccggaccac 840
 tgtgccagg cctactctgt ctatgcttc atgacagtc ttggggctg cctgggtag 900
 ctctgcctg ccattgactg ggacaccagt gccctggccc cctacctggg caccagag 960
 gagtgcctt ttggcctgt caccctcat tcttacctt gcgtagcag cactgtgtg 1020
 gtggctgagg aggcagcgtt gggccccacc gagccagcag aagggtgtc ggccccctc 1080
 ttgtgcccc actgtgttc atgccggcc cgttggctt tccggaacct gggcgcctg 1140
 ctccccggc tgcaccagt gtgtgccc atgcccgca cctgtgccg gctcttctg 1200
 gctgagctgt gcagctgat ggcactatg acctcaagc tgttttacc ggatttctg 1260
 ggcgagggc tgtaccagg cgtgcccaga gctgagccg gcaccgagc cggagacac 1320
 tatgatgaag gcgttcggat gggcagcctg gggtgttcc tgcagtgcg catctccctg 1380
 gtcttctc ttgtcatga ccggctgtg cagcgattc gcactgagc agtctattg 1440
 gccagtgtg cagcttccc tgtggctgcc ggtgccacat gcctgtcca cagtgtggc 1500

gttgtgacag cttagccgc cctaccggg ttaccttct cagccctga gatcctgcc 1560
 tacacactgg cctccctcta ccaccggag aagcagggtg tctgcccaa ataccgggg 1620
 gacactggag gtgctagcag tggagacag ctagtacca gcttctgcc aggccttaag 1680
 cctggagctc cctccctaa tggacacgtg ggtgctggag gcagtggct gctccacct 1740
 ccaccgcgc tctcggggc cctgcctgt gatgttccg tacgtgtgt ggtgggtgag 1800
 cccaccgagg ccagggtgt tccgggccc ggcattgcc tggacctgc catctggat 1860
 agtgccttc tctgttcca ggtggccca tccctgtha tggctccat tgtccagtc 1920
 agccagtctg tctgtccca tatgtgtct gccgcaggcc tgggtctgt cgccattac 1980
 ttgtctacac aggtagtatt tgacaagagc gactggcca aatactcagc ggtggacac 2040
 catcaccatc accattaa 2058

<210> 33

<211> 671

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Porción C-LytA de St. pneum. fusionada al epítopo auxiliar de T

P2 fusionada a P501S humano (aminoácidos 55-553)

fusionado a 6 restos de histidina cadena abajo de la secuencia señal alfaprepro de levaduras

<400> 33

Met Ala Ala Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala
 1 5 10 15
 Ser Ser Ala Leu Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro
 20 25 30
 Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser
 35 40 45
 Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn
 50 55 60
 Trp Tyr Trp Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys
 65 70 75 80
 Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr
 85 90 95
 Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu
 100 105 110
 Gly Ala Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
 115 120 125
 Glu Gly Val Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr
 130 135 140
 Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu
 145 150 155 160
 Lys Phe Met Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val
 165 170 175
 Cys Val Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr
 180 185 190
 Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu
 195 200 205
 Ser Leu Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys
 210 215 220
 Pro Asp Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Leu Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu
 245 250 255
 Leu Ser Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser
 260 265 270
 Val Tyr Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu
 275 280 285
 Pro Ala Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr
 290 295 300
 Gln Glu Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys
 305 310 315 320
 Val Ala Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr
 325 330 335
 Glu Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys
 340 345 350
 Pro Cys Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro
 355 360 365
 Arg Leu His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu
 370 375 380

Phe Val Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu
 385 390 395 400
 Phe Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg
 405 410 415
 Ala Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg
 420 425 430
 Met Gly Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe
 435 440 445
 Ser Leu Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val
 450 455 460
 Tyr Leu Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys
 465 470 475 480
 Leu Ser His Ser Val Ala Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly
 485 490 495
 Phe Thr Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu
 500 505 510
 Tyr His Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr
 515 520 525
 Gly Gly Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly
 530 535 540
 Pro Lys Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly
 545 550 555 560
 Ser Gly Leu Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys
 565 570 575
 Asp Val Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val
 580 585 590
 Val Pro Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala
 595 600 605
 Phe Leu Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val
 610 615 620
 Gln Leu Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu
 625 630 635 640
 Gly Leu Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser
 645 650 655
 Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Ala Gly Gly His His His His His His
 660 665 670

<210> 34

<211> 2477

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA que codifica la porción C-LyA de St. pneum. fusionada al
 epítopo auxiliar de T P2 fusionado a P501S humano
 (aminoácidos 55 - 553) fusionado a 6 restos de histidina cadena
 abajo de la secuencia señal alfa prepro de levaduras

<400> 34

tacgtacatt ccgacggctc ttatccaaa gacaagttg agaaaatcaa tggcacttgg 60
 tactactttg acagttcagg ctatatgctt gcagaccgct ggaggaagca cacagacggc 120
 aactggtact ggctcgacaa ctacggcgaa atggctacag gctggaagaa aatcgctgat 180
 aagtggctact attcaacga agaaggtgcc atgaagacag gctgggtcaa gtacaaggac 240
 acttggctact acttagacgc taaagaaggc gccatgcaat acatcaaggc taactctaag 300
 ttcatggta tcactgaagg cgtcatggta tcaaatgcct ttatccagtc agcggacgga 360
 acaggctggt actacctcaa accagacgga acactggcag acaggccaga aatggcggcc 420
 agatttcctt caatttttac tgcagtttta ttgcagcat cctccgcatt agcggccgct 480
 tacgtacatt ccgacggctc ttatccaaa gacaagttg agaaaatcaa tggcacttgg 540
 tactactttg acagttcagg ctatatgctt gcagaccgct ggaggaagca cacagacggc 600
 aactggtact ggctcgacaa ctacggcgaa atggctacag gctggaagaa aatcgctgat 660
 aagtggctact attcaacga agaaggtgcc atgaagacag gctgggtcaa gtacaaggac 720
 acttggctact acttagacgc taaagaaggc gccatgcaat acatcaaggc taactctaag 780
 ttcatggta tcactgaagg cgtcatggta tcaaatgcct ttatccagtc agcggacgga 840
 acaggctggt actacctcaa accagacgga acactggcag acaggccaga agctggtatt 900
 acttacgttc caccattgtt gttggaagtt ggtgttgaag aaagttcat gtacatggtg 960
 ctgggcattg gtccagtgtc gggcctgttc tgtgtccgc tctaggctc agccagtac 1020
 cactggcgtg gacgctatgg ccgcccggg ccttcatct gggcactgtc ctgggcate 1080
 ctgctgagcc tcttttcat cccaagggcc ggctggctag caggctgct gtgcccggat 1140
 cccaggcccc tggagctggc actgtctatc ctggcgtgg ggtgttga cttctgtgc 1200

caggtgtgct tcaatccact ggaggccctg ctctctgacc tcttccggga cccggaccac 1260
 tgtgccagg cctactctgt ctatgcttca tgatcagctt tgggggctgc ctgggctacc 1320
 tcttgcctgc catgacttgg gacaccagtg ccttggcccc ctacctgggc acccaggagg 1380
 agtgcctctt tggctgctc accctcatct tcttaccctg cgtagcagcc acactgctgg 1440
 tggctgagga ggcagcgtg ggcgccaccg agccagcaga agggctgtcg gcccctct 1500
 tgtgcccca ctgtcttcca tgcggggccc gcttggcttt ccggaaacctg ggcgcccctg 1560
 tccccggct gcaccagctg tcttgcgcga tgcgccgcac cctgcgcggg ctcttctggg 1620
 ctgagctgtg cagctggatg gcactcatga ccttcacgct gttttacag gatttctgg 1680
 gcgaggggct gtaccagggc gtgccagag ctgagccggg caccgaggcc cggagacact 1740
 atgatgaagg cgttggatg ggcagcctgg gctgttctt gcagtgcgc atctccctgg 1800
 tcttctctt ggtcatggac cggctgtgct agcgattcgg cactcagca gttatttgg 1860
 ccagtgtggc agctttcct gtgctgccc gtgccatg cctgtccac agtgtggccg 1920
 tggtagacgc ttacggccc ctaccgggt tcaacttct agccttcag atctgcct 1980
 acacactgct ctcccctac caccgggaga agcaggtgtt cctgcccana taccgagggg 2040
 acactggagg tctagcagt gaggacagcc tgatgaccag ctcttgcga ggcctaac 2100
 ctggagctcc ctccctaat ggacacgtg gtgctggagg cagtggcctg ctccacctc 2160
 caccgcgct ctgcggggc tctgcctgt atgttccgt acgtgtgtg gtgggtgagc 2220
 ccaccgagc caggtgtgt ccgggcccgg gcactgcct ggacctgcc atcttgata 2280
 gtgcttctt gctgtccag gtggcccat cctgtttat gggctcatt gtccagctca 2340
 gccagctgt cactgcctat atgtgtctg ccgcaggcct gggctgtgt gccattact 2400
 ttgtacaca ggtagtatt gacaagagc acttgccaa atactagcg ggtggacac 2460
 atcaccatca ccaataa 2477

<210> 35

<211> 595

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P501S humano (aminoácidos 55-553) fusionado a 6
 restos de histidina cadena abajo de la secuencia señal
 alfaprepro de levaduras

<400> 35

Met Ser Phe Leu Asn Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile
 20 25 30
 Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe Asp
 35 40 45
 Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe
 50 55 60
 Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser
 65 70 75 80
 Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val
 85 90 95
 Leu Gly Leu Val Cys Val Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp
 100 105 110
 Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu
 115 120 125
 Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala
 130 135 140
 Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile
 145 150 155 160
 Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro
 165 170 175
 Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg
 180 185 190
 Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu
 195 200 205
 Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile
 225 230 235 240
 Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala
 245 250 255
 Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser
 260 265 270
 Pro His Cys Cys Pro Cys Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly
 275 280 285

Ala Leu Leu Pro Arg Leu His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr
 290 295 300
 Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met
 305 310 315 320
 Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln
 325 330 335
 Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp
 340 345 350
 Glu Gly Val Arg Met Gly Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile
 355 360 365
 Ser Leu Val Phe Ser Leu Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly
 370 375 380
 Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala
 385 390 395 400
 Gly Ala Thr Cys Leu Ser His Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala
 405 410 415
 Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr
 420 425 430
 Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr
 435 440 445
 Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser
 450 455 460
 Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val
 465 470 475 480
 Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly
 485 490 495
 Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr
 500 505 510
 Glu Ala Arg Val Val Pro Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile
 515 520 525
 Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met
 530 535 540
 Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser
 545 550 555 560
 Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val
 565 570 575
 Phe Asp Lys Ser Asp Ser Ala Lys Tyr Ser Ala Gly Gly His His His
 580 585 590
 His His His
 595

<210> 36
 <211> 1788
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica P501S humano (aminoácidos 55-553)
 fusionado a 6 restos de histidina cadena abajo de la
 secuencia señal alfaprepro de levaduras

<400> 36
 atgagtttcc tcaattttac tgcagtttta ttgcagcat cctccgcatt agctgtcca 60
 gtcaacacta caacagaaga tgaacggca caaatccgg ctgaagctgt catcggttac 120
 tcagatttag aaggggattt cgaatgtgt gttttgcat ttccaacag cacaattaac 180
 ggggtattgt ttataaatat tactatigcc agcaatgctg ctaagaaga aggggtatct 240
 ctgagaaaa gagaggctga agccatggtg ctgggcattg gtccagtgt gggcctggtc 300
 tgtgtccgc tcttaggctc agccagtac cactggcgtg gacgtatgg ccgcccggcg 360
 cccctcatct gggcactgtc ctgggcctc ctgctgagcc tcttttcat cccaagggcc 420
 ggctggctag caggctgtct gtgccggat ccagggccc tggagctggc actgtctatc 480
 ctgggcgtgg ggctgctgga ctctgtggc caggtgtgt tcactcaact ggaggccctg 540
 ctcttgacc tcttcggga ccggaccac tctgccagg cctactctgt ctatgccttc 600
 atgatcagtc ttggggctg cctgggctac ctctgcctg ccattgactg ggacaccagt 660
 gccctggccc cctacctggg caccagggag gattgcctct ttggcctgct caccctcatc 720
 ttcttacct gcgtagcagc cacactgtg gtggctgagg aggcagcgt gggcccccacc 780
 gagccagcag aagggtgtc ggccccctc ttgtgcccc actgtgttc atgccgggcc 840
 cgcttgctt tccggaacct ggcgccctg ctccccggc tgcaccagct gtgtgcccgc 900
 atgccccga ccttgcggc gctcttcgtg gctgagctgt gcagctggat ggcactcatg 960
 acctcacgc tgttttacac ggatttctg ggcgaggggc tgtaccagg cgtgcccaga 1020

170

177

171

gctgagccgg gcaccgaggg ccggagacac tatgatgaag gcgttcggat gggcagcctg 1080
 gggctgttcc tgcagtgcgc catctccctg gtcttctctc tggatcatga ccggctgggtg 1140
 cagcgatttc gcactcgagc agtctatttg gccagtgtgg cagcttccc tgtggctgcc 1200
 ggtgccacat gccgttcca cagtgtggcc gtggtgacag cticagccgc cctcaccggg 1260
 ttacacctct cagccctgca gatctgccc tacacactgg cctccctcta ccaccgggag 1320
 aagcaggtgt tctgcccac ataccgaggg gacactggag gtgctagcag tggagacagc 1380
 ctgatgacca gcttctgcc aggccctaag cctggagctc ccttccctaa tggacacgtg 1440
 ggtgtcggag gcaagtggct gtctccacct ccaccggcg tctgaggggc ctctgctgt 1500
 gatgttccg tacgtgtgtt ggtgggtgag ccaccgagg ccagggtgtt tccgggccgg 1560
 ggcacttccc tggacctcgc catctggat agtgccttcc tctgttcca ggtggcccca 1620
 tccctgttta tgggtcccat tgtccagctc agccagcttg tcactgccta taiggtgtct 1680
 gccgagggcc tgggtctgtt cgcatttacc ttgtctacac aggtagtatt tgaagagc 1740
 gacttgcca aatactcagc ggggtgacac catcaccatc accattaa 1788

<210> 37
 <211> 1955
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> DNA que codifica P501S humano con codones optimizados
 (aminoácidos 51-553) fusionado al epítipo auxiliar P2 de C-Lyta
 de St. Pneum.

<400> 37
 gcggccggcg caccatggcc gccgcctacg tgcatacgca cgggagctac cccaaggaca 60
 agtctgagaa gatcaacggg acatgttact acttcgacit ctcgggctac atgtctggcg 120
 accgctggcg gaagcacacc gacggcaact ggtactggtt cgtactctg ggaagatgg 180
 ccaccggctg gaagaagatc gcggacaagt ggtactattt caacgaggag ggcgccaatga 240
 agaccggctg ggtgaagtat aaggacacct ggtactacct cgacggcaag gaggggcgca 300
 tgcagtatat caaggccaac agcaagttca tgggcatcac cgaggagtg atgttcagca 360
 acgctttat ccagagcgcc gacggcaccg gatgtacta ctgaagccg gacggcacc 420
 tgcggatcg gcccgagaag ttcatgtaca tgggtctggg catcgccccc gtcttggggc 480
 tctgtgtgtt gcccctctc gggagtgcgt cgtatcttg gcggggccgc tacggccgcc 540
 gcagaccgtt catctggggc ctgagccctg gcatcctgt ctctctctc ctgaccccc 600
 gggccggctg ctgctggggc ctgtctgtc ccgaccccg cctctggag ctggccctc 660
 tcatctggg cgtgggctg ctggactct cggccaagt gtgttact cctctggagg 720
 ctctgtctc cgacctctc cgcgaccccg accactgtg gcaggcttac agcgtgtacg 780
 cctcatgat cagtctggg ggaigcctg gctatctgt gcccgctac gactgggaca 840
 ccagcgccct gggccctac ctggggactc aggaggagt cgtttcggc ctgctacct 900
 tcatctctt gacgtgcgt gccgcaacc tctgtgtgc cgaggaggcg gccctggggc 960
 ccaccgagcc cgcgagggc ctgagcgct ccagcctgag ccccatgct tgcctgtca 1020
 gggctaggct cgcctcagg aatctgggcg ctgtctgcc ccgctgcat cagtgtgt 1080
 gtctgatcc tgcaccctg cgcgctgt tctgtctga gctctgttc tggatggccc 1140
 tcatgacgt caccctctc tacaccgact tctggggga gggcctgtac caggcgctgc 1200
 ccaggggcga gcccggcacc gaggctagg gccattaca cgaggggctc aggatgggt 1260
 ctctgggct ctctctcag tgcgcatca gtctgtgt ctctctgtg atggaccggc 1320
 tggtcagcg cticggcacc cgggcccgtt acctgcctc tgtggggct tccccgtc 1380
 ccgcccggcg gacctgctg tctattctg tgcggtgtt gaccggcag gccgcccga 1440
 ccggttcc cticagtgc ctccagatc tgccttacc cctggcgtct ctgtaccatc 1500
 gcgagaagca ggtgttctg cccaagacc gcggggacac agggggagct tctctgagg 1560
 acagcctgat gaccagctc ttgccggcc ccaagccggg ggccccttc ccaacggcc 1620
 atgtcggggc gggcggcagc ggcctgtct cccccccc cgcctgtgc ggcctagt 1680
 cctgcagct gacgtgcgg gtgtgtgtg gggagccac cgaggctagg gtctgtctg 1740
 gccgggggat ctgcttgac ctggccatc tgcactcgc ctctctctc tccagggtg 1800
 cggccagct gtcatgggc agtatctgc agctgagcca gacgtgacc gccatcatg 1860
 tgagcgccg cggcctggg tgggtgcca tctacttgc caccaggtc gtgttcgaca 1920
 agagcgatct cgccaagat agcgccctg gatcc 1955

<210> 38
 <211> 2045
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica P501S humano con codones optimizados
 (aminoácidos 1-553) fusionado al epítipo auxiliar P2 de C-Lyta
 de St. Pneum.

<400> 38

174

gggggcgcg caccatggcc gccgcctacg tgcatagcga cgggagctac cccaaggaca 60
 agtctgagaa gatcaacggg acatggctact acttcgactc ctccggctac atgctcggcg 120
 accgctggcg gaagcacacc gacggcaact ggtactgggt cgataactcg ggagagatgg 180
 ccaccggctg gaagaagatc gcggacaagt ggtactatit caacgaggag ggcgcatga 240
 agaccggctg ggtgaagtat aaggacacct ggtactacct cgacgccaag gaggcgcca 300
 tgcagtatat caaggccaac agcaagtca tggcatcac cgaggagtg atggtagca 360
 acgccttat ccaggcgcc gacggcaccg gatgtacta ctgaagccg gacggcacc 420
 tcgggagtcg gcccgagatg gtgcagcggc tgtgggtgtc ccggctgtcg cgccatagaa 480
 agggccagt gtgtgtgtg aacctgtga cttcggact ggagggtgtc ctggctggcg 540
 tggtagtggg catcggcccc gtctggggc tctgtgtgt gccctcttc gagggtgct 600
 ccgacttg gcggggcgcc tacggccgcc gcagaccgt catctgggc ctgagcctgg 660
 gcatctgt ctctcttc ctgacccc gggcgggctg gctggccgc ctgtgtgtc 720
 ccgaccccc cctctggag ctggcccttc tgatctggg ctggggctg ctgacttct 780
 gcggccagt gtgttact cccctggag ctctcttc cgaccttc cgcgacccg 840
 accactgt gcaggctac agcgtgtac cctcatgat cagtctggg gtagcctgg 900
 gctatctgt gcccgctac gactgggaca ccagcgccct ggccccctac ctgggactc 960
 aggaggagt cctgttggc ctgtcacct tgatctct gactgtgtc gccgccacc 1020
 tctgtgtg cgaggaggcg gccctggggc ccaccgagcc cgccgaggc ctgagcgtc 1080
 ccagcctg ccccatgtc tggcggtga gggctaggct cgcctcagg aatctggcg 1140
 ctgtgtgc ccgctgtcat cagtgtgt gtcgcatgcc tgcacccgt cgccgctgt 1200
 tctgtgtga gctgtgtc tggatggccc tgatgaggt cacccttc tacaccgact 1260
 tctggggga gggctgtac caggcggtc ccaggcgga gccgggacc gaggctagg 1320
 gccatcga cgaggcgct aggatgggt ctctgggt ctctctcag tgcgcatca 1380
 gctgtgtt ctctgtgt atgaccggc tggtagcgc ctgcgacc cgggcggtg 1440
 accctgtc tgtgtgtt tcccgctc ccggcgccg gactgtctg tctatctg 1500
 tgcgctgt gacggcagc gccgcccga ccgcttacc ctacgtgtc ctccagatc 1560
 tgccttacc cctggcgt ctgtaccac gcgagaagca ggtgttctg cccaagtacc 1620
 gcggggcac agggggagt tctctgag acagcctgt gaccagctc ttgccggcc 1680
 ccaagccgg gggcccttc ccaacggcc atgtggggc gggcggcagc ggctgtctc 1740
 ctcccccc cgccctgtc ggcgtagtg cctgcagct gacgtgtcg gtagtggg 1800
 gggagccac cgagcctag gtcgtgtc gccggggat ctgctggac ctgacatc 1860
 tgcactcc ctctgtc tccaggtg gcccgacct gtatgtggc agtatgtc 1920
 agctagcca gacgtgacc gctacatg tagcgccgc cggcctggg ttgtagcca 1980
 tctatctg caccaggct gtgtcgaca agagcgatc cgccaagt atgcgctgag 2040
 gatcc 2045

<210> 39
 <211> 2105
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica el epítopo auxiliar P2 de C-Lyta de
 St. Pneum. fusionado a P501S humano
 (aminoácidos 51-553) fusionado P510S humano (aminoácidos 1 – 50)
 - con codones optimizados

<400> 39
 gggggcgcg caccatggcc gccgcctacg tgcatagcga cgggagctac cccaaggaca 60
 agtctgagaa gatcaacggg acatggctact acttcgactc ctccggctac atgctcggcg 120
 accgctggcg gaagcacacc gacggcaact ggtactgggt cgataactcg ggagagatgg 180
 ccaccggctg gaagaagatc gcggacaagt ggtactatit caacgaggag ggcgcatga 240
 agaccggctg ggtgaagtat aaggacacct ggtactacct cgacgccaag gaggcgcca 300
 tgcagtatat caaggccaac agcaagtca tggcatcac cgaggagtg atggtagca 360
 acgccttat ccaggcgcc gacggcaccg gatgtacta ctgaagccg gacggcacc 420
 tcgggagtcg gcccgagaag tcatgtaca tgggtgtgg catcggcccc gtctggggc 480
 tctgtgtgt gccctcttc gggagtgtc ccgacttg gcggggcgcc tacggccgcc 540
 gcagaccgt catctgggc ctgagcctgg gcatctgt ctctcttc ctgacccc 600
 gggcgggctg gctggccgc ctgtgtgt ccgaccccc cctctggag ctggccctc 660
 tgatctggg ctggggctc ctgacttct gcggccagt gtgttact cccctggag 720
 ctctgtct cgaccttc cgcgacccg accactgt gcaggctac agcgtgtac 780
 cctcatgat cagtctggg gtagcctgg gctatctgt gcccgctac gactgggaca 840
 ccagcgccct ggccccctac ctgggactc aggaggagt cctgttggc ctgtcacct 900
 tgatctct gactgtgtc gccgccacc tctgtgtg cgaggaggcg gccctggggc 960
 ccaccgagcc cgccgaggc ctgagcgtc ccagcctg ccccatgtc tggcggtga 1020
 gggctaggct cgcctcagg aatctggcg ctgtgtgc ccgctgtcat cagtgtgt 1080
 gtcgcatgc tgcacccgt cgccgctgt tctgtgtga gctgtgtc tggatggcc 1140
 tgatgaggt cacccttc tacaccgact tctggggga gggcctgtac caggcggtc 1200
 ccaggcgga gcccggacc gaggctagg gccatcga cgaggcgct aggatgggt 1260
 ctctgggt ctctctcag tgcgcatca gctgtgtt ctctgtgt atgaccggc 1320

173

tggtgcagcg ctctggcacc cgggcccgtgt acccggcctc tctggcggtt ttccccgtcg 1380
 ccggccggcgc gacctgcctg tctcattctg tgcgggtgtt gaccggcagc gccgccctga 1440
 ccggcttcac cticagtgcg ctccagattc tgcctacac cctggcggtt ctgtaccatc 1500
 gcgagaagca ggtgttctg cccaagtacc gcggggacac agggggagct tctctgagg 1560
 acagcctgat gaccagcttc ttgccggcc ccaagccggg ggcccccttc cccaacggcc 1620
 atgtcggggc gggcgggcagc ggccgtgtcc ctccccccc cggcctgtgc ggcgctagt 1680
 cctgcagct gaggcgtcgg gtggtgtgg gggagccac cgaggctagg gtgtgtcctg 1740
 gccgggggat ctgcctggac ctggccatcc tgcactccgc cticctgtc tccaggtgg 1800
 cggccagcct gtacatgggc agtatcgtc agctgagcca gaggctgacc gctacatgg 1860
 tgagcggcg cggcctgggg ttggtggcca tctacttgc caccaggtc gtgttcgaca 1920
 agagcgatct cgccaagtat agcgccatgg tgcagcggt gtggtgttc cggctgtgc 1980
 gccatagaaa ggccagttg ctgctgtga acctgtgac ttccgactg gagggtgtcc 2040
 tggtgcggc gatcacgtac gtgcccccc tctgtctgga ggtggcggt gaggagtga 2100
 gatcc 2105

<210> 40
 <211> 2105
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica P501S humano (aminoácidos 1-50) fusionado
 al epitopo auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum C-Lyta fusionado
 a P501S humano (aminoácidos 51-553) - con codones optimizados

<400> 40
 gcggccgcgc caccatggtg cagcggcgtt ggtgtcccg gctgctgcgc catagaaagg 60
 cccagtgtgt gctgtgaac ctgctgacti tggactgga ggtgtgctg gctgccggga 120
 tccagtactg gcccccttg ctgctggagg tggcggtgga ggagatggcc gccgccctacg 180
 tgcatagcga cgggagctac cccaaggaca agtctgagaa gatcaacggg acatggtact 240
 acttgactc ctccggctac atgtctgccg accgctggcg gaagcacacc gacggcaact 300
 ggtactgtgt cgataactc ggagagatgg ccaccggctg gaagaagatc gcggacaagt 360
 ggtactatt caacgaggag ggcgccatga agaccggctg ggtgaagtat aaggacacct 420
 ggtactacct cgacgccaag gaggcgccca tgcagtatat caaggccaac agcaagtca 480
 tggcctacac cgaggagtg atggtcagca acgccttat ccagagcgcc gacggcaccg 540
 gatggtacta ctgaagccg gacggcacc tgcggatcg gcccgagaa gttatgtaca 600
 tgggtctggg catcgcccc gtcctgggcc tctgtgtgt gccctcttc gggagtgcgt 660
 gcatcattg gcggggcgcc taccggcgcc gcagaccgti catctgggcc ctgagcctgg 720
 gcatcctgt ctctctctc ctgatcccc gggccggctg gctggccggc ctgctgtgtc 780
 ccgaccccc cctctggag ctggccctc tgaictggg cgtgggcctg ctgacttct 840
 gcggccaggt gttttact cccctggagg ctctgtctc cgaactctc cgcgaccccg 900
 accacttag gcaggcttac agcgtgtacg cctcatgat cagtctggg ggaatgctg 960
 gctactgtct gccgctatc gactgggaca ccagcgccct ggccccctac ctggggactc 1020
 aggagagtg cctgttcggc ctgtcacct tgaicttct gacgtgcgt gccgccacc 1080
 tctgtgtggc cgaggaggcg gccctggggc ccaccgagcc cggcgaggc ctgagcgctc 1140
 ccagcttag cccccattg tgcctgtga gggctaggct cgcctcagg aatctggcg 1200
 ctgtgtgccc ccgctgcat cagctgtgt gtgcagtgc tgcacccctg cggcgctgt 1260
 tctgtctga gctgtgtc ttgattggcc tgaataggt caccctctc tacaccgact 1320
 tctggggga gggcctgac caggcgctc ccaggggcca gccggcacc gaggctaggc 1380
 gccattaga cgaggcgctc aggatgggt ctctgggct ctctgtcag tgcgccatca 1440
 gctgtgtgt ctctgtgtg atggaccggc tgggtcagcg ctccggcacc cgggcccgtgt 1500
 acccggctc tgtggcggt ttccccgtc ccggcgcgcc gacctgcctg tctattctg 1560
 tgcgggtgt gaccggcagc gccgccctga ccggcttcac cticagtgcg ctccagattc 1620
 tgcctacac cctggcgcti ctgtaccatc gcgagaagca ggtgttctg cccaagtacc 1680
 gcggggacac agggggagct tctctgagg acagcctgat gaccagctc ttgccggcc 1740
 ccaagccggg ggcccccttc cccaacggcc atgtcggggc gggcgccagc ggctgtctc 1800
 ctccccccc cggcctgtgc ggcgctagt cctgcagct gagggtgcgg gtgtgtgtg 1860
 gggagccac cgaggctagg gtgtgtcct gccggggat ctgcctggac ctggccatcc 1920
 tgcactccg cticctgtc tccaggtgg cggccagcct gtacatggc agtatcgtc 1980
 agctgagcca gaggctgacc gctacatgg tgagcggcg cggcctgggg ttggtggcca 2040
 tctacttgc caccaggtc gtgttcgaca agagcgatct cgccaagtat agcgcctgag 2100
 gatcc 2105

<210> 41
 <211> 652
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epitopo auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum C-Lyta fusionado

176

a P510S humana

<400> 41
 Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val
 100 105 110
 Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys Phe Met
 130 135 140
 Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg
 165 170 175
 Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe
 180 185 190
 Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro
 195 200 205
 Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp
 210 215 220
 Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile
 260 265 270
 Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu
 275 280 285
 Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala
 290 295 300
 Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His
 340 345 350
 Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala
 355 360 365
 Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr
 370 375 380
 Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro
 385 390 395 400
 Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser
 405 410 415
 Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val
 420 425 430
 Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala
 435 440 445
 Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His
 450 455 460
 Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe
 465 470 475 480
 Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg
 485 490 495
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro
 515 520 525
 Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu

530 535 540
 Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser
 545 550 555 560
 Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly
 565 570 575
 Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu
 580 585 590
 Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser
 595 600 605
 Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val
 610 615 620
 Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ser Ala Gly Gly His His His His His His
 645 650

<210> 42
 <211> 1959
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica el epítipo auxiliar P2 de C-Lyta de
 St. pneum. fusionado a P501S humano (más señal his)

<400> 42
 atggcggcgg cttacgtaca ttccgacggc tcttatccaa aagacaagtt tgagaaaatc 60
 aatggcactt ggtactactt tgacagtcca ggctatatgc ttgcagaccg ctggaggaag 120
 cacacagacg gcaactggta ctggctgcac aactcaggcg aatggctac aggcctggaag 180
 aaaatcgtg ataagtggtt ctatttcac gaagaagggt ccatgaagac aggcctgggtc 240
 aagtacaagg acacttggta ctacttagac gctaaagaag gcgccatgca atacatcaag 300
 gctaaactta agttcatgg tatcactgaa ggctcatgg tatcaaatgc ctttatccag 360
 tcagcggacg gaacaggctg gtactaccic aaaccagacg gaacactggc agacaggcca 420
 gaaaagtcca tttacatggt gctgggcatt ggtccagtgc tgggcctggt ctgtgtcccg 480
 ctcttaggct cagccagtga ccactggcgt ggacgctatg gcgcgcgcgc gcccttcac 540
 tgggcactgt ccttgggcat cctgtgagc ctttttcca tccaagggc cggctggcta 600
 gcagggtgct tgtgcccgga tccagggccc ctggagctgg cactgtcat cctgggcgtg 660
 gggctgctgg actctgtgg ccagggtgct ttacttcac tggaggccct gctctctgac 720
 ctcttcgggg acccggaacca ctgtgccag gctactctg tctatgcct catgatcagt 780
 ctgggggctt gcttgggcta cctctgctt gccattgact gggacaccag tgccttgccc 840
 ccttacctgg gcacccagga ggagtgcctt ttggcctgc tcacctcat ctcttcacc 900
 tgcgtagcag ccacactgct ggtggctgag gaggcagcgc tgggcccac cgagccagca 960
 gaagggtgtt cggcccccic ctgtgcgcc cactgtgtc catgccgggc ccgttggct 1020
 ttccggaacc tgggcgcctt gcttcccgg ctgcaccagc tgtgtgccc catgccccc 1080
 accctgcgcc ggtcttctgt ggtgagctg tgcagctgga tggcactcat gaccttcacg 1140
 ctgttttaca cggatttctt gggcgagggg ctgtaccagg gcgtgccag agctgagccg 1200
 ggcaccgagg ccggagaca ctatgatgaa ggcgttcgga tgggcagcct gggctgttc 1260
 ctgcagtggc ccatttccct ggtcttctt ctgtcatgg accggtggt gcagcgattc 1320
 ggcactcgag cagtctattt ggccagtgtg gcagcttcc ctgtgctgc cgtgcccaca 1380
 tgcctgtccc acagtgtggc cgtgtgaca gctcagccg ccttcaccgg gtacacctc 1440
 tcagccctgc agatcctgcc ctacacactg gcttccctt accaccggga gaagcagggtg 1500

 ttcttgccca aataccgagg ggaactgga ggtgctagca gtgaggacag cctgatgacc 1560
 agcttctgc caggccctaa gcctggagct ccttcccta atggacacgt ggtgtctgga 1620
 ggcagtggcc tgcctccacc tccaccgcg ctctgcgggg cctctgctg tgatgttcc 1680
 gtactgtgg tgggtggga gccaccgag gccagggtgg ttccgggccc gggcatctgc 1740
 ctggacctcg ccatcttga tagtgcttc ctgtgtccc aggtggcccc atccctgttt 1800
 atgggtcca ttgtccagt cagccagtct gtactgctt atatgggtc tggccaggc 1860
 ctgggtctgg tcgcaatta ctgtctaca caggtagtat tgcagaag cgacttggcc 1920
 aaatactag cgggtggaca ccatcccat caccattaa 1959

<210> 43
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43
 Met Val Gln Arg Leu Trp Val Ser Arg Leu Leu Arg His Arg Lys Ala
 1 5 10 15

Gln Leu Leu Leu Val Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu Glu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Ala Gly Ile Thr Tyr Val Pro Pro Leu Leu Leu Glu Val Gly Val
 35 40 45
 Glu Glu Lys Phe Met Thr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly
 50 55 60
 Leu Val Cys Val Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly
 65 70 75 80
 Arg Tyr Gly Arg Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile
 85 90 95
 Leu Leu Ser Leu Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu
 100 105 110
 Leu Cys Pro Asp Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly
 115 120 125
 Val Gly Leu Leu Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu
 130 135 140
 Ala Leu Leu Ser Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala
 145 150 155 160
 Tyr Ser Val Tyr Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr
 165 170 175
 Leu Leu Pro Ala Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Glu Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu
 195 200 205
 Thr Cys Val Ala Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly
 210 215 220
 Pro Thr Glu Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His
 225 230 235 240
 Cys Cys Pro Cys Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu
 245 250 255
 Leu Pro Arg Leu His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg
 260 265 270
 Arg Leu Phe Val Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe
 275 280 285
 Thr Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val
 290 295 300
 Pro Arg Ala Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly
 305 310 315 320
 Val Arg Met Gly Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu
 325 330 335
 Val Phe Ser Leu Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg
 340 345 350
 Ala Val Tyr Leu Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala
 355 360 365
 Thr Cys Leu Ser His Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu
 370 375 380
 Thr Gly Phe Thr Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala
 385 390 395 400
 Ser Leu Tyr His Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly
 405 410 415
 Asp Thr Gly Gly Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu
 420 425 430
 Pro Gly Pro Lys Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Leu Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser
 450 455 460
 Ala Cys Asp Val Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala
 465 470 475 480
 Arg Val Val Pro Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp
 485 490 495
 Ser Ala Phe Leu Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser
 500 505 510
 Ile Val Gln Leu Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala
 515 520 525
 Gly Leu Gly Leu Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp
 530 535 540
 Lys Ser Asp Leu Ala Lys Tyr Ser Ala
 545 550

176

179

177

<210> 44
 <211> 644
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítopo del auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum. C-Lyta
 fusionado a P510S humana

<400> 44
 Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val
 100 105 110
 Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys Phe Met
 130 135 140
 Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg
 165 170 175
 Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe
 180 185 190
 Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro
 195 200 205
 Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp
 210 215 220
 Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile
 260 265 270
 Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu
 275 280 285
 Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala
 290 295 300
 Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His
 340 345 350
 Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala
 355 360 365
 Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr
 370 375 380
 Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro
 385 390 395 400
 Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser
 405 410 415
 Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val
 420 425 430
 Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala
 435 440 445
 Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His
 450 455 460
 Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe
 465 470 475 480

180

465 470 475 480
 Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg
 485 490 495
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro
 515 520 525
 Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu
 530 535 540
 Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser
 545 550 555 560
 Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly
 565 570 575
 Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu
 580 585 590
 Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser
 595 600 605
 Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val
 610 615 620
 Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ser Ala

<210> 45

<211> 644

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína híbrida con codones optimizados entre el epítopo
 auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum. C-Lyta fusionado a P510S humana (aminoácidos 51-553)

<400> 45

Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val
 100 105 110
 Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys Phe Met
 130 135 140
 Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg
 165 170 175
 Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe
 180 185 190
 Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro
 195 200 205
 Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp
 210 215 220
 Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile
 260 265 270
 Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu

275 280 285
 Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala
 290 295 300
 Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His
 340 345 350
 Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala
 355 360 365
 Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr
 370 375 380
 Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro
 385 390 395 400
 Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser
 405 410 415
 Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val
 420 425 430
 Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala
 435 440 445
 Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His
 450 455 460
 Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe
 465 470 475 480
 Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg
 485 490 495
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro
 515 520 525
 Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu
 530 535 540
 Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser
 545 550 555 560
 Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly
 565 570 575
 Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu
 580 585 590
 Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser
 595 600 605
 Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val
 610 615 620
 Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ser Ala

<210> 46
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epítopo auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum C-Lyta fusionado a P501S humano con codones optimizados (aminoácidos 1-553)

<400> 46
 Met Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met

85 90 95
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val
 100 105 110
 Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Met Val Gln
 130 135 140
 Arg Leu Trp Val Ser Arg Leu Leu Arg His Arg Lys Ala Gln Leu Leu
 145 150 155 160
 Leu Val Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu Glu Val Cys Leu Ala Ala Gly
 165 170 175
 Ile Thr Tyr Val Pro Pro Leu Leu Leu Glu Val Gly Val Glu Glu Lys
 180 185 190
 Phe Met Thr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys
 195 200 205
 Val Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly
 210 215 220
 Arg Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser
 225 230 235 240
 Leu Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro
 245 250 255
 Asp Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu
 260 265 270
 Leu Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu
 275 280 285
 Ser Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val
 290 295 300
 Tyr Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln
 325 330 335
 Glu Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val
 340 345 350
 Ala Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu
 355 360 365
 Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro
 370 375 380
 Cys Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg
 385 390 395 400
 Leu His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe
 405 410 415
 Val Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe
 420 425 430
 Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala
 435 440 445
 Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met
 450 455 460
 Gly Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr
 485 490 495
 Leu Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu
 500 505 510
 Ser His Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe
 515 520 525
 Thr Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr
 530 535 540
 His Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly
 545 550 555 560
 Gly Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro
 565 570 575
 Lys Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser
 580 585 590
 Gly Leu Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp
 595 600 605
 Val Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val
 610 615 620
 Pro Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe
 625 630 635 640
 Leu Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln

645 650 655
 Leu Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly
 660 665 670
 Leu Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp
 675 680 685
 Leu Ala Lys Tyr Ser Ala
 690

<210> 47
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Epitopo auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum C-Lyta fusionado a P501S humano (aminoácidos 51-553) fusionado a P501S Humano (aminoácidos 1-50) con codones optimizados

<400> 47
 Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp Tyr Trp
 35 40 45
 Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile Ala Asp
 50 55 60
 Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly Trp Val
 65 70 75 80
 Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly Ala Met
 85 90 95
 Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Gly Val
 100 105 110
 Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly Trp Tyr
 115 120 125
 Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys Phe Met
 130 135 140
 Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys Val Pro
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly Arg Arg
 165 170 175
 Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser Leu Phe
 180 185 190
 Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro Asp Pro
 195 200 205
 Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu Leu Asp
 210 215 220
 Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu Ser Asp
 225 230 235 240
 Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val Tyr Ala
 245 250 255
 Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro Ala Ile
 260 265 270
 Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln Glu Glu
 275 280 285
 Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val Ala Ala
 290 295 300
 Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu Pro Ala
 305 310 315 320
 Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro Cys Arg
 325 330 335
 Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg Leu His
 340 345 350
 Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe Val Ala
 355 360 365
 Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe Tyr Thr
 370 375 380
 Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala Glu Pro
 385 390 395 400

Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met Gly Ser
 405 410 415
 Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser Leu Val
 420 425 430
 Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr Leu Ala
 435 440 445
 Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu Ser His
 450 455 460
 Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe Thr Phe
 465 470 475 480
 Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr His Arg
 485 490 495
 Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly Gly Ala
 500 505 510
 Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro Lys Pro
 515 520 525
 Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser Gly Leu
 530 535 540
 Leu Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp Val Ser
 545 550 555 560
 Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val Pro Gly
 565 570 575
 Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe Leu Leu
 580 585 590
 Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln Leu Ser
 595 600 605
 Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly Leu Val
 610 615 620
 Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp Leu Ala
 625 630 635 640
 Lys Tyr Ser Ala Met Val Gln Arg Leu Trp Val Ser Arg Leu Leu Arg
 645 650 655
 His Arg Lys Ala Gln Leu Leu Leu Val Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu
 660 665 670
 Glu Val Cys Leu Ala Ala Gly Ile Thr Tyr Val Pro Pro Leu Leu Leu
 675 680 685
 Glu Val Gly Val Glu Glu
 690

<210> 48

<211> 694

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> P501S humano (aminoácidos 1-50) fusionado al epítopo auxiliar

P2 de C-Lyta de St.pneum. C-Lyta fusionado a P501S Humano (aminoácidos 51-553)- codones optimizados

<400> 48

Met Val Gln Arg Leu Trp Val Ser Arg Leu Leu Arg His Arg Lys Ala
 1 5 10 15
 Gln Leu Leu Leu Val Asn Leu Leu Thr Phe Gly Leu Glu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Ala Gly Ile Thr Tyr Val Pro Pro Leu Leu Leu Glu Val Gly Val
 35 40 45
 Glu Glu Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro Lys
 50 55 60
 Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser Ser
 65 70 75 80
 Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn Trp
 85 90 95
 Tyr Trp Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Ile
 100 105 110
 Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Gly Ala Met Lys Thr Gly
 115 120 125
 Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu Gly
 130 135 140
 Ala Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu

145 150 155 160
 Gly Val Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr Gly
 165 170 175
 Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu Lys
 180 185 190
 Phe Met Tyr Met Val Leu Gly Ile Gly Pro Val Leu Gly Leu Val Cys
 195 200 205
 Val Pro Leu Leu Gly Ser Ala Ser Asp His Trp Arg Gly Arg Tyr Gly
 210 215 220
 Arg Arg Arg Pro Phe Ile Trp Ala Leu Ser Leu Gly Ile Leu Leu Ser
 225 230 235 240
 Leu Phe Leu Ile Pro Arg Ala Gly Trp Leu Ala Gly Leu Leu Cys Pro
 245 250 255
 Asp Pro Arg Pro Leu Glu Leu Ala Leu Leu Ile Leu Gly Val Gly Leu
 260 265 270
 Leu Asp Phe Cys Gly Gln Val Cys Phe Thr Pro Leu Glu Ala Leu Leu
 275 280 285
 Ser Asp Leu Phe Arg Asp Pro Asp His Cys Arg Gln Ala Tyr Ser Val
 290 295 300
 Tyr Ala Phe Met Ile Ser Leu Gly Gly Cys Leu Gly Tyr Leu Leu Pro
 305 310 315 320
 Ala Ile Asp Trp Asp Thr Ser Ala Leu Ala Pro Tyr Leu Gly Thr Gln
 325 330 335
 Glu Glu Cys Leu Phe Gly Leu Leu Thr Leu Ile Phe Leu Thr Cys Val
 340 345 350
 Ala Ala Thr Leu Leu Val Ala Glu Glu Ala Ala Leu Gly Pro Thr Glu
 355 360 365
 Pro Ala Glu Gly Leu Ser Ala Pro Ser Leu Ser Pro His Cys Cys Pro
 370 375 380
 Cys Arg Ala Arg Leu Ala Phe Arg Asn Leu Gly Ala Leu Leu Pro Arg
 385 390 395 400
 Leu His Gln Leu Cys Cys Arg Met Pro Arg Thr Leu Arg Arg Leu Phe
 405 410 415
 Val Ala Glu Leu Cys Ser Trp Met Ala Leu Met Thr Phe Thr Leu Phe
 420 425 430
 Tyr Thr Asp Phe Val Gly Glu Gly Leu Tyr Gln Gly Val Pro Arg Ala
 435 440 445
 Glu Pro Gly Thr Glu Ala Arg Arg His Tyr Asp Glu Gly Val Arg Met
 450 455 460
 Gly Ser Leu Gly Leu Phe Leu Gln Cys Ala Ile Ser Leu Val Phe Ser
 465 470 475 480
 Leu Val Met Asp Arg Leu Val Gln Arg Phe Gly Thr Arg Ala Val Tyr
 485 490 495
 Leu Ala Ser Val Ala Ala Phe Pro Val Ala Ala Gly Ala Thr Cys Leu
 500 505 510
 Ser His Ser Val Ala Val Val Thr Ala Ser Ala Ala Leu Thr Gly Phe
 515 520 525
 Thr Phe Ser Ala Leu Gln Ile Leu Pro Tyr Thr Leu Ala Ser Leu Tyr
 530 535 540
 His Arg Glu Lys Gln Val Phe Leu Pro Lys Tyr Arg Gly Asp Thr Gly
 545 550 555 560
 Gly Ala Ser Ser Glu Asp Ser Leu Met Thr Ser Phe Leu Pro Gly Pro
 565 570 575
 Lys Pro Gly Ala Pro Phe Pro Asn Gly His Val Gly Ala Gly Gly Ser
 580 585 590
 Gly Leu Leu Pro Pro Pro Pro Ala Leu Cys Gly Ala Ser Ala Cys Asp
 595 600 605
 Val Ser Val Arg Val Val Val Gly Glu Pro Thr Glu Ala Arg Val Val
 610 615 620
 Pro Gly Arg Gly Ile Cys Leu Asp Leu Ala Ile Leu Asp Ser Ala Phe
 625 630 635 640
 Leu Leu Ser Gln Val Ala Pro Ser Leu Phe Met Gly Ser Ile Val Gln
 645 650 655
 Leu Ser Gln Ser Val Thr Ala Tyr Met Val Ser Ala Ala Gly Leu Gly
 660 665 670
 Leu Val Ala Ile Tyr Phe Ala Thr Gln Val Val Phe Asp Lys Ser Asp
 675 680 685
 Leu Ala Lys Tyr Ser Ala
 690

<210> 49
 <211> 1971
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> DNA que codifica MUC-1 humana fusionada al epítopo auxiliar
 P2 de C-Lyta de St.pneum. C-Lyta

<400> 49
 atgacaccgg gcacccagtc tccittcttc ctgtgtgtgc tcttcacagt gcttacagtt 60
 gtacaggtt ctggatcag aagctctacc ccaggtggag aaaaggagac ttcggctacc 120
 cagagaagtt cagtgcccag cctactgag aagaatgctg tgagtatgac cagcagcgt 180
 ctctccagcc acagccccgg ttcaggctcc tccaccactc agggacagga tgtcacctg 240
 gccccggcca cggaaaccagc ttacagttca gctgccacct ggggacagga tgtcacctg 300
 gtcccagttca ccaggccagc cctgggctcc accaccccg cagcccacga tgtcacctca 360
 gccccggaca acaaggccagc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctg 420
 gccccggaca ccaggccgccc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctg 480
 gccccggaca ccaggccgccc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctg 540
 gccccggaca ccaggccgccc cccgggctcc accgcccccc cagcccacgg tgtcacctg 600
 gccccggaca acaggccgccc ctgggctcc accgcccccc cagtcacaa tgtcacctg 660
 gcttcaggtc ctgcatcagg ctacgttct actctgtgtc acaacggcac ctctgccagg 720
 gctaccacaa cccagccag caagagcact ccatctcaa ttccagcca ccactctgat 780
 actctacca ccttgccag ccatagcacc aagactgat ccagtacac tcaccatagc 840
 accgtaccc ctctaccc ctccaatcac agcactctc cccagttgtc tactggggtc 900
 tctttcttt tctgtttt tcaatttca aacctccagt ttaattctc tctggaagat 960
 cccagcccg actactacca agagctgag agagacatt ctgaatgtt ttgcagatt 1020
 tataaacaag ggggtttct gggctctcc aatattaagt ttaggccagg atctgtgtg 1080
 gtacaattga ctctggctt ccgagaaggt accatcaatg tccacgacgt ggagacacag 1140
 ttcaatcagt ataaacgga agcagcctt cgaataacc tgacgatct agacgtcagc 1200
 gtgagtatg tgcatttc ttctctgccc cagtctggg ctggggtgcc aggtctgggc 1260
 atcgctgctc tgggtctgt ctgtgtctg gtgcgctgg ccatgtcta tctattgcc 1320
 ttggtgtct gtacgtgcc cgaagaagac tacgggcagc tggacatct tccagcccg 1380
 gatacttacc atctatgag cagatcccc acctaccaca ccatgggag ctatgtgcc 1440
 cctagcagta ccgatctag cccatagag aaggtttct caggtatgg tggcagcagc 1500
 ctctttaca caaacccagc agtggcagcc actctgcca actgatggc ggccgttac 1560
 gtacattccg acggctcta tccaaaagac aagttgaga aaatcaatgg cacttggtac 1620
 tactttgaca gtacaggta tatgttga gaccgtgga ggaagcacac agacggcaac 1680
 tggacttgt tgcacaactc agcgaaatg gctacaggt ggaagaaat cgtgataag 1740
 tggactatt tcaacgaga aggtgccatg aagacaggt ggtcaagta caaggacact 1800
 tggactact tagacgtaa agaaggccc atgcaatac tcaaggctaa cttaagttc 1860
 attggtata ctgaaggct catggtatca aatgcctta tccagtcagc ggacggaaca 1920
 ggctggtact acctaaacc agacggaaca ctggcagaca ggccagaatg a 1971

<210> 50
 <211> 656
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> MUC-1 humana fusionada al epítopo auxiliar de
 P2 de C-Lyta C-Lyta de St.pneum.

<400> 50
 Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser Thr Pro Gly
 20 25 30
 Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val Pro Ser Ser
 35 40 45
 Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu Ser Ser His
 50 55 60
 Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr Trp Gly Gln
 85 90 95
 Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly Ser Thr Thr
 100 105 110
 Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys Pro Ala Pro

115 120 125
 Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr
 130 135 140
 Arg Pro Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser
 145 150 155 160
 Ala Pro Asp Thr Arg Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro Ala Ala His
 165 170 175
 Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala
 180 185 190
 Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg Pro Ala Leu
 195 200 205
 Ala Ser Thr Ala Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala Ser Gly Ser
 210 215 220
 Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr Ser Ala Arg
 225 230 235 240
 Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser Ile Pro Ser
 245 250 255
 His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser Thr Lys Thr
 260 265 270
 Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro Leu Thr Ser Ser
 275 280 285
 Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser Phe Phe Phe
 290 295 300
 Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser Leu Glu Asp
 305 310 315 320
 Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile Ser Glu Met
 325 330 335
 Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu Ser Asn Ile
 340 345 350
 Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu Ala Phe Arg
 355 360 365
 Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe Asn Gln Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser Asp Val Ser
 385 390 395 400
 Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly Ala Gly Val
 405 410 415
 Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val Leu Val Ala
 420 425 430
 Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln Cys Arg Arg
 435 440 445
 Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp Thr Tyr His
 450 455 460
 Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg Tyr Val Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser Ala Gly Asn
 485 490 495
 Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala Ala Thr Ser
 500 505 510
 Ala Asn Leu Met Ala Ala Ala Tyr Val His Ser Asp Gly Ser Tyr Pro
 515 520 525
 Lys Asp Lys Phe Glu Lys Ile Asn Gly Thr Trp Tyr Tyr Phe Asp Ser
 530 535 540
 Ser Gly Tyr Met Leu Ala Asp Arg Trp Arg Lys His Thr Asp Gly Asn
 545 550 555 560
 Trp Tyr Trp Phe Asp Asn Ser Gly Glu Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys
 565 570 575
 Ile Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Phe Asn Glu Glu Gly Ala Met Lys Thr
 580 585 590
 Gly Trp Val Lys Tyr Lys Asp Thr Trp Tyr Tyr Leu Asp Ala Lys Glu
 595 600 605
 Gly Ala Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr
 610 615 620
 Glu Gly Val Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala Asp Gly Thr
 625 630 635 640
 Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp Arg Pro Glu
 645 650 655

<211> 2037
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> DNA que codifica el epítipo auxiliar
 P2 de C-Lyta de St.pneum. C-Lyta fusionado a MUC-1 humana

<400> 51

atgggatgga gctgtatcat cctctcttg gtagcaacag ctacagggtg ccactcccag 60
 gtccaaatgg cggccgctta cgtacattcc gacggctctt atccaaaaga caagtttgag 120
 aaaatcaatg gcactttgta ctactttgac agttcagggt atatgcttgc agaccgctgg 180
 aggaagcaca cagacggcaa ctggtactgg ttgcacaact caggcgaaat ggctacaggc 240
 tgggaagaaa tcgctgataa gtggtactat ttaacgaag aagggtccat gaagacaggc 300
 tgggtcaagt acaggagac ttggtactac ttgacgcta aagaaggcgc catgcaatc 360
 atcaaggcta acttaagti catgggtatc actgaaggcg tcatggatc aaatgcctt 420
 atccagtcag cggacgggac aggcctgtac tacctcaac cagacgggac actggcagac 480
 aggcagaaa tgacaccggg caccagctt cctttctcc tgcgtctgt cctacagtg 540
 ctacagtg ttacagggtc tggctatgca agcttacc cagggtgaga aaaggagact 600
 tcggctaccc agagaagttc agtgcccagc ttactgaga aagaatgctg gatgatgacc 660
 agcagcgta ttccagcca cagccccggg ttaggtctt ccaccatca gggacaggat 720
 gtactctgg ccccgccac ggaaccagct tcagggtcag ctgccacctg gggacaggat 780
 gtacactcgg tccagtcac caggccagcc ctgggtcca ccacccgc agccacgat 840
 gtacactcag ccccggaaca caagccagcc ccgggtcca cggccccc agcccacgg 900
 gtacactcgg ccccggaac caggccgccc ccgggtcca cggccccc agcccacgg 960
 gtacactcgg ccccggaac caggccgccc ccgggtcca cggccccc agcccacgg 1020
 gtacactcgg ccccggaac caggccgccc ccgggtcca cggccccc agcccacgg 1080
 gtacactcgg ccccggaaca caggccgccc ttgggtcca cggccccc agtcacaa 1140
 gtacactcgg cctcaggctc tgcatcaggc tcagcttcta ctctgttga caacggcacc 1200
 tctgccaggg ctaccacaac cccagccagc aagagcact catctcaat tccagccac 1260
 cacttgata ctctaccac ccttgccagc catngacca agactgatc cagtagcact 1320
 caccatagca cgttacctcc tctacctcc tccatcaca gcacttccc ccagttgtc 1380
 actgggtct cttctttt cctgtctt cactttca acctcagtt taattctct 1440
 ctggaagatc ccagcaccga ctactacca gagctgcaga gagaatttc tgaatgtt 1500
 ttgcagattt ataaacaagg ggttttctg ggccttcca atattaagt caggccagga 1560
 tctgtgtgga taattgac tctgcttc cgagaaggta ccatcaatgt ccacgacgtg 1620
 gagacacagt tcaatcaga taaaacgga gcagccttc gatataacct gacgatcica 1680
 gacgtcagcg tgagtatgt gccatttct tctctgccc agtctgggc tgggtgcca 1740
 ggcctgggca tgcgctgtc ggtgtgtgtc tctgttgg ttgcgtggc catgtctat 1800
 ctatgtcct tggctgtctg tcagtccgc cgaagaact acgggcagct gacatctt 1860
 ccagccggg atacctcca tccatgagc gattaccca cctaccacac ccatgggcgc 1920
 tatgtcccc ctacagtac ccatgtagc cctatgaga aggtttctg aggtatgtg 1980
 ggcagcagc tctttacac aaaccagca gtggcagcca ctctgcca cttgtg 2037

<210> 52

<211> 678

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítipo auxiliar P2 de C-Lyta de St.pneum. C-Lyta
 fusionado a MUC-1 humana.

<400> 52

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

100 105 110
 Ala Lys Glu Gly Ala Met Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile
 115 120 125
 Gly Ile Thr Glu Gly Val Met Val Ser Asn Ala Phe Ile Gln Ser Ala
 130 135 140
 Asp Gly Thr Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Pro Asp Gly Thr Leu Ala Asp
 145 150 155 160
 Arg Pro Glu Met Thr Pro Gly Thr Gln Ser Pro Phe Phe Leu Leu Leu
 165 170 175
 Leu Leu Thr Val Leu Thr Val Val Thr Gly Ser Gly His Ala Ser Ser
 180 185 190
 Thr Pro Gly Gly Glu Lys Glu Thr Ser Ala Thr Gln Arg Ser Ser Val
 195 200 205
 Pro Ser Ser Thr Glu Lys Asn Ala Val Ser Met Thr Ser Ser Val Leu
 210 215 220
 Ser Ser His Ser Pro Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Gln Gly Gln Asp
 225 230 235 240
 Val Thr Leu Ala Pro Ala Thr Glu Pro Ala Ser Gly Ser Ala Ala Thr
 245 250 255
 Trp Gly Gln Asp Val Thr Ser Val Pro Val Thr Arg Pro Ala Leu Gly
 260 265 270
 Ser Thr Thr Pro Pro Ala His Asp Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Lys
 275 280 285
 Pro Ala Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala
 290 295 300
 Pro Asp Thr Arg Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly
 305 310 315 320
 Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Pro Gly Ser Thr Ala Pro
 325 330 335
 Ala Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Thr Arg Pro Ala Pro Gly
 340 345 350
 Ser Thr Ala Pro Pro Ala His Gly Val Thr Ser Ala Pro Asp Asn Arg
 355 360 365
 Pro Ala Leu Ala Ser Thr Ala Pro Pro Val His Asn Val Thr Ser Ala
 370 375 380
 Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Ala Ser Thr Leu Val His Asn Gly Thr
 385 390 395 400
 Ser Ala Arg Ala Thr Thr Thr Pro Ala Ser Lys Ser Thr Pro Phe Ser
 405 410 415
 Ile Pro Ser His His Ser Asp Thr Pro Thr Thr Leu Ala Ser His Ser
 420 425 430
 Thr Lys Thr Asp Ala Ser Ser Thr His His Ser Thr Val Pro Pro Leu
 435 440 445
 Thr Ser Ser Asn His Ser Thr Ser Pro Gln Leu Ser Thr Gly Val Ser
 450 455 460
 Phe Phe Phe Leu Ser Phe His Ile Ser Asn Leu Gln Phe Asn Ser Ser
 465 470 475 480
 Leu Glu Asp Pro Ser Thr Asp Tyr Tyr Gln Glu Leu Gln Arg Asp Ile
 485 490 495
 Ser Glu Met Phe Leu Gln Ile Tyr Lys Gln Gly Gly Phe Leu Gly Leu
 500 505 510
 Ser Asn Ile Lys Phe Arg Pro Gly Ser Val Val Val Gln Leu Thr Leu
 515 520 525
 Ala Phe Arg Glu Gly Thr Ile Asn Val His Asp Val Glu Thr Gln Phe
 530 535 540
 Asn Gln Tyr Lys Thr Glu Ala Ala Ser Arg Tyr Asn Leu Thr Ile Ser
 545 550 555 560
 Asp Val Ser Val Ser Asp Val Pro Phe Pro Phe Ser Ala Gln Ser Gly
 565 570 575
 Ala Gly Val Pro Gly Trp Gly Ile Ala Leu Leu Val Leu Val Cys Val
 580 585 590
 Leu Val Ala Leu Ala Ile Val Tyr Leu Ile Ala Leu Ala Val Cys Gln
 595 600 605
 Cys Arg Arg Lys Asn Tyr Gly Gln Leu Asp Ile Phe Pro Ala Arg Asp
 610 615 620
 Thr Tyr His Pro Met Ser Glu Tyr Pro Thr Tyr His Thr His Gly Arg
 625 630 635 640
 Tyr Val Pro Pro Ser Ser Thr Asp Arg Ser Pro Tyr Glu Lys Val Ser
 645 650 655
 Ala Gly Asn Gly Gly Ser Ser Leu Ser Tyr Thr Asn Pro Ala Val Ala

660 665
Ala Thr Ser Ala Asn Leu
675

670

Fig. 1 – Información de secuencias de C-LytA.**SEC ID Nº 1 – secuencia de aminoácidos de C-LytA repetición 1****GWQKNDTGYWYVHSD 15****SEC ID Nº 2 – secuencia de aminoácidos de C-LytA repetición 2****GSYPKDKFEKINGTWYYFDSS 21****SEC ID Nº 3 – secuencia de aminoácidos de C-LytA repetición 3****GYMLADRWRKHTDGNWYWF DNS 22****SEC ID Nº 4 – secuencia de aminoácidos de C-LytA repetición 4****GEMATGWKKIADKWYYFNEE 20****SEC ID Nº 5 – secuencia de aminoácidos de C-LytA repetición 5****GAMKTGWVKYKDTWYYLDAKE 21****SEC ID Nº 6 – secuencia de aminoácidos de C-LytA repetición 6****GAMVSNAFIQSADGTGWYYLKPD 23****SEC ID Nº 7 – secuencia de aminoácidos de dominio unión a colina de C-LytA****GWQKNDTGYW YVHSDGSYPK DKFEKINGTW YYFDSSGYML ADRWRKHTDG
NWYWF DNSGE 60****MATGWKKIAD KWYYFNEEGA MKTGWVKYKD TWYYLDAKEG AMVSNAFIQS
ADGTGWYYLK 120****PDGTLADRPE FTVEPDGLIT VK 142****SEC ID Nº 8 – secuencia de aminoácidos del dominio de C-LytA desde la repetición truncada 1
hasta la repetición 6 (como parte de las construcciones de los inventores mostradas en la figura
2)****YVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWF DNSGEMATGWKKIA
DKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMVSNAFIQSADGTGWYYLKPD****SEC ID Nº 9 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 1****ggctggcaga agaagacac tggctactgg tacgtacatt cagac****SEC ID Nº 10 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 2****ggctctatc caaaagacaa gttgagaaa atcaatggca ctgtgtacta ctttgacagt tca****SEC ID Nº 11 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 3****ggctatatgc ttgcagaccg ctggaggaag cacacagacg gcaactggta ctggttcgac aactca****SEC ID Nº 12 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 4****ggcgaaatgg ctacaggctg gaagaaaatc gctgataagt ggtactattt caacgaagaa**

SEC ID N° 13 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 5

Ggtgccatga agacaggctg ggtcaagtac aaggacactt ggtactactt agacgctaaa gaa

SEC ID N° 14 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 6

Ggcgccatgg tatcaaatgc ctatatccag tcagcggacg gaacaggctg gtactacctc aaaccagac

SEC ID N° 15 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 7

ggctggcaga agaattgacac tggctactgg tacgtacatt cagacggctc ttatccaaa 60
gacaagtttg agaaatcaa tggcacttgg tactactttg acagtacagg ctatatgctt 120
gcagaccgct ggaggaagca cacagacggc aactggtact ggttcgacaa ctcaggcgaa 180
atggctacag gctggaagaa aatcgtgat aagtgggtact attcaacga agaagggtcc 240
atgaagacag gctgggtcaa gtacaaggac acttgggtact acttagacgc taagaaaggc 300
gccatggtat caaatgcctt tatccagica gcggacggaa caggctggta ctacctaaa 360
ccagacggaa cactggcaga caggccagaa ttacagtag agccagatgg ctgattaca 420
gtaaaataa 429

SEC ID N° 16 – secuencia de DNA que codifica la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 8

TACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTA
CTACTTTGACAGTTTCAGGCTATATGCTTGACAGCCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACT
GGTACTGGTTTCGACAACTCAGGCGAAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTG
GTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGG
TACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGG
AACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGAC

FIG. 2. CPC y construcciones nativas

Construcción 1 – que codifica la secuencia de CPC-P501₃₁₋₃₃₃ (véase el plásmido de la figura 7-Y1796)

Seuencia de proteínas (SEC ID N° 27)

R1 R2 R3 R4
MAAA**YVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWFDNSGEMATG**
R5 P2 R6
WKKIADKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGAMQYIKANSKFIGITEGVMVSNAF
IQSADGTGWYYLKPDGTLADRPEKFMVMVLGIGPVLGLVCVPLLGSASDHWRGRYGRRRPFI
WALSLGILLSLFLIPRAGWLAGLLCPDPRPLELALLILGVLLDFCGQVCFTPLEALLSDLFRDPD
HCRQAYSVYAFMISLGGCLGYLLPAIDWDTSALAPYLGTQEECLFGLLTLIFLTCVAATLLVAEE
AALGPTEPAEGLSAPSLSPHCCPCRARLAFRNLGALLPRLHQLCCRMPTLRLRLFVABLCSWMA
LMTFTLFYTFDFVGEGLYQGVPRAEPTARRHYDEGVRMGSGLFLQCAISLVFSLVMDRLVQR
FGTRAVYLASVAAPFVAAGATCLSHSVAVVTASAALTGFTFSALQILPYTLASLYHREKQVFLPK
YRGDTGGASSEDLSMTSFLPGPKPGAPFPNGHVGAGGSGLLPPFPALCGASACDVSVRVVVGEP
TEARVVPGRGICLDLAILDSAFLLSQVAPSLFMGSIVQLSQSVTAYMVSAAGLGLVAIYFATQVV
FDKSDLAKYSAGGHHHHHH

R1 (normal): aa5-9 (fragmento) R4 (negrita): aa53-72 P2 (subrayado): 97-110
R2 (negrita): aa10-30 R5 (normal): aa73-93
R3 (normal): aa31-52 R6a (negrita): aa94-95 R6b (negrita): 113-133

Seuencia de nucleótidos (SEC ID N° 28)

ATGgcgccgctTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTG
AGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCT
TGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGA
CAACTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTG
GTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTA
CAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCatgcaatacatcaag
gctaactctaagttcattggtatcactgaaggcgtcATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGC
GGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGAC
AGGCCAGAAaagttcatgtaCatgGTGCTGGGCATTGGTCCAGTGCTGGGCCTGGTC
TGTGTCCCGCTCCTAGGCTCAGCCAGTGACCACTGGCGTGGACGCTATGGCC
GCCGCCGGCCCTTCATCTGGGCACTGTCCTTGGGCATCCTGCTGAGCCTCTT
TCTCATCCCAAGGGCCGGCTGGCTAGCAGGGCTGCTGTGCCCCGGATCCCAG
GCCCCTGGAGCTGGCACTGCTCATCCTGGGCGTGGGGCTGCTGGACTTCTGT
GGCCAGGTGTGCTTCACTCCACTGGAGGCCCTGCTCTCTGACCTCTTCCGGG

ACCCGGACCACTGTGCGCCAGGCCTACTCTGTCTATGCCTTCATGATCAGTCT
 TGGGGGCTGCCTGGGCTACCTCCTGCCTGCCATTGACTGGGACACCAGTGCC
 CTGGCCCCCTACCTGGGCACCCAGGAGGAGTGCCTCTTTGGCCTGCTCACCC
 TCATCTTCCTCACCTGCGTAGCAGCCACACTGCTGGTGGCTGAGGAGGCAGC
 GCTGGGCCCCACCGAGCCAGCAGAAGGGGCTGTCGGCCCCCTCCTTGTCGCC
 CCACTGCTGTCCATGCCGGGCCCCGCTTGGCTTTCCGGAACCTGGGCGCCCTG
 CTTCCCCGGCTGCACCAGCTGTGCTGCCGCATGCCCCGCACCCTGCGCCGGC
 TCTTCGTGGCTGAGCTGTGCAGCTGGATGGCACTCATGACCTTCACGCTGTT
 TTACACGGATTTTCGTGGGCGAGGGGCTGTACCAGGGCGTGCCCAGAGCTGA
 GCCGGGCACCGAGGCCCGGAGACACTATGATGAAGGCGTTCGGATGGGCA
 GCCTGGGGGCTGTTCCCTGCAGTGCGCCATCTCCCTGGTCTTCTCTCTGGTCATG
 GACCGGCTGGTGCAGCGATTTCGGCACTCGAGCAGTCTATTTGGCCAGTGTG
 GCAGCTTTCCCTGTGGCTGCCGGTGCCACATGCCTGTCCCACAGTGTGGCCG
 TGGTGACAGCTTCAGCCGCCCTCACCGGGTTCACCTTCTCAGCCCTGCAGAT
 CCTGCCCTACACACTGGCCTCCCTCTACCACCGGGAGAAGCAGGTGTTCTG
 CCCAAATACCGAGGGGACACTGGAGGTGCTAGCAGTGAGGACAGCCTGATG
 ACCAGCTTCCTGCCAGGCCCTAAGCCTGGAGCTCCCTTCCCTAATGGACACG
 TGGGTGCTGGAGGCAGTGGCCTGCTCCACCTCCACCCGCGCTCTGCGGGG
 CCTCTGCCTGTGAAGTCTCCGTACGTGTGGTGGTGGGTGAGCCACCGAGGC
 CAGGGTGGTTCGGGGCCGGGGCATCTGCCTGGACCTCGCCATCCTGGATAG
 TGCCTTCCTGCTGTCCCAGGTGGCCCCATCCCTGTTTATGGGCTCCATTGTCC
 AGCTCAGCCAGTCTGTCACTGCCTATATGGTGTCTGCCGCAGGCCTGGGTCT
 GGTCGCCATTTACTTTGCTACACAGGTAGTATTTGACAAGAGCGACTTGGCC
 AAATACTCAGCGggtggacaccatcaccatcaccattaa

Construcción 2 – que codifica la secuencia de P501₃₅₋₃₅₃ HIS (control) (cepa de levadura SC333)

Secuencia de proteínas (SEC ID Nº 29)

MVLGIGPVLG LVCVPLLGSA SDHWRGRYGR RRPFIWALSL GILLSLFLIP RAGWLAGLLC 60
 PDPRPLELAL LILGVGLLDF CGQVCFTPLE ALLSDLFRDP DHCRQAYSVY AFMISLGGCL 120
 GYLLPAIDWD TSALAPYLGT QEECLFGLLT LIFLTCVAAT LLVAEEAALG PTEPAEGLSA 180
 PSLSPHCCPC RARLAFRNLG ALLPRLHQLC CRMPRTLRL FVAELCSWMA LMTFTLFYTD
 240
 FVGEGLYQGV PRAEPGTEAR RHYDEGVRMG SLGLFLQCAI SLVFSLVMDR LVQRFGTRAV
 300
 YLASVAAFPV AAGATCLSHS VAVVTASAAL TGFTFSALQI LPYTLASLYH REKQVFLPKY 360
 RGDTGGASSE DSLMTSFLPG PKPGAPFPNG HVGAGGSGLL PPPALCGAS ACDVSVRVVV
 420
 GEPTearVVP GRGICLDLAI LDSAFLLSQV APSLFMGsIV QLSQSVTAYM VSAAGLGLVA 480

IYFATQVVFD KSDLAKYSAG GHHHHHH 507

Secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 30)

atgGTGCTGG GCATTGGTCC AGTGCTGGGC CTGGTCTGTG TCCCGCTOCT AGGCTCAGCC 60
AGTGACCACT GGC GTGGACG CTATGGCCGC CGCCGGCCCT TCATCTGGGC ACTGTCTTG
120
GGCATCCTGC TGAGCCTCTT TCTCATCCCA AGGGCCGGCT GGCTAGCAGG GCTGCTGTGC
180
CCGGATCCCA GGCCCTGGA GCTGGCACTG CTCATCCTGG GCGTGGGGCT GCTGGACTTC
240
TGTGGCCAGG TGTGCTTCAC TCCACTGGAG GCCCTGCTCT CTGACCTCTT CCGGGACCCG
300
GACCACTGTC GCCAGGCCTA CTCTGTCTAT GCCTTCATGA TCAGTCTTGG GGGCTGCCTG
360
GGCTACCTCC TGCCTGCCAT TGA CTGGGAC ACCAGTGCCC TGGCCCCCTA CCTGGGCACC
420
CAGGAGGAGT GCCTCTTTGG CCTGCTCACC CTCATCTTCC TCACCTGCGT AGCAGCCACA
480
CTGCTGGTGG CTGAGGAGGC AGCGCTGGGC CCCACCGAGC CAGCAGAAGG
GCTGTCGGCC 540
CCCTCCTTGT CGCCCCACTG CTGTCCATGC CGGGCCCGCT TGGCTTTCCG GAACCTGGGC
600
GCCCTGCTTC CCCGGCTGCA CCAGCTGTGC TGCCGCATGC CCCGCACCT GCGCCGGCTC
660
TTCGTGGCTG AGCTGTGCAG CTGGATGGCA CTCATGACCT TCACGCTGTT TTACACGGAT
720
TTCGTGGGCG AGGGGCTGTA CCAGGGCGTG CCCAGAGCTG AGCCGGGCAC
CGAGGCCCGG 780
AGACACTATG ATGAAGGCGT TCGGATGGGC AGCCTGGGGC TGTTCCTGCA GTGCGCCATC
840
TCCCTGGTCT TCTCTCTGGT CATGGACCGG CTGGTGCAGC GATTGGGCAC TCGAGCAGTC
900
TATTTGGCCA GTGTGGCAGC TTTCCCTGTG GCTGCCGGTG CCACATGCCT GTCCCACAGT
960
GTGGCOGTGG TGACAGCTTC AGCCGCCCTC ACCGGGTTC CCTTCTCAGC CCTGCAGATC
1020
CTGCCCTACA CACTGGCCTC CCTCTACCAC CGGGAGAAGC AGGTGTTCTT GCCCAAATAC
1080
CGAGGGGACA CTGGAGGTGC TAGCAGTGAG GACAGCCTGA TGACCAGCTT CCTGCCAGGC
1140
CCTAAGCCTG GAGCTCCCTT CCCTAATGGA CACGTGGGTG CTGGAGGCAG TGGCCTGCTC
1200
CCACCTCCAC CCGCGCTCTG CGGGGCCTCT GCCTGTGAAG TCTCCGTACG TGTGGTGGTG
1260

GGTGAGCCCA CCGAGGCCAG GGTGGTTCG GGCCGGGGCA TCTGCCTGGA CCTCGCCATC
 1320
 CTGGATAGTG CCTTCTGCT GTCCCAGGTG GCCCCATCCC TGTATTATGGG CTCCATTGTC
 1380
 CAGCTCAGCC AGTCTGTCAC TGCCTATATG GTGTCTGCCG CAGGCCTGGG TCTGGTCGCC
 1440
 ATTTACTTTG CTACACAGGT AGTATTTGAC AAGAGCGACT TGGCCAAATA CTCAGCGgt
 1500
 ggacaccatc accatcacca ttaa 1524

Construcción 3 – secuencia de codificación de natas P501₁₋₃₄ P501₅₁₋₅₅₃ HIS (cepa de
 levadura Y1800)

Secuencia de proteínas (SEC ID N° 31)

R1 R2

MAAVQRLWVSRLLRHRKAQLLL VNLLTFGLEVCLAAA **YVHSDGSYPKDKFE**
KINGTW

R3 R4

R5

YYFDSSGYMLADRWRKHTDGNWYWFDNSGEMATGWKKIADKWYYFNEE
GAMKTGWVK

P2 R6

YKDTWYYLDAKEGAMQYIKANSKFIGITEGV **MVSNAFTQ** **SADGTGWYYLKF**
DGTLADRPEKFMVMVLGIGPVLGLVCVPLLGSASDHWRGRYGRRRPFIWALS
GILLSLFLIPRAGWLAGLLCPDRPLELALLILGVGLLDFCGQVCFTPLEALLSDL
FRDPDHCRQAYSVYAFMISLGGCLGYLLPAIDWDTSALAPYLGTQEECLFGLLT
LIFLTCVAATLLVAEEAALGPTEPAEGLSAPSLSPHCCPCRARLAFRNLGALLPR
LHQLCCRMPTLRRLFVAELCSWMALMTFTLFTYDFVGEGLYQGVPRAEPTGTE
ARRHYDEGVRMGSLGLFLQCAISLVFSLVMDRLVQRFQTRAVYLASVAAFPVA
AGATCLSHSVAVVTASAALTGFTFSALQILPYTLASLYHREKQVFLPKYRGDTG
GASEDSLMTSFLPGPKPGAPFPNGHVAGGSGLLPPPPALCGASACDVSVRVV
VGEPTARVVPGRGICLDLAILDSAFLLSQVAPSLFMGSIVQLSQSVTAYMVSA
AGLGLVAIYFATQVVFDKSDLAKYSAGGHHHHHH

R1 (normal): aa38-42 (fragmento) R4 (bold): aa77-106 P2 (subrayado): 130-143

R2 (negrita): aa43-64

R5 (normal): aa107-126

R3 (normal): aa65-76

R6a (negrita): aa127-128 R6b (negrita): aa146-166

natas representa la secuencia señal nativa.

Secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 32)

ATGgcGGCCGTGCAGAGGCTATGGGTATCGAGACTGCTAAGACACCGCAAA
 GCTCAGTTGTTGTTGGTTAACTTGTGACCTTCGGGCTGGAAGTCTGTTTGG
 CggccgctTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAA
 AATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCA
 GACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAAC
 TCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTAC
 TATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAG
 GACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCatgcaatacatcaaggctaact
 ctaagttcattggtatcactgaaggcgtcATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGA

CGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGG
 CCAGAAaagttcaigtaCatgGTGCTGGGCATTGGTCCAGTGCTGGGCCTGGTCTGT
 GTCCCGCTCCTAGGCTCAGCCAGTGACCACTGGCGTGGACGCTATGGCCGC
 CGCCGGCCCTTCATCTGGGCACTGTCCTTGGGCATCCTGCTGAGCCTCTTTCT
 CATCCCAAGGGCCGGCTGGCTAGCAGGGCTGCTGTGCCCGGATCCCAGGCC
 CCTGGAGCTGGCACTGCTCATCCTGGGCGTGGGGCTGCTGGACTTCTGTGGC
 CAGGTGTGCTTCACTCCACTGGAGGCCCTGCTCTCTGACCTCTTCCGGGACC
 CGGACCACTGTGCGCCAGGCCTACTCTGTCTATGCCTTCATGATCAGTCTTGG
 GGGCTGCCTGGGCTACCTCCTGCCTGCCATTGACTGGGACACCACTGCCCCTG
 GCCCCCTACCTGGGCACCCAGGAGGAGTGCCCTCTTGGCCTGCTCACCTCA
 TCTTCCTCACCTGCGTAGCAGCCACACTGCTGGTGGCTGAGGAGGCAGCGCT
 GGGCCCCACCGAGCCAGCAGAAGGGCTGTGCGCCCCCTCCTTGTGCCCCA
 CTGCTGTCCATGCCGGGGCCCGCTTGGCTTTCGGGAACCTGGGCGCCCTGCTT
 CCCC GGCTGCACCAGCTGTGCTGCCGCATGCCCCGCACCCTGCGCCGGCTCT
 TCGTGGCTGAGCTGTGCAGCTGGATGGCACTCATGACCTTCACGCTGTTTA
 CACGGATTTCGTGGGCGAGGGGCTGTACCAGGGCGTGCCCAGAGCTGAGCC
 GGGCACCGAGGGCCCGGAGACACTATGATGAAGGCGTTCGGATGGGCAGCCT
 GGGGCTGTTCTGTCAGTGCGCCATCTCCCTGGTCTTCTCTCTGGTCATGGAC
 CGGCTGGTGCAGCGATTTCGGCACTCGAGCAGTCTATTTGGCCAGTGTGGCA
 GCTTTCCTGTGGCTGCCGGTGCCACATGCCTGTCCCACAGTGTGGCCGTGG
 TGACAGCTTCAGCCGCCCTCACCGGGTTCACCTTCTCAGCCCTGCAGATCCT
 GCCCTACACACTGGCCTCCCTCTACCACCGGAGAGAAGCAGGTGTTCTGCC
 AAATACCGAGGGGGACACTGGAGGTGCTAGCAGTGAGGACAGCCTGATGAC
 CAGCTTCTGCCAGGCCCTAAGCCTGGAGCTCCCTTCCCTAATGGACACGTG
 GGTGCTGGAGGCAGTGGCCTGCTCCACCTCCACCCGCGCTCTGCGGGGCCT
 CTGCCTGTGAiGTCTCCGTACGTGTGGTGGTGGGTGAGCCCACCGAGGCCAG
 GGTGGTTCCGGGGCCGGGGCATCTGCCTGGACCTCGCCATCCTGGATAGTGCC
 TTCCTGCTGTCCCAGGTGGCCCCATCCCTGTTTATGGGCTCCATTGTCCAGCT
 CAGCCAGTCTGTCACTGCCTATATGGTGTCTGCCGCAGGCCTGGGTCTGGTC
 GCCATTTACTTTGCTACACAGGTAGTATTTGACAAGAGCGACTTGGCCAAAT
 ACTCAGCGggtggacaccatcaccatcaccattaa

Construcción 4 – que codifica la secuencia de alfapreCPC-P501₅₁₋₃₅₃ HIS (cepa de levadura Y1802)

Secuencia de proteínas (SEC ID N°33)

Señal alfa-pre R1 R2 R3
MAARFPSIFTAVLFAASSALAAA**YVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSSGY**
MLADKWRKHTDGNWYWFD
R4 R5 P2
NSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGWVKYKDTWYYLDAKEGA**MOY**
IKANSKFIGITEGV**MVSNAFI**
R6
QSADGTGWYYLKPD**GTLADRPEKFMYMVLGIGPVLGLVCVPLLGSASDHWR**
GRYGRRRPFIWALS**LGILLSLFLIPRAGWLAGLLCPDPRPLELALLILGVGLLDFC**
GQVCFTPLEALLSD**LFDPDHCRQAYS****VYAFMISLGGCLGYLLPAIDWDTSALA**
PYLG**TQEECLFGLLTLIFLTCVAATLLVAEEAALGPTEPAEGLSAPSLSPHCCPC**
RARLA**FRNLGALLPRLHQLCCRMPTLRRLFVAELCSWMALMTFTLFYTDFVG**
EGLYQGV**PRAEPGTEARRHYDEGVRMGS****LGLFLQCAISLVFSLVMDRLVQRFG**
TRAVY**LASVAAFPVAAGATCLSHSVAVVTASAALTGFTFSALQILPYTLASLYH**

REKQVFLPKYRGDTGGASSEDLSMTSFLPGPKPGAPFPNGHVGAGGSGLLPPPP
ALCGASACDVSVRVVVGEPTEARVVPGRGICLDLAILDSAFLLSQVAPSLFMGS
IVQLSQSVTAYMVSAAGLGLVAIYFATQVVFDKSDLAKYSAGGHHHHHH

Señal Alfa-pre (negrita): aa4-22

R1 (normal): aa24-28 (fragmento) R4 (negrita): aa72-91 P2 (subrayado): 116-129

R2 (negrita): aa29-49 R5 (normal): aa92-112

R3 (normal): aa50-71 R6a (negrita): aa113-114 R6b (negrita): aa132-152

Posiciones alfa-pre de la secuencia señal alfa pre

Secuencia de nucleótidos (SEC ID N°34)

TACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCA
ATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAGACCG
CTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACCTCAGG
CGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTT
CAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACAC
TTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCCatgcaatacatcaaggctaactctaagttcat
tggtatcactgaaggcgctcATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAAC
AGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGCCAGAA

ATGgcGGCCAGATTTCTTCAATTTTACTGCAGTTTTATTTCGCAGCATC
CTCCGCATTAGCggccgctTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGAC
AAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCT
ATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACT
GGTTCGACAACCTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTG
ATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGG
TCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCCatg
caatacatcaaggctaactctaagttcatttggtatcactgaaggcgctcATGGTATCAAATGCCTTTATCC
AGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACAC
TGGCAGACAGGCCAGAAAgcttggtattacttacgttcaccattgttgttggaagttggtgtgaagaaaagttcat
gtaCatgGTGCTGGGCATTGGTCCAGTGCTGGGCCTGGTCTGTGTCCCGCTCCT
AGGCTCAGCCAGTGACCACTGGCGTGGACGCTATGGCCGCCGCCGGCCCTT
CATCTGGGCACTGTCCTTGGGCATCCTGCTGAGCCTCTTTCTCATCCAAGG
GCCGGCTGGCTAGCAGGGCTGCTGTGCCCGGATCCCAGGCCCTGGAGCTG
GCACTGCTCATCCTGGGCGTGGGGCTGCTGGACTTCTGTGGCCAGGTGTGCT
TCACTCCACTGGAGGCCCTGCTCTCTGACCTCTTCCGGGACCCGGACCACTG
TCGCCAGGCCTACTCTGTCTATGCTTCATGATCAGTCTTGGGGGCTGCCTGG
GCTACCTCCTGCCTGCCATTGACTGGGACACCAGTGCCCTGGCCCCCTACCT

GGGCACCCAGGAGGAGTGCCTCTTTGGCCTGCTCACCCATCTTCCTCACC
 TCGTAGCAGCCACACTGCTGGTGGCTGAGGAGGCAGCGCTGGGCCCCACC
 GAGCCAGCAGAAGGGCTGTCGGCCCCCTCCTTGTGCCCCACTGCTGTCCAT
 GCCGGGCGCTTGGCTTTCCGGAACCTGGGCGCCCTGCTTCCCCGGCTGCA
 CCAGCTGTGCTGCCGCATGCCCCGCACCCTGCGCCGGCTCTTCGTGGCTGAG
 CTGTGCAGCTGGATGGCACTCATGACCTTCACGCTGTTTTACACGGATTTTCG
 TGGGCGAGGGGCTGTACCAGGGCGTGCCAGAGCTGAGCCGGGCACCGAG
 GCCCGGAGACACTATGATGAAGGCGTTCGGATGGGCAGCCTGGGGCTGTTC
 CTGCAGTGCGCCATCTCCCTGGTCTTCTCTCTGGTCATGGACCGGCTGGTGC
 AGCGATTTCGGCACTCGAGCAGTCTATTTGGCCAGTGTGGCAGCTTTCCTGT
 GGCTGCCGGTGCCACATGCCTGTCCCACAGTGTGGCCGTGGTGACAGCTTCA
 GCCGCCCTCACCGGGTTCACCTTCTCAGCCCTGCAGATCCTGCCCTACACAC
 TGGCCTCCCTCTACCACCGGGAGAAGCAGGTGTTCTGCCCCAAATACCGAG
 GGGACACTGGAGGTGCTAGCAGTGAGGACAGCCTGATGACCAGCTTCCTGC
 CA
 GGCCCTAAGCCTGGAGCTCCCTTCCCTAATGGACACGTGGGTGCTGGAGGC
 AGTGGCCTGCTCCACCTCCACCCGCGCTCTGCGGGGCCTCTGCCTGTGA^tGT
 CTCCGTACGTGTGGTGGTGGGTGAGCCACCGAGGCCAGGGTGGTTCCGGG
 CCGGGGCATCTGCCTGGACCTCGCCATCCTGGATAGTGCCTTCCTGCTGTCC
 CAGGTGGCCCCATCCCTGTTTATGGGCTCCATTGTCCAGCTCAGCCAGTCTG
 TCACTGCCTATATGGTGTCTGCCGCAGGCCTGGGTCTGGTCGCCATTTACTT
 TGCTACACAGGTAGTATTTGACAAGAGCGACTTGGCCAAATACTCAGCG^{ggtg}
 gacaccatcaccatcaccattaa

Construcción 5 - que codifica la secuencia de alfaprepro-P501₃₁₋₃₃₃ HIS (en plásmido pRIT
 15068 y cepa de levadura Y1790)

Secuencia de proteínas (SEC ID N° 35)

MSFLNFTAVL FAASSALAAP VNTTTEDETA QIPAEAVIGY SDLEGDFDVA VLPFSNSTNN 60
 GLLFINTTIA SIAAKEEGVS LEKREAEAMV LGIGPVLGLV CVPLLGSASD HWRGRYGRRR 120
 PFIWALSLGI LLSLFLIPRA GWLAGLLCPD PRPLELALLI LGVGLLDFCG QVCFTPLEAL 180
 LSDLFRDPDH CRQAYSVYAF MISLGGCLGY LLPADWDTS ALAPYLGTQE ECLFGLLTLI 240
 FLTCVAATLL VAEEAALGPT EPAEGLSAPS LSPHCCPCRA RLAFRNLGAL LPRHLQLCCR 300
 MPRTLRLRLFV AELCSWMALM TFTLFYTDFV GEGLYQGVPR AEPGTEARRH YDEGVRMGSL
 360
 GLFLQCAISL VFSLVMDRLV QRFGTRAVYL ASVAAFPVAA GATCLSHSVA VVTASAALTG
 420
 FTF^SALQILP YTLASLYHRE KQVFLPKYRG DTGGASSEDS LMTSFLPGPK PGAPFPNGHV 480
 GAGGSGLLPP PPALCGASAC DVSVRVVVGE PTEARVVPGR GICLDLAILD SAFLLSQVAP 540
 SLFMGSIVQL SQSVTAYMVS AAGLGLVAIY FATQVVFDKS DLAKYSAGGH HHHHH 595

Secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 36)

ATGAGTTTCC TCAATTTTAC TGCAGTTTTA TTCGCAGCAT CCTCCGCATT AGCTGCTCCA 60
 GTCAACACTA CAACAGAAGA TGAACGGCA CAAATTCCGG CTGAAGCTGT CATCGGTTAC
 120
 TCAGATTAG AAGGGGATTT CGATGTTGCT GTTTTGCCAT TTTCCAACAG CACAAATAAC 180
 GGGTTATTGT TTATAAATAC TACTATTGCC AGCATTGCTG CTAAAGAAGA AGGGGTATCT 240
 CTCGAGAAAA GAGAGGCTGA AGCCatgGTG CTGGGCATTG GTCCAGTGCT GGGCCTGGTC 300
 TGTGTCCCGC TCCTAGGCTC AGCCAGTGAC CACTGGCGTG GACGCTATGG CCGCCGCCGG
 360
 CCCTTCATCT GGGCACTGTC CTTGGGCATC CTGCTGAGCC TCTTTCTCAT CCCAAGGGCC 420
 GGCTGGCTAG CAGGGCTGCT GTGCCCGGAT CCCAGGCCCC TGGAGCTGGC ACTGCTCATC
 480
 CTGGGCGTGG GGCTGCTGGA CTTCTGTGGC CAGGTGTGCT TCACTCCACT GGAGGGCCCTG 540
 CTCTCTGACC TCTTCGGGA CCCGACCAC TGTCGCCAGG CTA CTCTGT CTATGCCTTC 600
 ATGATCAGTC TTGGGGGCTG CCTGGGCTAC CTCCTGCCTG CCATTGACTG GGACACCAGT 660
 GCCCTGGCCC CCTACCTGGG CACCCAGGAG GAGTGCCCTCT TTGGCCTGCT CACCCTCATC 720
 TTCCTCACCT GCGTAGCAGC CACACTGCTG GTGGCTGAGG AGGCAGCGCT GGGCCCCACC
 780
 GAGCCAGCAG AAGGGCTGTC GGCCCCCTCC TTGTCGCCCC ACTGCTGTCC ATGCCGGGCC 840
 CGCTTGGCTT TCCGGAACCT GGGCGCCCTG CTTCCCCGGC TGCACCAGCT GTGCTGCCGC 900
 ATGCCCGCA CCCTGCGCCG GCTCTTCGTG GCTGAGCTGT GCAGCTGGAT GGCACTCATG 960
 ACCTTCACGC TGTTTTACAC GGATTTCTGT GGCAGAGGGC TGTACCAGGG CGTGCCCA
 1020
 GCTGAGCCGG GCACCGAGGC CCGGAGACAC TATGATGAAG GCGTTCGGAT GGGCAGCCTG
 1080
 GGGCTGTTCC TGCAGTGCGC CATCTCCCTG GTCTTCTCTC TGGTCATGGA CCGGCTGGTG 1140
 CAGCGATTCT GCACTCGAGC AGTCTATTG GCCAGTGTGG CAGCTTTCCC TGTGGCTGCC
 1200
 GGTGCCACAT GCCTGTCCCA CAGTGTGGCC GTGGTGACAG CTTAGCCGC CCTACCGGG
 1260
 TTCACCTTCT CAGCCCTGCA GATCCTGCCC TACACACTGG CCTCCCTCTA CCACCGGGAG
 1320
 AAGCAGGTGT TCCTGCCCAA ATACCGAGGG GACACTGGAG GTGCTAGCAG TGAGGACAGC
 1380
 CTGATGACCA GCTTCCTGCC AGGCCCTAAG CCTGGAGCTC CTTCCCTAA TGGACACGTG
 1440
 GGTGCTGGAG GCAGTGGCCT GCTCCACCT CCACCCGCGC TCTGCGGGGC CTCTGCCTGT
 1500
 GATGTCTCCG TACGTGTGGT GGTGGGTGAG CCCACCGAGG CCAGGGTGGT TCCGGGCCGG
 1560
 GGCATCTGCC TGGACCTCGC CATCCTGGAT AGTGCCCTCC TGCTGTCCA GGTGGCCCCA
 1620
 TCCCTGTTTA TGGGCTCCAT TGTCCAGCTC AGCCAGTCTG TCACTGCCTA TATGGTGTCT 1680
 GCCGCAGGCC TGGGTCTGGT CGCCATTAC TTTGCTACAC AGGTAGTATT TGACAAGAGC
 1740

GACTTGGCCA AATACTCAGC Gggggacac catcacatc accattaa 1788

FIG. 3. Estructura de la proteína de fusión CPC-p501 His expresada en *S. cerevisiae*

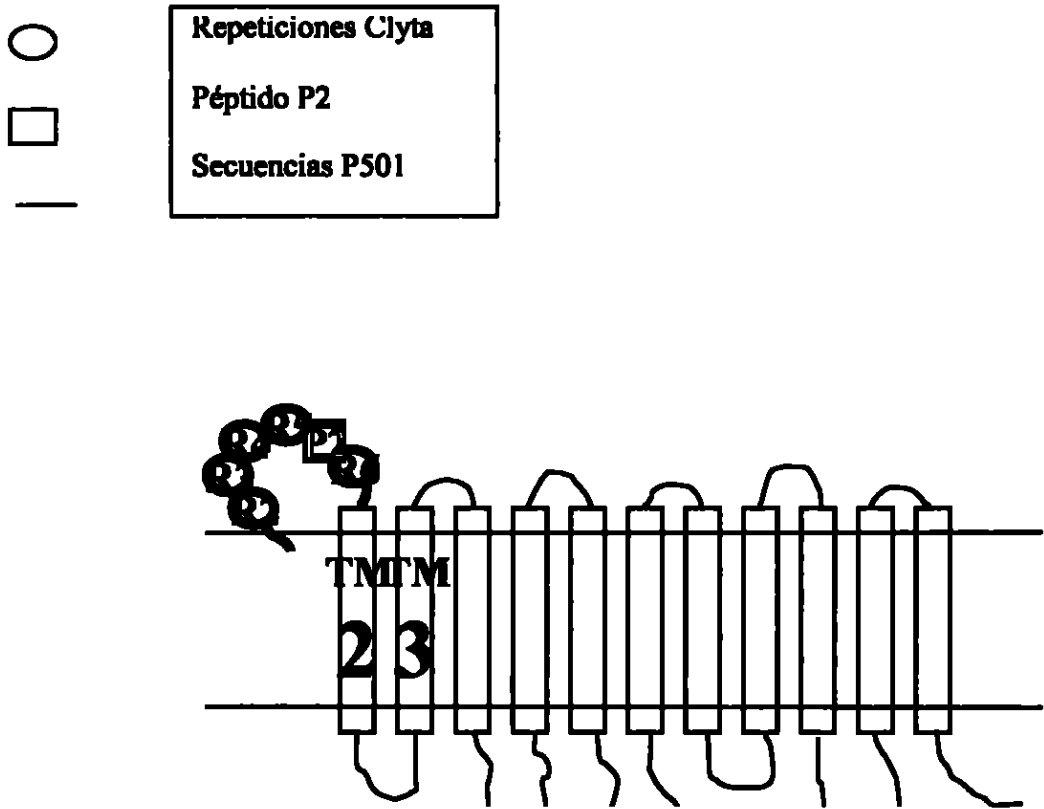


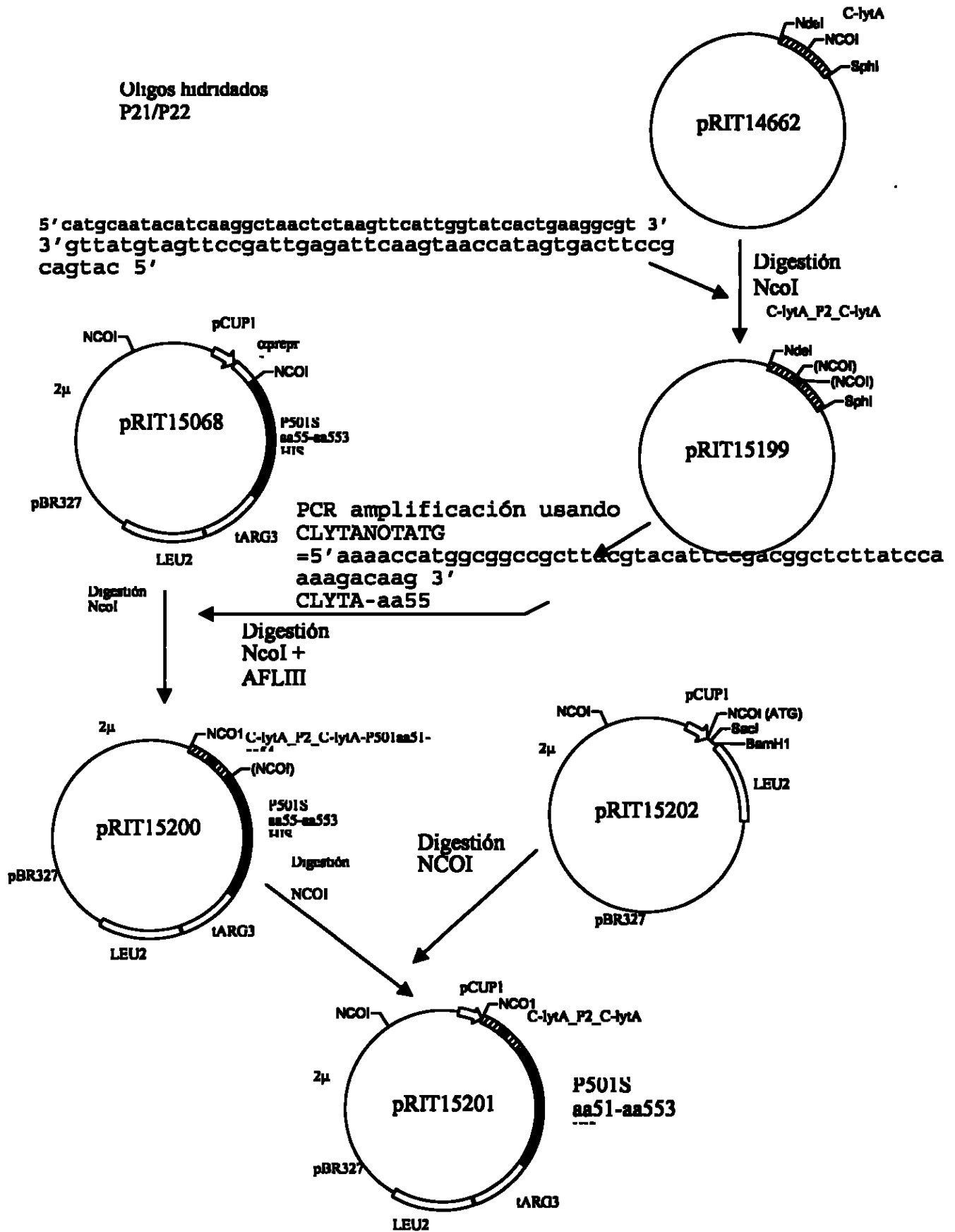
FIG. 4. Estructura primaria de la proteína de fusión CPC-P501 His (SEC ID N° 41)

MAAAYVHSDG SYPKDKFEKI NGTWYYFDSS GYMLADRWRK HTDGNWYWFD
 NSGEMATGWK 60
 KIADKWYYFN EEGAMKTGWV KYKDTWYYLD AKEGAMQYIK ANSKFIGITE GVMVSNAFIQ
 120
 SADGTGWYYL KPDGTLADRP EKFMVMVLGI GPVLGLVCVP LLGSASDHWR GRYGRRRPFI
 180
 WALSLGILLS LFLIPRAGWL AGLLCPDPRP LELALLILGV GLLDFCGQVC FTPLEALLSD 240
 LFRDPDHCRQ AYSVYAFMIS LGGCLGYLLP AIDWDTSALA PYLGTQEECL FGLTLIFLT 300
 CVAATLLVAE EAALGPTEPA EGLSAPSLSP HCCPCRARLA FRNLGALLPR LHQLCCRMPR 360
 TLRRLFVAEL CSWMALMTFT LFYTDFVGEG LYQGVPRAP GTEARRHYDE GVRMGSLGLF
 420
 LQCAISLVFS LVMDRLVQRF GTRAVYLASV AAFPVAAGAT CLSHSVAVVT ASAALTGFTF
 480
 SALQILPYTL ASLYHREKQV FLPKYRGDTG GASSEDSLMT SFLPGPKPGA PFPNGHVGAG 540
 GSGLLPPPPA LCGASACDVS VRVVVGEPTE ARVVPGRGIC LDLAILDSAF LLSQVAPSLF 600
 MGSIVQLSQS VTAYMVSAAG LGLVAIFYAT QVVFDKSDLA KYSAGGHHHH HH 652

FIG. 5. Secuencia de nucleótidos de CPC P501 Hls(pRIT15201) (SEC ID N° 42)

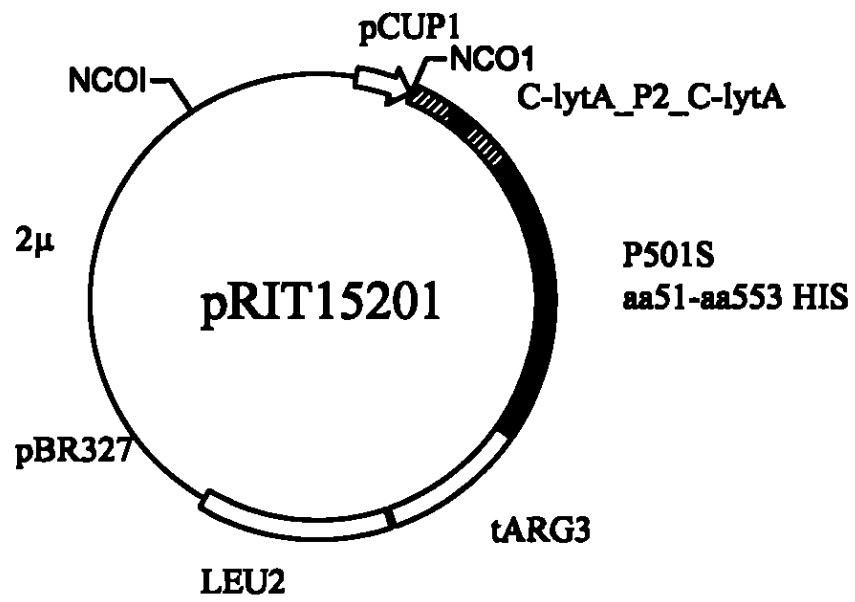
ATGGCGGCCG CTTACGTACA TTCCGACGGC TCTTATCCAA AAGACAAGTT TGAGAAAATC 60
 AATGGCACTT GGTACTACTT TGACAGTTCA GGCTATATGC TTGCAGACCG CTGGAGGAAG 120
 CACACAGACG GCAACTGGTA CTGGTTCGAC AACTCAGGCG AAATGGCTAC AGGCTGGAAG 180
 AAAATCGCTG ATAAGTGGTA CTATTTCAAC GAAGAAGGTG CCATGAAGAC AGGCTGGGTC 240
 AAGTACAAGG ACACTTGGTA CTACTTAGAC GCTAAAGAAG GCGCCATGCA ATACATCAAG 300
 GCTAACTCTA AGTTCATTGG TATCACTGAA GGCGTCATGG TATCAAATGC CTTTATCCAG 360
 TCAGCGGACG GAACAGGCTG GTACTACCTC AAACCAGACG GAACACTGGC AGACAGGCCA 420
 GAAAAGTTCA TGTACATGGT GCTGGGCATT GGTCCAGTGC TGGGCCTGGT CTGTGTCCCG 480
 CTCCTAGGCT CAGCCAGTGA CCACTGGCGT GGACGCTATG GCCGCCGCCG GCCCTTCATC 540
 TGGGCACTGT CCTTGGGCAT CCTGCTGAGC CTCTTTCTCA TCCCAAGGGC CGGCTGGCTA 600
 GCAGGGCTGC TGTGCCCGGA TCCCAGGCC CTGGAGCTGG CACTGCTCAT CCTGGGCGTG 660
 GGGCTGCTGG ACTTCTGTGG CCAGGTGTGC TCACTCCAC TGGAGGCCCT GCTCTCTGAC 720
 CTCTTCCGGG ACCCGGACCA CTGTCGCCAG GCCTACTCTG TCTATGCCTT CATGATCAGT 780
 CTTGGGGGCT GCCTGGGCTA CCTCCTGCCT GCCATTGACT GGGACACCAG TGCCCTGGCC 840
 CCCTACCTGG GCACCCAGGA GGAGTGCTC TTTGGCCTGC TCACCCTCAT CTCCTCACC 900
 TGGTAGCAG CCACACTGCT GGTGGCTGAG GAGGCAGCGC TGGGCCCCAC CGAGCCAGCA 960
 GAAGGGCTGT CGGCCCCCTC CTTGTGCGCC CACTGCTGTC CATGCCGGGC CCGCTTGGCT 1020
 TTCGGGAACC TGGGCGCCCT GCTTCCCCGG CTGCACCAGC TGTGCTGCCG CATGCCCGC 1080
 ACCCTGCGCC GGCTCTTCGT GGCTGAGCTG TGCAGCTGGA TGGCACTCAT GACCTTCACG 1140
 CTGTTTTACA CGGATTTCTG GGGCGAGGGG CTGTACCAGG GCGTGCCAG AGCTGAGCCG 1200
 GGCACCGAGG CCCGGAGACA CTATGATGAA GGC GTTCGGA TGGGCAGCCT GGGGCTGTTC 1260
 CTGCAGTGCG CCATCTCCCT GGTCTTCTCT CTGGTCATGG ACCGGCTGGT GCAGCGATTTC 1320
 GGCACGAG CAGTCTATTT GGCCAGTGTG GCAGCTTTC CTGTGGCTGC CCGTGCCACA 1380
 TGCCTGTCCC ACAGTGTGGC CGTGGTGACA GCTTCAGCCG CCCTCACCAG GTTCACCTTC 1440
 TCAGCCCTGC AGATCCTGCC CTACACACTG GCCTCCCTCT ACCACCGGGA GAAGCAGGTG 1500
 TTCCTGCCCA AATACCGAGG GGACACTGGA GGTGCTAGCA GTGAGGACAG CCTGATGACC 1560
 AGCTTCCTGC CAGGCCCTAA GCCTGGAGCT CCCTTCCCTA ATGGACACGT GGGTGCTGGA 1620
 GGCAGTGGCC TGCTCCACC TCCACCGCG CTCTGCGGGG CCTCTGCCTG TGATGTCTCC 1680
 GTACGTGTGG TGGTGGGTGA GCCCACCAG GCCAGGGTGG TTCCGGGCCG GGGCATCTGC 1740
 CTGGACCTCG CCATCCTGGA TAGTGCTTC CTGCTGTCCC AGGTGGCCCC ATCCCTGTTT 1800
 ATGGGCTCCA TTGTCCAGCT CAGCCAGTCT GTCACTGCCT ATATGGTGTG TGCCGAGGC 1860
 CTGGGTCTGG TCGCCATTTA CTTTGCTACA CAGGTAGTAT TTGACAAGAG CGACTTGGCC 1920
 AAATACTCAG CGGGTGGACA CCATCACCAT CACCATTAA 1959

FIG. 6. Estrategia de clonación para la generación del plásmido pRIT 15201



209

FIG. 7. Mapa del plásmido de pRIT15201

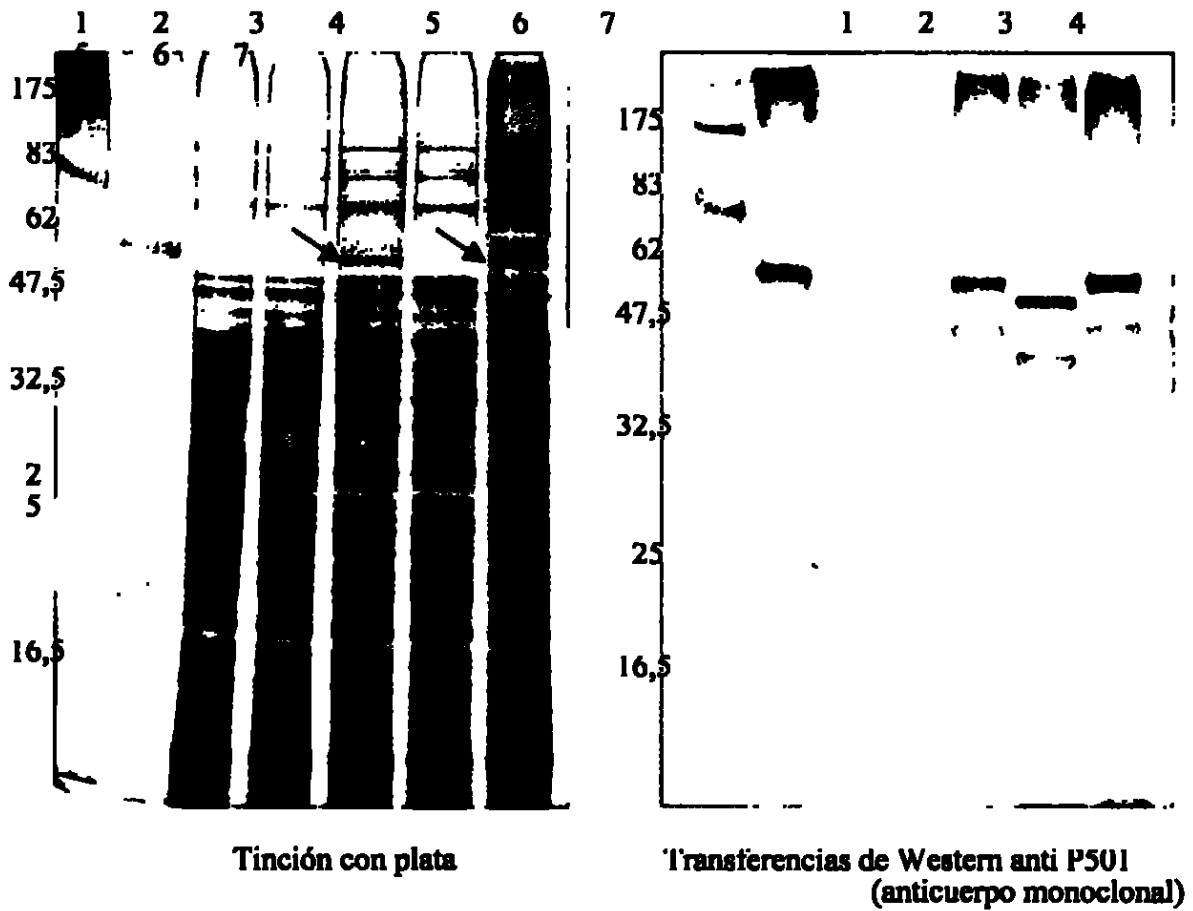


209

205

17/50

FIG. 8. Expresión comparativa de CPC P501 y P501 en *S.cerevisiae* cepa DC5 (10% de gel Laemmli)



- 1 MW Biolabs (175/83/62/47,5/32,5/16,5 Kda)
- 2 Y1796 purificado
- 3 Y1795 Extracto bruto (control negativo)
- 4 SC333 Extracto bruto
- 5 Y1796 Extracto bruto
- 6 Y1790 Extracto bruto
- 7 Y1802 Extracto bruto

206

FIG. 9A.

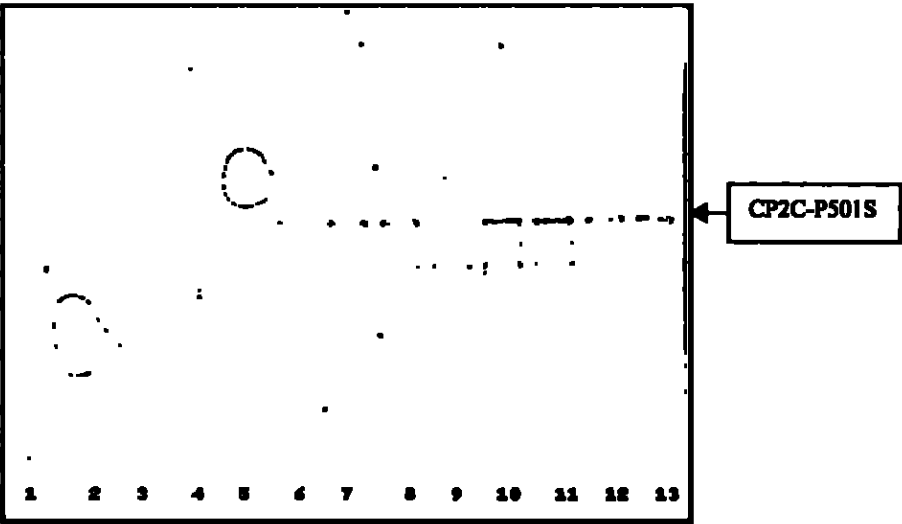
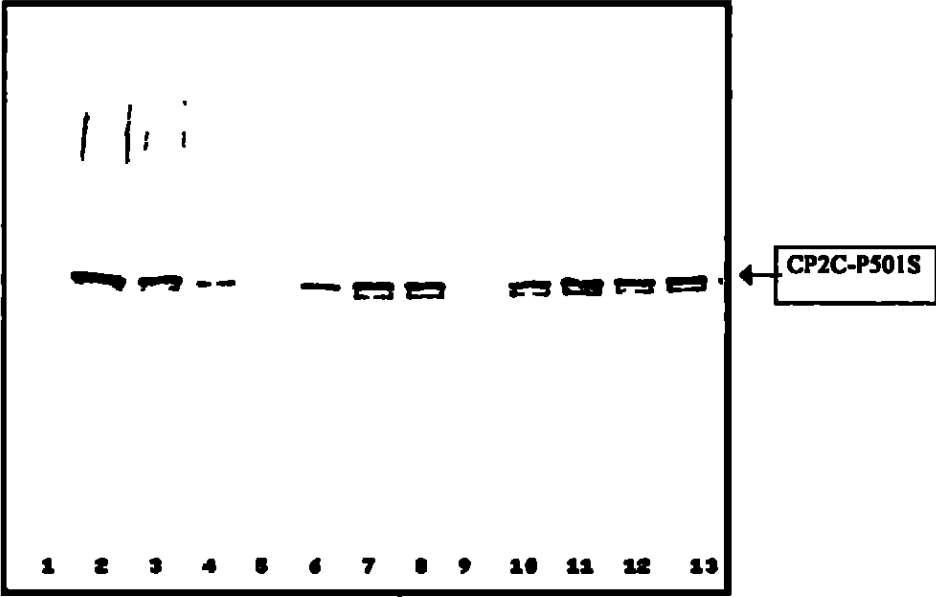


FIG. 9B.



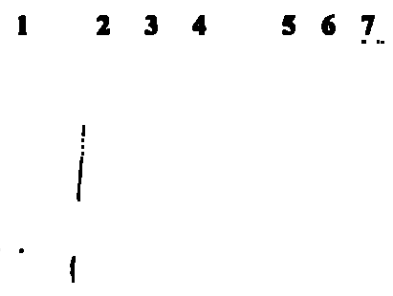
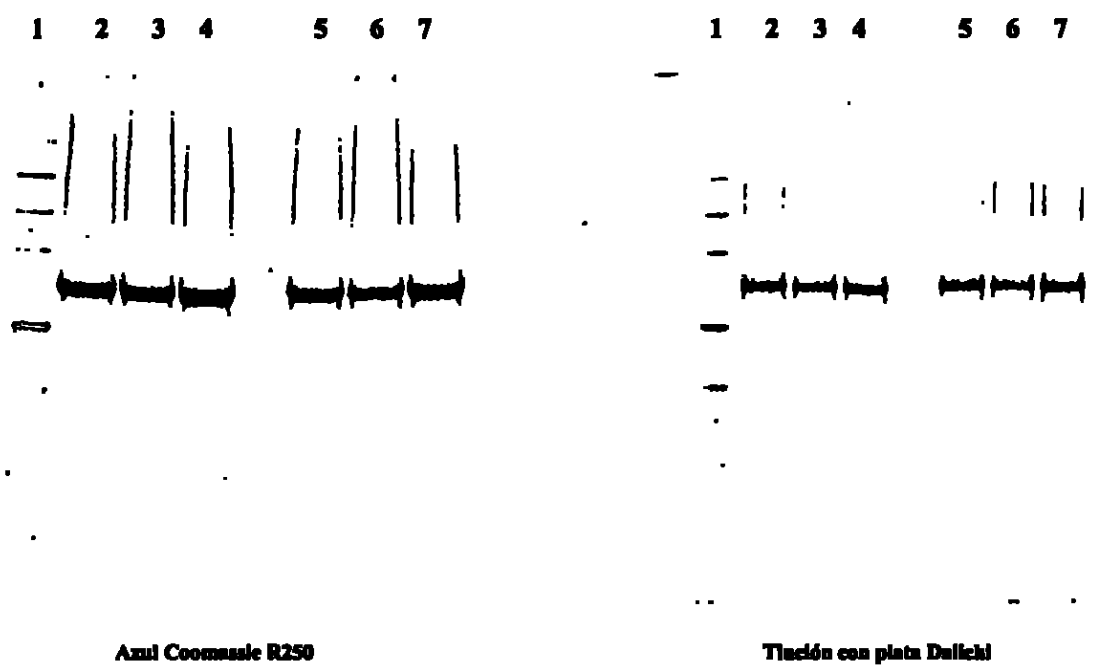
- 1. Marcador de peso molecular (Molnab - Intervalo de crecimiento) 175; 83; 62; 47,5; 32,5; 25; 16,5; 6,5 kD - 10
- 2. Referencia purificada CP2CP501S/12 135 ng
- 3. Referencia purificada CP2CP501S/12 67,8 ng
- 4. Referencia purificada CP2CP501S/12 33,9 ng
- 5. Referencia purificada CP2CP501S/12 16,9 ng
- 6. Fermentación PRO 119 - 21h 30
- 7. Fermentación PRO 124 - 21h 30
- 8. Fermentación PRO 124 - 22h 30
- 9. Fermentación PRO 127 - 0h
- 10. Fermentación PRO 127 - 4h
- 11. Fermentación PRO 127 - 6h
- 12. Fermentación PRO 127 - 22h 20
- 13. Fermentación PRO 127 - 22h 45

FIG. 10. Esquema de purificación de CPC-P501-His producido por Y1796.

Células de <i>S. Cerevisiae</i>	
↓	
Rotura por trituración en Dyno	OD 120 / 2 pases / Tris 20 mM pH 8,5 - EDTA 5 mM
↓	
Centrifugación	12,000 g / RT / 90 min (descarte de sobrenadante)
↓	
Lavado de sedimentos etapa 1	Tris 20 mM pH 8,5 - M NaCl 0,15 – Guanidina 2,0 M.HCl - Empigen al 0,1% (30 min / TA)
↓	
Centrifugación	12,000 g / TA / 60 min (descarte de sobrenadante)
↓	
Lavado de sedimentos etapa 2	Tris 20 mM pH 8,5 - NaCl 0,15 M – Urea 4,0 M
↓	
Centrifugación	12,000 g / TA / 30 min (descarte de sobrenadante)
↓	
Solubilización / Reducción	Tris 20 mM pH 8,5 - NaCl 0,15 M - Urea 8,0 M – SDS al 1% - Glutathion 0,2 M (60 min / TA)
↓	
Centrifugación	12,000 g / TA / 30 min (descarte de sedimentos)
↓	
Carbamidometilación	yodoacetamida 0,3 M (30 min / TA / en oscuridad) / pH ajustado hasta 8,5 (con solución de NaOH 5 M) antes de incubación
↓	
R/C Sobrenadante	
↓	
Dilución 10 veces y Ajuste de pH (8,5)	<u>Tampón de dilución:</u> Tris 20 mM pH 8,5 - NaCl 1 M - Urea 8,0 M
↓	
cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizada sobre Ni⁺⁺ - Sepharosa Quelante FF (Amersham) (columna 10x25 cm– 2000 ml)	<u>Tampón de compensación:</u> Tris 20 mM pH 8,5 – NaCl 0,9 M - Urea 8,0 M – SDS al 0,1% <u>Tampones de lavado:</u> 1) Tampón de compensación 2) Tris 20 mM pH 8,5 - NaCl 0,15 M - Urea 8,0 M – SDS al 0,1% 3) Tris 20 mM pH 8,5 – Urea 8,0 M - Tween 80 al 0,1% <u>Tampón de elución:</u> Tris 20 mM pH 8,5 – Urea 8,0 M - Tween 80 al 0,1% - Imidazole 0,5 M
↓	
Dilución 2 veces y ajuste de pH (10,0)	Piperazina 20 mM pH 10,0 - Urea 8,0 M - Tween 80 al 0,1%
↓	

Cromatografía de Intercambio aniónico en Q Sepharosa FF (Amersham) (columna 2,6 x 6,5 cm - 35 ml)	Tampón de compensación: Piperazina 20 mM pH 10,0 - Urea 8,0 M - Tween 80 al 0,1% Tampones de lavado: 1) Tampón de compensación 2) Tris 20 mM pH 8,5 - Urea 8,0 M - Tween 80 al 0,1% Tampón de elución: Tris 20 mM pH 7,5 - Urea 8,0 M - Tween 80 al 0,1% - NaCl 0,5 M
↓	
Concentración/Diafiltración (Pall - Omega 10 kDa - 200 cm²)	Concentración +/- 3-fold Tampón de diafiltración: Tris 20 mM pH 7,5
↓	
Filtración estéril (Millipore - Millex GV 0,22µm)	
↓	
Masa purificada	Tampón final: Tris 20 mM pH 7,5 - Tween 80 al +/- 0,3%
↓	
Almacenamiento -20°C	

FIG. 11. Patrón de la proteína purificada CPC P501 Hls (4-12% de geles premoldeados de poliacrilamida Novex Nu-Page)



- 1. MW (250/150/75/37/25/15/10kDa)
- 2. Masa purificada A (condiciones reductoras)
- 3. Masa purificada B (condiciones reductoras)
- 4. Masa purificada C (condiciones reductoras)
- 5. Masa purificada A (condiciones no reductoras)
- 6. Masa purificada B (condiciones no reductoras)
- 7. Masa purificada C (condiciones no reductoras)

**Transferencias Western anti P501S
(Anticuerpo monoclonal)**

FIG. 12. Secuencia de P501S de longitud completa nativa (SEC ID N° 17 y 43)

Secuencia de nucleótidos: SEC ID N° 17

Secuencia polipeptídica: SEC ID N° 43

#####

GCCACCATGGTCCAGAGGCTGTGGGTGAGCCGCCTGCTGCGGCACCGG
M V Q R L W V S R L L R H R 14AAAGCCCAGCTCTTGCTGGTCAACCTGCTAACCTTTGGCCTGGAGGTGTGTTTGGCCGCA
K A Q L L L V N L L T F G L E V C L A A 34GGCATCACCTATGTGCCGCCTCTGCTGCTGGAAGTGGGGGTAGAGGAGAAGTTCATGACC
G I T Y V P P L L L E V G V E E K F M T 54ATGGTGCTGGGCATTGGTCCAGTGCTGGGCCTGGTCTGTGTCCCGCTCCTAGGCTCAGCC
M V L G I G P V L G L V C V P L L G S A 74AGTGACCACTGGCGTGGACGCTATGGCCGCCGCCGCCCTTCATCTGGGCACTGTCCCTG
S D H W R G R Y G R R R P F I W A L S L 94GGCATCCTGCTGAGCCTCTTTCTCATCCCAAGGGCCGGCTGGCTAGCAGGGCTGCTGTGC
G I L L S L F L I P R A G W L A G L L C 114CCGGATCCCAGGCCCTGGAGCTGGCACTGCTCATCCTGGGCGTGGGGCTGCTGGACTTC
P D P R P L E L A L L I L G V G L L D F 134TGTGGCCAGGTGTGCTTCACTCCACTGGAGGCCCTGCTCTCTGACCTCTCCGGGACCCG
C G Q V C F T P L E A L L S D L F R D P 154GACCACTGTCGCCAGGCCTACTCTGTCTATGCCTTCATGATCAGTCTTGGGGGCTGCCTG
D H C R Q A Y S V Y A F M I S L G G C L 174GGCTACCTCCTGCCTGCCATTGACTGGGACACCAGTGCCCTGGCCCCCTACCTGGGCACC
G Y L L P A I D W D T S A L A P Y L G T 194CAGGAGGAGTGCCTCTTTGGCCTGCTCACCCCTCATCTTCCTCACCTGCGTAGCAGCCACA
Q E E C L F G L L T L I F L T C V A A T 214CTGCTGGTGGCTGAGGAGGCAGCGCTGGGCCCCACCGAGCCAGCAGAAGGGCTGTCGGCC
L L V A E E A A L G P T E P A E G L S A 234CCCTCCTTGTGCCCCACTGCTGTCCATGCCGGGCCCGCTTGGCTTTCCGGAACCTGGGC
P S L S P H C C P C R A R L A F R N L G 254GCCCTGCTTCCCCGGCTGCACCAGCTGTGCTGCCGCATGCCCCGCACCCTGCGCCGGCTC
A L L P R L H Q L C C R M P R T L R R L 274TTCGTGGCTGAGCTGTGCAGCTGGATGGCACTCATGAOCTTCACGCTGTTTTACACGGAT
F V A E L C S W M A L M T F T L F Y T D 294TTCGTGGGCGAGGGGCTGTACCAGGGCGTGCCAGAGCTGAGCCGGGCACCGAGGCCCGG
F V G E G L Y Q G V P R A E P G T E A R 314AGACACTATGATGAAGGCGTTCGGATGGGCAGCCTGGGGCTGTTCTGCACTGCGCCATC
R H Y D E G V R M G S L G L F L Q C A I 334TCCCTGGTCTTCTCTCTGGTCATGGACCGGCTGGTGCAGCGATTCCGGCACTCGAGCAGTC
S L V F S L V M D R L V Q R F G T R A V 354TATTTGGCCAGTGTGGCAGCTTTCCCTGTGGCTGCCGGTGCCACATGCCTGTCCACAGT
Y L A S V A A F P V A A G A T C L S H S 374GTGGCCGTGGTGACAGCTTCAGCCGCCCTACCGGGTTACCTTCTCAGCCCTGCAGATC
V A V V T A S A A L T G F T F S A L Q I 394CTGCCCTACACACTGGCCTCCCTCTACCACCGGGAGAAGCAGGTGTTCTGCCCAAATAC
L P Y T L A S L Y H R E K Q V F L P K Y 414

CGAGGGGACACTGGAGGTGCTAGCAGTGAGGACAGCCTGATGACCAGCTTCCTGCCAGGC

R G D T G G A S S E D S L M T S F L P G 434

CCTAAGCCTGGAGCTCCCTTCCCTAATGGACACGTGGGTGCTGGAGGCAGTGGCCTGCTC
P K P G A P F P N G H V G A G G S G L L 454

CCACCTCCACCCGCGCTCTGCGGGGCTCTGCCTGTGATGTCTCCGTACGTGTGGTGGTG
P P P P A L C G A S A C D V S V R V V V 474

GGTGAGCCCACCGAGGCCAGGGTGGTTCCGGGGCCGGGGCATCTGCCTGGACCTOGCCATC
G E P T E A R V V P G R G I C L D L A I 494

CTGGATAGTGCCTTCCTGCTGTCCCAGGTGGCCCCATCCCTGTTTATGGGCTCCATTGTC
L D S A F L L S Q V A P S L F M G S I V 514

CAGCTCAGCCAGTCTGTCACTGCCTATATGGTGTCTGCCGCAGGCCTGGGTCTGGTCGCC
Q L S Q S V T A Y M V S A A G L G L V A 534

ATTTACTTTGCTACACAGGTAGTATTTGACAAGAGCGACTTGGCCAAATACTCAGCGTAG
I Y F A T Q V V F D K S D L A K Y S A * 554

GTCGAG

FIG. 13. Secuencia del módulo de expresión CPC-P501S de JNW735 (SEC ID N° 18 y 44)

Secuencia de nucleótidos: SEC ID N° 18

Secuencia polipeptídica: SEC ID N° 44

GCCACCATGGCGGCGCTTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAA
M A A A Y V H S D G S Y P K 14

GACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTT
D K F E K I N G T W Y Y F D S S G Y M L 34

GCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACTCAGGCGAA
A D R W R K H T D G N W Y W F D N S G E 54

ATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCC
M A T G W K K I A D K W Y Y F N E E G A 74

ATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGC
M K T G W V K Y K D T W Y Y L D A K E G 94

GCCATGCAATACATCAAGGCTAACTCTAAGTTCATTGGTATCACTGAAGGCGTCATGGTA
A M Q Y I K A N S K F I G I T E G V M V 114

TCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGA
S N A F I Q S A D G T G W Y Y L K P D G 134

ACACTGGCAGACAGGCCAGAAAAGTTCATGTACATGGTGCTGGGCATTGGTCCAGTGCTG
T L A D R P E K F M Y M V L G I G P V L 154

GGCCTGGTCTGTGTCCCGCTCCTAGGCTCAGCCAGTGACCACTGGCGTGGACGCTATGGC
G L V C V P L L G S A S D H W R G R Y G 174

CGCCGCCGGCCCTTCATCTGGGCACTGTCTTGGGCATCCTGCTGAGCCTCTTTCTCATC
R R R P F I W A L S L G I L L S L F L I 194

CCAAGGGCCGGCTGGCTAGCAGGGCTGCTGTGCCCGGATCCCAGGCCCCCTGGAGCTGGCA
P R A G W L A G L L C P D P R P L E L A 214

CTGCTCATCCTGGGCGTGGGGCTGCTGGACTTCTGTGGCCAGGTGTGCTTCACTCCACTG
L L I L G V G L L D F C G Q V C F T P L 234

GAGGCCCTGCTCTCTGACCTCTTCCGGGACCCGGACCACTGTCGCCAGGCCTACTCTGTC
E A L L S D L F R D P D H C R Q A Y S V 254

TATGCCTTCATGATCAGTCTTGGGGGCTGCCTGGGCTACCTCCTGCCTGCCATTGACTGG
Y A F M I S L G G C L G Y L L P A I D W 274

GACACCAGTGCCCTGGCCCCCTACCTGGGCAACCAGGAGGAGTGCCTCTTTGGCCTGCTC
D T S A L A P Y L G T Q B E C L F G L L 294

ACCCTCATCTTCTCACCTGCGTAGCAGCCACACTGCTGGTGGCTGAGGAGGCAGCGCTG
T L I F L T C V A A T L L V A E E A A L 314

GGCCCCACCGAGCCAGCAGAAGGGCTGTGGCCCCCTCCTTGTGCCCCACTGCTGTCCA
G P T E P A E G L S A P S L S P H C C P 334

TGCCGGGGCCCGCTTGGCTTTCCGGAACCTGGGCGCCCTGCTTCCCCGGCTGCACCAGCTG
C R A R L A F R N L G A L L P R L H Q L 354

TGCTGCCGCATGCCCCGCACCCTGCGCCGGCTCTTCGTGGCTGAGCTGTGCAGCTGGATG
C C R M P R T L R R L F V A E L C S W M 374

GCACTCATGACCTTCACGCTGTTTTACACGGATTTCGTGGGCGAGGGGCTGTACCAGGGC
A L M T F T L F Y T D F V G E G L Y Q G 394

GTGCCAGAGCTGAGCCGGGCAACCGAGGCCCGGAGACACTATGATGAAGGCGTTCGGATG
V P R A E P G T E A R R H Y D E G V R M 414

GGCAGCCTGGGGCTGTTCTGTCAGTGGGCCATCTCCCTGGTCTTCTCTCTGGTCATGGAC
G S L G L F L Q C A I S L V F S L V M D 434

CGGCTGGTGCAGCGATTCCGGCACTCGAGCAGTCTATTTGGCCAGTGTGGCAGCTTTCCCT
R L V Q R F G T R A V Y L A S V A A F P 454

GTGGCTGCCGGTGCCACATGCCTGTCCCACAGTGTGGCCGTGGTGACAGCTTCAGCCGCC
V A A G A T C L S H S V A V V T A S A A 474

CTCACCGGGTTCACCTTCTCAGCCCTGCAGATCCTGCCCTACACACTGGCCTCCCTCTAC
L T G F T F S A L Q I L P Y T L A S L Y 494

CACCGGGAGAAGCAGGTGTTCTGCCCAAATACCGAGGGGACACTGGAGGTGCTAGCAGT
H R E K Q V F L P K Y R G D T G G A S S 514

GAGGACAGCCTGATGACCAGCTTCCTGCCAGGCCCTAAGCCTGGAGCTCCCTTCCCTAAT
E D S L M T S F L P G P K P G A P F P N 534

GGACACGTGGGTGCTGGAGGCAGTGGCCTGCTCCACCTCCACCCGCGCTCTGCGGGGCC
G H V G A G G S G L L P P P P A L C G A 554

TCTGCCTGTGATGTCTCCGTACGTGTGGTGGTGGGTGAGCCACCGAGGCCAGGGTGGTT
S A C D V S V R V V V G E P T E A R V V 574

CCGGGCCGGGGCATCTGCCTGGACCTCGCCATCCTGGATAGTGCCTTCCTGCTGTCCAG
P G R G I C L D L A I L D S A F L L S Q 594

GTGGCCCCATCCCTGTTTATGGGCTCCATTGTCCAGCTCAGCCAGTCTGTCACTGCCTAT
V A P S L F M G S I V Q L S Q S V T A Y 614

ATGGTGTCTGCCGAGGCCTGGGTCTGGTGGCCATTTACTTTGCTACACAGGTAGTATTT
M V S A A G L G L V A I Y F A T Q V V F 634

GACAAGAGCGACTTGGCCAAATACTCAGCGTAGGTGAG
D K S D L A K Y S A * 645

FIG. 14 – Secuencias optimizadas de codones P501S (SEC ID N° 19-20)

SEC ID N° 19

ATGGTGCAGCGGCTCTGGGTGAGCCGCCTCCTGCGGCATCGCAAGGCCAGCTCCTGCTGGT
 GAATCTGCTCACATTCGGCCTGGAGGTGTGCCTGGCCGCGGCATCACCTACGTGCCCCC
 TCCTGCTGGAGGTGGGAGTCGAGGAGAAGTTCATGACCATGGTGCTGGGCATTGGGCCCGTC
 CTGGGCCTCGTGTGCGTGCCCTCCTCGGCAGCGCTTCGACCATTGGCGCGGCCGGTATGG
 CCGCAGGAGACCCCTTCATCTGGGCTCTGAGTCTCGGCATCCTGCTGAGCCTGTTCTGATCCC
 TCGGGCCGGCTGGCTGGCCGGGCTGCTGTGCCCGATCCTCGGCCCTGGAGCTGGCCCTGC
 TGATCCTCGGCGTGGGCCTGCTGGACTTCTGCGGCCAGGTGTGCTTCACGCCCTGGAGGCA
 CTGCTGAGCGACCTGTTCCGGGACCCCGACCATTGCCGCCAGGCGTACAGCGTGTACGCCTT
 CATGATCTCCCTGGGAGGCTGCCTGGGCTACCTGCTCCCCGCCATCGATTGGGACACCAGCG
 CACTCGCCCCCTATCTCGGAACACAGGAGGAATGCCTGTTCCGATTGTTGACGCTCATCTTC
 CTCACGTGCGTCGCGGCCACCCTGTTGGTGGCCGAGGAGGCCGCCCTGGGGCCACCGAGCC
 GGCCGAGGGACTGAGCGCCCCGAGCCTGAGTCCACACTGCTGCCCTTGCCGGGGCCCGCTGG
 CCTTCCGTAATCTGGGCGCCCTCCTGCCTCGGCTCCATCAGCTGTGTTGCAGAATGCCTAGGA
 CGCTGCGGCGCCTGTTCTGTCGCTGAGTTGTGCTCCTGGATGGCTCTCATGACCTTACCCTGT
 TTTATACGGACTTCGTGCGGGAGGGCCTGTACCAGGGGGTGCCGCGCGCCGAGCCCGGGAC
 AGAGGCGCGCCGCACTACGACGAGGGAGTGCATATGGGCTCCCTGGGCCTCTTCTTGCACT
 GCGCCATCAGTCTGGTTTTCTCTCTGGTTCATGGACAGGCTGGTGCAGCGCTTCGGAACCCGG
 GCGGTGTACCTGGCGAGCGTGGCCGCCCTTCCCCGTGGCTGCCGGCGCCACCTGCCTCTCTCA
 CTCGGTGGCCGTGGTCAACGCCAGCGCCGCCCTGACCGGGTTCACCTTCTCTGCCCTGCAGA
 TTCTGCCTTACACCCTGGCCAGCCTGTACCATCGCGAGAAACAGGTGTTTCTCCCCAAGTAC
 AGAGGCGACACCGGGGGCGCCTCCAGCGAGGACAGCCTCATGACCTCCTTCTGCTGGCCC
 CAAGCCCGGCGCCCCCTTCCCCAACGGGCACGTGGGCGCCGGCGGGAGTGGGCTCCTGCCCC
 CCCCTCCTGCGCTGTGCGGGGCCAGCGCCTGCGACGTGAGCGTGCGCGTGGTGGTGGGCGA
 GCCACCGAGGCCCGCGTGGTGCAGGGCAGAGGCATTGTCTGGACCTGGCCATCCTCGACT
 CCGCCTTCTCCTCAGCCAGGTGGCCCCGTCCCTCTTCATGGGCTCTATCGTCCAGCTGTCTC
 AGAGCGTCAACGCTTACATGGTGTCCGCTGCTGGACTGGGCTTGGTGGCTATTTATTTGCCA
 CCCAGGTGGTGTTCGACAAGAGCGACCTGGCCAAATACTCCGCTGA

SEC ID N° 20

ATGGTGCAGCGGCTGTGGGTGTCCCGGCTGCTGCGCCATAGAAAGGCCAGTTGCTGCTGGT
 GAACCTGCTGACTTTCGGACTGGAGGTGTGCCTGGCTGCCGGGATCAOGTACGTGCCCCC
 TGCTGCTGGAGGTGGGCGTGGAGGAGAAGTTCATGACAATGGTGCTGGGCATCGGCCCGT
 CCTGGGCCTCGTGTGTGTGCCCTCCTCGGGAGTGCCTCCGATCATTTGGCGGGGCCGCTACG
 GCGGCCGAGACCGTTTCATCTGGGCCCTGAGCCTGGGGATCCTGCTCTCTCTCTCTCCTGATCC
 CCCGGGCGGCTGGCTGGCCGGCCTGCTGTGTCCCGACCCCGCCCTCTGGAGCTGGCCCTC
 CTGATCCTGGGCGTGGGCTTGTGGACTTCTGCGGCCAGGTGTGTTCACTCCCCTGGAGGCT
 CTGCTCTCCGACCTCTTCGCGACCCCGACCACTGTAGGCAGGCTTACAGCGTGTACGCCTTC
 ATGATCAGTCTGGGGGGATGCCTGGGCTATCTGCTGCCCGCTATCGACTGGGACACCAGCGC
 CCTGGCCCCCTACCTGGGGACTCAGGAGGAGTGCCTGTTCCGGCCTGCTCACCTTGATCTTCT
 GACGTGCGTCGCGGCCACCCTGCTGGTGGCCGAGGAGGCCGCCCTGGGGCCACCGAGCCC

GCCGAGGGCCTGAGCGCTCCCAGCCTGAGCCCCATTGCTGCCCGTGACAGGGCTAGGCTCGC
CTTCAGGAATCTGGGCGCTTTGCTGCCCCGCCTGCATCAGCTGTGCTGTGCGATGCCTCGCAC
CCTGCGCCGCTGTTTCGTCGCTGAGCTCTGTTCCCTGGATGGCCCTGATGACGTTACCCCTCTT
CTACACCGACTTCGTGGGGGAGGGCCTGTACCAGGGCGTGCCCAGGGCCGAGCCCGGCACC
GAGGCTAGGCGCCATTACGACGAGGGCGTCAGGATGGGCTCTCTGGGCCTCTTCCTGCAGTG
CGCCATCAGTCTGGTGTTCCTCTCTGGTGATGGACCGGCTGGTGACGCGCTTCGGCACCCGGG
CCGTGTACCTCGCCTCTGTGGCGGCTTTCCCCGTCGCCCGCCGGCGGACCTGCCTGTCTCATT
CTGTGCGCCGTGGTGACCGCCAGCGCCGCCCTGACCGGCTTCACCTTCAGTGCGCTCCAGATT
CTGCCCTACACCCTGGCGTCTCTGTACCATCGCGAGAAGCAGGTGTTCCCTGCCCAAGTACCG
CGGGGACACAGGGGGAGCTTCCTCTGAGGACAGCCTGATGACCAGCTTCTTGCCCGGCCCCA
AGCCGGGGGGCCCCTTTCCCCAACGGCCATGTGCGGGCGGGCGGCAGCGGCCTGCTCCCTCCC
CCCCCGCCCTGTGCGGCGCTAGTGCTGCGACGTGAGCGTGCGGGTGGTGGTGGGGGAGC
CCACCGAGGCTAGGGTCGTGCCTGGCCGGGGGATCTGCCTGGACCTGGCCATCCTCGACTCC
GCCTTCCTGCTCTCCAGGTGGCGCCCAGCCTGTTTCATGGGCAGTATCGTGACGCTGAGCCA
GAGCGTGACCGCCTACATGGTGAGCGCCCGCGCCTGGGGTTGGTGGCCATCTACTTTGCCA
CCCAGGTGCTGTTTCGACAAGAGCGATCTCGCCAAGTATAGCGCCTGA

FIG. 15 – Secuencia optimizada de codones remodelados genéticamente 19 (SEC ID N° 21)

GACGGCTAGCGCCACCATGGTGCAGCGGCTCTGGGTGAGCCGCCTCCTGCG
GCATCGCAAGGCCAGCTCCTGCTGGTGAATCTGCTCACATTTCGGCCTGGAG
GTGTGCCTGGCCGCCGGCATCACCTACGTGCCCCCCTCCTGCTGGAGGTGG
GAGTCGAGGAGAAGTTCATGACCATGGTGTCTGGGCATTGGGCCCGTCCTGG
GCCTCGTGTGCGTGCCTCTCCTCGGCAGCGCTTCCGACCATTGGCGCGGCCG
GTATGGCCGCAGGAGACCCCTTCATCTGGGCTCTGAGTCTCGGCATCCTGCTG
AGCCTGTTCTGATCCCTCGGGCCGGCTGGCTGGCCGGGCTGCTGTGCCCCG
ATCCTCGGCCCCCTGGAGCTGGCCCTGCTGATCCTCGGCGTGGGCCTGCTGGA
CTTCTGCGGCCAGGTGTGCTTCACGCCCCTGGAGGCACTGCTGAGCGACCTG
TTCCGGGACCCCGACCATTGCCGCCAGGCGTACAGCGTGTACGCCTTCATGA
TCTCCCTGGGAGGCTGCCTGGGCTACCTGCTCCCCGCCATCGATTGGGACAC
CAGCGCACTCGCCCCCTATCTCGGAACACAGGAGGAATGCCTGTTTCGGAQT
GTGACGCTCATCTTCCTCACGTGCGTCGCGGCCACCCTGTTGGTGGCCGAG
GAGGCCGCCCTGGGGCCACCGAGCCGGCCGAGGGACTGAGCGCCCCGAG
CCTGAGTCCACACTGCTGCCCTTGCCGGGCCCCGCCTGGCCTTCCGTAATCTG
GGCGCCCTCCTGCCTCGGCTCCATCAGCTGTGTTGCAGAATGCCTAGGACGC
TGCGGCGCCTGTTTCGTCGCTGAGTTGTGCTCCTGGATGGCTCTCATGACCTT
CACCTGTTTTATACGGACTTCGTCGGGGAGGGCCTGTACCAGGGGGTGCC
GCGCGCCGAGCCCGGGACAGAGGCGCGCCGCCACTACGACGAGGGAGTGC
GTATGGGCTCCCTGGGCCTCTTCTTGCAGTGCGCCATCAGTCTGGTTTTCTCT
CTGGTCATGGACAGGCTGGTGCAGCGCTTCGGAACCCGGGCGGTGTACCTG
GCGAGCGTGGCCGCCTTCCCCGTGGCTGCCGGCGCCACCTGCCTCTCTCACT
CGGTGGCCGTGGTCAACGCCAGCGCCGCCCTGACCGGGTTCACCTTCTCTGC
CCTGCAGATTCTGCCTTACACCCTGGCCAGCCTGTACCATCGCGAGAAACAG
GTGTTTCTCCCCAAGTACAGAGGCGACACCGGGGGCGCCTCCAGCGAGGAC
AGCCTCATGACCTCCTTCCTGCCTGGCCCCAAGCCCGGCGCCCCCTTTCCCCA
ACGGGCACGTGGGCGCCGGCGGGAGTGGGCTCCTGCCCCCCCCCTCCTGCGC
TGTGCGGGGCCAGCGCCTGCGACGTGAGCGTGC GCGTGGTGGTGGGCGAGC
CCACCGAGGCCCGCGTGGTGCCGGGCAGAGGCATTTGTCTGGACCTGGCCA
TCCTCGACTCCGCCTTCCTCCTCAGCCAGGTGGCCCCGTCCCTCTTCATGGG
CTCTATCGTCCAGCTGTCTCAGAGCGTCACCGCTTACATGGTGTCCGCTGCT
GGACTGGGCTTGGTGGCTATTTATTTGCCACCCAGGTGGTGTTCGACAAGA
GCGACCTGGCCAAATACTCCGCCTGACTCGAGGCAG

FIG. 16 – Secuencia optimizada de codones remodelados genéticamente 20 (SEC ID N° 22)

GACGGCTAGCGCCACCATGGTGCAGCGGCTGTGGGTGTCCCGGCTGCTGCGCCATAGAAAG
 GCCCAGTTGCTGCTGGTGAACCTGCTGACTTTCGGACTGGAGGTGTGCCTGGCTGCCGGGAT
 CACGTACGTGCCCCCCTGCTGCTGGAGGTGGGCGTGGAGGAGAAGTTCATGACAATGGTG
 CTGGGCATCGGCCCCGTCTGCGGCTCGTGTGTGTGCCCTCCTCGGGAGTGCGTCCGATCA
 TTGGCGGGGCGCTACGGCCGCCGACACCGTTCATCTGGGCGCTGAGCCTGGGCATCCTGC
 TCTCTCTCTCCTGATCCCCCGGGCCGGCTGGCTGGCCGGCCTGCTGTGTCCCGACCCCGCC
 CTCTGGAGCTGGCCCTCCTGATCCTGGGCGTGGGCGTGGACTTCTGCGGCCAGGTGTGT
 TTCACTCCCCTGGAGGCTCTGCTCTCCGACCTCTTCCGCGACCCCGACCACTGTAGGCAGGCT
 TACAGCGTGTACGCCTTCATGATCAGTCTGGGGGGATGCCTGGGCTATCTGCTGCCCGCTAT
 CGACTGGGACACCAAGCGCCCTGGCCCCCTACCTGGGGACTCAGGAGGAGTGCTGTTCCGGCC
 TGCTCACCTTGATCTTCCTGACGTGCGTCCCGCCACCTGCTGGTGGCCGAGGAGGCGGCC
 CTGGGGCCCCACCGAGCCCGCCGAGGGCCTGAGCGCTCCAGCCTGAGCCCCCAATTGCTGCCC
 GTGCAGGGCTAGGCTCGCCTTCAGGAATCTGGGCGCTTTGCTGCCCCCGCTGCATCAGCTGT
 GCTGTGCGATGCCTCGCACCTGCGCCGCCTGTTGCTGCTGAGCTCTGTTCTGATGGCCC
 TGATGACGTTACCCCTCTTCTACACCGACTTCGTGGGGGAGGGCCTGTACCAGGGCGTGCCC
 AGGGCCGAGCCCGGCCACCGAGGCTAGGCGCCATTACGACGAGGGCGTCAGGATGGGCTCTC
 TGGGCCTCTTCCTGCAGTGCGCCATCAGTCTGGTGTCTCTCTGCTGATGGACCGGCTGGTGC
 AGCGCTTCGGCACCCGGGCGGTGTACCTCGCCTCTGTGGCGGCTTTCCCGTCCCGCCGGC
 GCGACCTGCCTGTCTCATTCTGTGCGCGTGGTGACCGCCAGCGCCGCCCTGACCGGCTTCAC
 CTTCACTGCGCTCCAGATTCTGCCCTACACCTGGCGTCTCTGTACCATCGCGAGAAGCAGG
 TGTTCTGCCCCAAGTACCGCGGGGACACAGGGGGAGCTTCCTCTGAGGACAGCCTGATGACC
 AGCTTCTTGCCCCGGCCCCAAGCCGGGGGCCCCCTTTCCCCAACGGCCATGTCCGGGGCGGGCGG
 CAGCGGCCTGCTCCCTCCCCCCCCCGCCCTGTGCGGCGCTAGTGCCTGCGACGTGAGCGTGC
 GGGTGGTGGTGGGGGAGCCACCGAGGCTAGGGTCTGCTGCTGGCCGGGGGATCTGCCTGGA
 CCTGGCCATCCTCGACTCCGCCTTCCTGCTCTCCAGGTGGCGCCAGCCTGTTTCATGGGCAG
 TATCGTGCAGCTGAGCCAGAGCGTGACCGCCTACATGGTGAGCGCCCGCGCCCTGGGGTTG
 GTGGCCATCTACTTTGCCACCCAGGTGCTGTTCGACAAGAGCGATCTCGCCAAGTATAGCGC
 CTGACTCGAGGCAG

FIG. 17 – La secuencia de inicio para la optimización de CPC (SEC ID N°23)

Cuatro aminoácidos de la secuencia de P501S están encuadrados.

ATGGCGGCCGCTTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAA
 TGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACA
 CAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACTCAGGCGAAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAAT
 CGCTGATAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTAC
 AAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGCAATACATCAAGGCTAACT
 CTAAGTTCATTGGTATCACTGAAGGCGTCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGTCAGCGGAC
 GGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCAGACAGGCCAGAAAGGTTCA
 TGTAQ

FIG. 18 – Secuencias optimizadas de codones CPC representativos (SEC ID N° 24-25)**SEC ID N° 24**

ATGGCCGCGCCTACGTGCATAGCGACGGGAGCTACCCCAAGGACAAGTTTCGAGAAGATCA
 ACGGGACATGGTACTACTTCGACTCCTCCGGCTACATGCTCGCCGACCGCTGGCGGAAGCAC
 ACCGACGGCAACTGGTACTGGTTCGATAACTCGGGAGAGATGGCCACCGGCTGGAAGAAGA
 TCGCGGACAAGTGGTACTATTTCAACGAGGAGGGCGCCATGAAGACCGGCTGGGTGAAGTA
 TAAGGACACCTGGTACTACCTCGACGCCAAGGAGGGCGCCATGCAGTATATCAAGGCCAAC
 AGCAAGTTCATCGGCATCACCGAGGGAGTGATGGTCAGCAACGCCTTTATCCAGAGCGCCG
 ACGGCACCGGATGGTACTACTTGAAGCCGGACGGCACCCCTCGCGGATCGGCCCGAGAAGTT
 CATGTAC

SEC ID N° 25

ATGGCCGCGCCTACGTGCACAGCGACGGGTCTACCCAAAGGACAAGTTTCGAGAAGATCA
 ACGGCACGTGGTACTATTTGACAGCAGCGGCTACATGCTCGCCGATCGCTGGCGCAAGCAC
 ACCGACGGGAACTGGTACTGGTTCGACAACTCTGGCGAGATGGCTACGGGGTGAAGAAGA
 TCGCCGACAAGTGGTACTACTTCAACGAGGAGGGCGCCATGAAGACCGGGTGGGTGAAGTA
 CAAGGACACCTGGTACTACCTGGACGCTAAGGAGGGCGCCATGCAGTACATCAAGGCCAAC
 TCGAAGTTCATCGGGATCACCGAGGGCGTGATGGTCAGTAACGCTTTCATCCAGAGCGCGGA
 CGGCACAGGCTGGTATTACCTGAAGCCCGATGGCACCCCTGGCGGACAGACCTGAGAAATTC
 ATGTAC

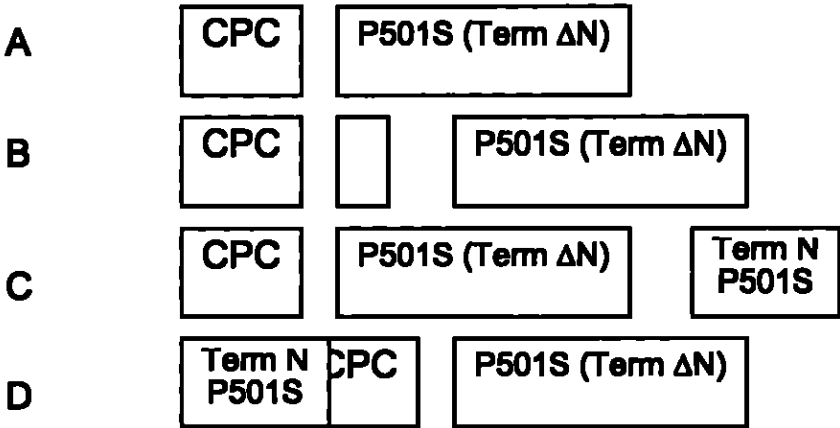
FIG. 19 – Secuencias optimizadas de codones CPC modificados genéticamente (SEC ID N° 26)**SEC ID N° 26**

GACGGCTAGCGCCACCATGGCCGCGCCTACGTGCATAGCGACGGGAGCTACCCCAAGGAC
 AAGTTTCGAGAAGATCAACGGGACATGGTACTACTTCGACTCCTCCGGCTACATGCTCGCCGA
 CCGCTGGCGGAAGCACACCGACGGCAACTGGTACTGGTTCGATAACTCGGGAGAGATGGCC
 ACCGGCTGGAAGAAGATCGCGGACAAGTGGTACTATTTCAACGAGGAGGGCGCCATGAAGA
 CCGGCTGGGTGAAGTATAAGGACACCTGGTACTACCTCGACGCCAAGGAGGGCGCCATGCA

GTATATCAAGGCCAACAGCAAGTTCATCGGCATCACCGAGGGAGTGATGGTCAGCAACGCC
TTTATCCAGAGCGCCGACGGCACCGGATGGTACTACTTGAAGCCGGACGGCACCCCTCGCGG
ATCGGCCCGAGAAGTTCATGTACTGACTCGAGGCAG

219

FIG. 20 – Construcciones y secuencias candidatas de fusión P501S CPC



Construcción A = SEC ID N°37 (nucleótido) y 45 (polipéptido)

GCGGCCGCGCCACCATGGCCGCCGCTACGTGCATAGCGACGGGAGCTACCCCAAGGACA
M A A A Y V H S D G S Y P K D K

AGTTCGAGAAGATCAACGGGACATGGTACTACTTCGACTCCTCCGGCTACATGCTCGCCG
F E K I N G T W Y Y F D S S G Y M L A D

ACCGCTGGCGGAAGCACACCGACGGCAACTGGTACTGGTTCGATAACTCGGGAGAGATGG
R W R K H T D G N W Y W F D N S G E M A

CCACCGGCTGGAAGAAGATCGCGGACAAGTGGTACTATTTCAACGAGGAGGGCGCCATGA
T G W K K I A D K W Y Y F N E E G A M K

AGACCGGCTGGGTGAAGTATAAGGACACCTGGTACTACCTCGACGCCAAGGAGGGCGCCA
T G W V K Y K D T W Y Y L D A K E G A M

TGCAGTATATCAAGGCCAACAGCAAGTTCATCGGCATCACCGAGGGAGTGATGGTCAGCA
Q Y I K A N S K F I G I T E G V M V S N

ACGCCTTTATCCAGAGCGCCGACGGCACCGGATGGTACTACTTGAAGCCGGACGGCACCC
A F I Q S A D G T G W Y Y L K P D G T L

TCGCGGATCGGCCCGAGAAGTTCATGTACATGGTGCTGGGCATCGGCCCGTCCTGGGGC
A D R P E K F M Y M V L G T G P V L G L

TCGTGTGTGTGCCCCCTCCTCGGGAGTGCGTCCGATCATTGGCGGGGCGCTACGGCCGCC
V C V P L L G S A S D H W R G R Y G R R

GCAGACCGTTCATCTGGGCCCCTGAGCCTGGGCATCCTGCTCTCTCTTCTGATCCCCC
R P F I W A L S L G I L L S L F L I P R

222

GGGCCGGCTGGCTGGCCGGCCTGCTGTGTCCCGACCCCGCCCTCTGGAGCTGGCCCTCC
A G W L A G L L C P D P R P L E L A L L

TGATCCTGGGCGTGGGCCCTGCTGGACTTCTGCGGCCAGGTGTGTTTCACTCCCTGGAGG
I L G V G L L D F C G Q V C F T P L E A

CTCTGCTCTCCGACCTCTTCCGCGACCCCGACCACTGTAGGCAGGCTTACAGCGTGTACG
L L S D L F R D P D H C R Q A Y S V Y A

CCTTCATGATCAGTCTGGGGGGATGCCTGGGCTATCTGCTGCCCGCTATCGACTGGGACA
F M I S L G G C L G Y L L P A I D W D T

CCAGCGCCCTGGCCCCCTACCTGGGGACTCAGGAGGAGTGCCTGTTCCGGCCTGCTCACCT
S A L A P Y L G T Q E E C L F G L L T L

TGATCTTCCTGACGTGCGTCCGCCACCCCTGCTGGTGGCCGAGGAGGCGGCCCTGGGGC
I F L T C V A A T L L V A E E A A L G P

CCACCGAGCCCGCCGAGGGCCTGAGCGCTCCAGCCTGAGCCCCATTGCTGCCCGTGCA
T E P A E G L S A P S L S P H C C P C R

GGGCTAGGCTCGCCTTCAGGAATCTGGGCGCTTTGCTGCCCCGCTGCATCAGCTGTGCT
A R L A F R N L G A L L P R L H Q L C C

GTCGCATGCCTCGCACCCCTGCGCCGCTGTTCTGCTGAGCTCTGTTCTCTGGATGGCCC
R M P R T L R R L F V A E L C S W M A L

TGATGACGTTACCCCTCTTCTACACCGACTTCGTGGGGGAGGGCCTGTACCAGGGCGTGC
M T F T L F Y T D F V G E G L Y Q G V P

CCAGGGCCGAGCCCGGCACCGAGGCTAGGCGCCATTACGACGAGGGCGTCAGGATGGGCT
R A E P G T E A R R H Y D E G V R M G S

CTCTGGGCCTCTTCTGCACTGCGCCATCAGTCTGGTGTCTCTCTGGTGATGGACCGGC
L G L F L Q C A I S L V F S L V M D R L

TGGTGCAGCGCTTCGGCACCCGGGCGGTGTACCTCGCCTCTGTGGCGGCTTTCCCCGTGG
V Q R F G T R A V Y L A S V A A F P V A

CCGCCGGCGCGACCTGCCTGTCTCATTCTGTGCGCGTGGTGACCGCCAGCGCCGOCCTGA
A G A T C L S H S V A V V T A S A A L T

CCGGCTTCACCTTCAGTGCGCTCCAGATTCTGCCCTACACCCTGGCGTCTCTGTACCATC
G F T F S A L Q I L P Y T L A S L Y H R

GCGAGAAGCAGGTGTTCTGCCCAAGTACCGCGGGGACACAGGGGGAGCTTCCTCTGAGG
E K Q V F L P K Y R G D T G G A S S E D

ACAGCCTGATGACCAGCTTCTTGCCCGGCCCAAGCCGGGGGCCCTTTCCCCAACGGCC
S L M T S F L P G P K P G A P F P N G H

ATGTCGGGGCGGGCGGCAGCGGCCTGCTCCCTCCCCCCCCCGCCTGTGCGGCGCTAGTG
V G A G G S G L L P P P P A L C G A S A

CCTGCGACGTGAGCGTGCGGGTGGTGGTGGGGGAGCCCACCGAGGCTAGGGTCGTGCCTG
C D V S V R V V V G E P T E A R V V P G

GCCGGGGGATCTGCCTGGACCTGGCCATCCTCGACTCCGCCTTCCTGCTCTCCCAGGTGG
R G I C L D L A I L D S A F L L S Q V A

CGCCCAGCCTGTTTCATGGGCAGTATCGTGCAGCTGAGCCAGAGCGTGACCGCCTACATGG
P S L F M G S I V Q L S Q S V T A Y M V

TGAGCGCCGCCCGGCCTGGGGTTGGTGGCCATCTACTTTGCCACCCAGGTTCGTGTTTCGACA
S A A G L G L V A I Y F A T Q V V F D K

AGAGCGATCTCGCCAAGTATAGCGCCTGAGGATCC
S D L A K Y S A *

Construcción B = SEC ID N°38 (nucleótido) y 46 (polipéptido)

GCGGCCGCGCCACCATGGCCGCCGCCTACGTGCATAGCGACGGGAGCTACCCCAAGGACA
M A A A Y V H S D G S Y P K D K

AGTTCGAGAAGATCAACGGGACATGGTACTACTTCGACTCCTCCGGCTACATGCTCGCCG
F E K I N G T W Y Y F D S S G Y M L A D

ACCGCTGGCGGAAGCACACCGACGGCAACTGGTACTGGTTCGATAACTCGGGAGAGATGG
R W R K H T D G N W Y W F D N S G E M A

CCACCGGCTGGAAGAAGATCGCGGACAACTGGTACTATTTC AACGAGGAGGGCGCCATGA
T G W K K I A D K W Y Y F N E E G A M K

AGACCGGCTGGGTGAAGTATAAGGACACCTGGTACTACCTCGACGCCAAGGAGGGCGCCA
T G W V K Y K D T W Y Y L D A K E G A M

TGCAGTATATCAAGGCCAACAGCAAGTTCATCGGCATCACCGAGGGAGTGATGGTCAGCA
Q Y I K A N S K F I G I T E G V M V S N

ACGCCTTTATCCAGAGCGCCGACGGCACCGGATGGTACTACTTGAAGCCGGACGGCACCC
A F I Q S A D G T G W Y Y L K P D G T L

TCGCGGATCGGCCCGAGATGGTGCAGCGGCTGTGGGTGTCCCGGCTGCTGCGCCATAGAA
A D R P E M V Q R L W V S R L L R H R K

AGGCCAGTTGCTGCTGGTGAACCTGCTGACTTTCGGACTGGAGGTGTGCCTGGCTGCCG
A Q L L L V N L L T F G L E V C L A A G

GGATCACGTACGTGCCCCCCTGCTGCTGGAGGTGGGCGTGGAGGAGAAGTTCATGACAA
I T Y V P P L L L E V G V E E K F M T M

TGGTGTGGGCATCGGCCCGTCTGGGCCTCGTGTGTGTGCCCTCCTCGGGAGTGCGT
V L G I G P V L G L V C V P L L G S A S

272

CCGATCATTGGCGGGGCGCTACGGCCGCGCAGACCGTTTCATCTGGGCCCTGAGCCTGG
 D H W R G R Y G R R R P F I W A L S L G
 GCATCCTGCTCTCTCTCTTCTGATCCCCGGGCGGCTGGCTGGCCGGCCTGCTGTGTC
 I L L S L F L I P R A G W L A G L L C P
 CCGACCCCCGCCCTCTGGAGCTGGCCCTCCTGATCCTGGGCGTGGGCCTGCTGGACTTCT
 D P R P L E L A L L I L G V G L L D F C
 GCGGCCAGGTGTGTTTCACTCCCCTGGAGGCTCTGCTCTCCGACCTCTCCGCGACCCCG
 G Q V C F T P L E A L L S D L F R D P D
 ACCACTGTAGGCAGGCTTACAGCGTGTACGCCTTCATGATCAGTCTGGGGGGATGCCTGG
 H C R Q A Y S V Y A F M I S L G G C L G
 GCTATCTGCTGCCCGCTATCGACTGGGACACCAGCGCCCTGGCCCCCTACCTGGGGACTC
 Y L L P A I D W D T S A L A P Y L G T Q
 AGGAGGAGTGCCTGTTCCGGCTGCTCACCTTGATCTTCTGACGTGCGTCGCGCCACCC
 E E C L F G L L T L I F L T C V A A T L
 TGCTGGTGGCCGAGGAGGCGGCCCTGGGGCCCCACCGAGCCCGCCGAGGGCCTGAGCGCTC
 L V A E E A A L G P T E P A E G L S A P
 CCAGCCTGAGCCCCCATTGCTGCCCGTGCAGGGCTAGGCTCGCCTTCAGGAATCTGGGCG
 S L S P H C C P C R A R L A F R N L G A
 CTTTGCTGCCCGCCTGCATCAGCTGTGCTGTCCGATGCCTCGCACCCCTGCGCCGCCTGT
 L L P R L H Q L C C R M P R T L R R L F
 TCGTCGCTGAGCTCTGTTCTGGATGGCCCTGATGACGTTACCCCTCTTCTACACCGACT
 V A E L C S W M A L M T F T L F Y T D F
 TCGTGGGGGAGGGCCTGTACCAGGGCGTGCCAGGGCCGAGCCCGGCACCGAGGCTAGGC
 V G E G L Y Q G V P R A E P G T E A R R
 GCCATTACGACGAGGGCGTCAGGATGGGCTCTCTGGGCCTCTTCCTGCAGTGCGCCATCA
 H Y D E G V R M G S L G L F L Q C A I S
 GTCTGGTGTCTCTCTGGTGATGGACCGGCTGGTGCAGCGCTTCGGCACCCGGGCGGTGT
 L V F S L V M D R L V Q R F G T R A V Y
 ACCTCGCCTCTGTGGCGGCTTTCCCCGTCGCCGCCGGCGCGACCTGCCTGTCTCATTCTG
 L A S V A A F P V A A G A T C L S H S V
 TCGCCGTGGTGACCGCCAGCGCCGCCCTGACCGGCTTCACCTTCAGTGCGCTCCAGATTC
 A V V T A S A A L T G F T F S A L Q I L
 TGCCCTACACCCTGGCGTCTCTGTACCATCGCGAGAAGCAGGTGTTCTGCCCCAAGTACC
 P Y T L A S L Y H R E K Q V F L P K Y R
 GCGGGGACACAGGGGGAGCTTCTCTGAGGACAGCCTGATGACCAGCTTCTTGCCCGGCC
 G D T G G A S S E D S L M T S F L P G P
 CCAAGCCGGGGGCCCTTTCCCCAACGGCCATGTGCGGGGCGGGCGGCAGCGGCCTGCTCC

225

23

K P G A P F P N G H V G A G G S G L L P

CTCCCCCCCCCGCCCTGTGCGGCGCTAGTGCCCTGCGACGTGAGCGTGCGGGTGGTGGTGG
P P P A L C G A S A C D V S V R V V V GGGGAGCCCAACCGAGGCTAGGGTCGTGCCTGGCCGGGGGATCTGCCTGGACCTGGCCATCC
E P T E A R V V P G R G I C L D L A I LTCGACTCCGCCTTCCTGCTCTCCCAGGTGGCGCCAGCCTGTTTCATGGGCAGTATCGTGC
D S A F L L S Q V A P S L F M G S I V QAGCTGAGCCAGAGCGTGACCGCCTACATGGTGAGCGCCGCCGGCCTGGGGTTGGTGGCCA
L S Q S V T A Y M V S A A G L G L V A ITCTACTTTGCCACCCAGGTTCGTGTTGACAAGAGCGATCTCGCCAAGTATAGCGCCTGAG
Y F A T Q V V F D K S D L A K Y S A *

GATCC

286

224

Construcción C = SEC ID N°39 (nucleótido) y 47 (polipéptido)

GCGGCCGCGCCACCATGGCCGCGCCTACGTGCATAGCGACGGGAGCTACCCCAAGGACA
M A A A Y V H S D G S Y P K D K

AGTTCGAGAAGATCAACGGGACATGGTACTACTTCGACTCCTCCGGCTACATGCTCGCCG
F E K I N G T W Y Y F D S S G Y M L A D

ACCGCTGGCGGAAGCACACCGACGGCAACTGGTACTGGTTCGATAACTCGGGAGAGATGG
R W R K H T D G N W Y W F D N S G E M A

CCACCGGCTGGAAGAAGATCGCGGACAAGTGGTACTATTTCACGAGGAGGGCGCCATGA
T G W K K I A D K W Y Y F N E E G A M K

AGACCGGCTGGGTGAAGTATAAGGACACCTGGTACTACCTCGACGCCAAGGAGGGCGCCA
T G W V K Y K D T W Y Y L D A K E G A M

TGCAGTATATCAAGGCCAACAGCAAGTTCATCGGCATCACCGAGGGAGTGATGGTCAGCA
Q Y I K A N S K F I G I T E G V M V S N

ACGCCTTTATCCAGAGCGCCGACGGCACCGGATGGTACTACTTGAAGCCGGACGGCACCC
A F I Q S A D G T G W Y Y L K P D G T L

TCGCGGATCGGCCCGAGAAGTTCATGTACATGGTGCTGGGCATCGGCCCGTCTCTGGGCC
A D R P E K F M Y M V L G T G P V L G L

TCGTGTGTGTGCCCTCCTCGGGAGTGCGTCCGATCATTGGCGGGGCCGCTACGGCCGCC
V C V P L L G S A S D H W R G R Y G R R

GCAGACCGTTCATCTGGGCCCTGAGCCTGGGCATCCTGCTCTCTCTCTCTCTGATCCCCC
R P F I W A L S L G I L L S L F L I P R

GGGCCGGCTGGCTGGCCGGCCTGCTGTGTCCCAGCCCCCGCCCTCTGGAGCTGGCCCTCC
A G W L A G L L C P D P R P L E L A L L

TGATCCTGGGCGTGGGCCTGCTGGACTTCTGCGGCCAGGTGTGTTTCACTCCCCTGGAGG
I L G V G L L D F C G Q V C F T P L E A

CTCTGCTCTCCGACCTCTTCCGCGACCCCGACCACTGTAGGCAGGCTTACAGCGTGTACG
L L S D L F R D P D H C R Q A Y S V Y A

CCTTCATGATCAGTCTGGGGGGATGCCTGGGCTATCTGCTGCCCGCTATCGACTGGGACA
F M I S L G G C L G Y L L P A I D W D T

CCAGCGCCCTGGCCCCCTACCTGGGGACTCAGGAGGAGTGCCTGTTTCGGCCTGCTCACCT
S A L A P Y L G T Q E E C L F G L L T L

TGATCTTCTGACGTGCGTCGCCGCCACCCTGCTGGTGGCCGAGGAGGCGGCCCTGGGGC
I F L T C V A A T L L V A E E A A L G P

CCACCGAGCCCCGCCGAGGGCCTGAGCGCTCCAGCCTGAGCCCCCATTGCTGCCCGTGCA
T E P A E G L S A P S L S P H C C P C R

227

225

GGGCTAGGCTCGCCTTCAGGAATCTGGGCGCTTTGCTGCCCCGCTGCATCAGCTGTGCT
A R L A F R N L G A L L P R L H Q L C C

GTCGCATGCCTCGCACCCCTGCGCCGCTGTTGCTGCTGAGCTCTGTTCCCTGGATGGCCC
R M P R T L R R L F V A E L C S W M A L

TGATGACGTTACCCCTCTTCTACACCGACTTCGTGGGGGAGGGCCTGTACCAGGGCGTGC
M T F T L F Y T D F V G E G L Y Q G V P

CCAGGGCCGAGCCCCGGCACCGAGGCTAGGCGCCATTACGACGAGGGCGTCAGGATGGGCT
R A E P G T E A R R H Y D E G V R M G S

CTCTGGGCGCTCTTCTGCACTGCGCCATCAGTCTGGTGTTCTCTCTGGTGATGGACCGGC
L G L F L Q C A I S L V F S L V M D R L

TGGTGACGCGCTTCGGCACCCGGGCGGTGTACCTCGCCTCTGTGGCGGCTTTCCCCGTGG
V Q R F G T R A V Y L A S V A A F P V A

CCGCCGGCGCGACCTGCCTGTCTCATTCTGTGCGCGTGGTGACCGCCAGCGCCGCCCTGA
A G A T C L S H S V A V V T A S A A L T

CCGGCTTCACCTTCAGTGCGCTCCAGATTCTGCCCTACACCTGGCGTCTCTGTACCATC
G F T F S A L Q I L P Y T L A S L Y H R

GCGAGAAGCAGGTGTTCCCTGCCCAAGTACCGCGGGGACACAGGGGGAGCTTCCTCTGAGG
E K Q V F L P K Y R G D T G G A S S E D

ACAGCCTGATGACCAGCTTCTTGCCCGGCCCAAGCCGGGGGCCCCCTTTCCCCAACGGCC
S L M T S F L P G P K P G A P F P N G H

ATGTCGGGGCGGGCGGCAGCGGCCTGCTCCCTCCCCCCCCCGCCCTGTGCGGCGCTAGTG
V G A G G S G L L P P P P A L C G A S A

CCTGCGACGTGAGCGTGCGGGTGGTGGTGGGGGAGCCCACCGAGGCTAGGGTCGTGCCTG
C D V S V R V V V G E P T E A R V V P G

GCCGGGGGATCTGCCTGGACCTGGCCATCCTCGACTCCGCTTCCTGCTCTCCAGGTGG
R G I C L D L A I L D S A F L L S Q V A

CGCCCAGCCTGTTTCATGGGCAGTATCGTGCAGCTGAGCCAGAGCGTGACCGCCTACATGG
P S L F M G S I V Q L S Q S V T A Y M V

TGAGCGCCGCGGCGCTGGGGTTGGTGGCCATCTACTTTGCCACCCAGGTGCTGTTGACA
S A A G L G L V A I Y F A T Q V V F D K

AGAGCGATCTCGCCAAGTATAGCGCCATGGTGCAGCGGCTGTGGGTGTCCCGGCTGCTGC
S D L A K Y S A M V Q R L W V S R L L R

GCCATAGAAAGGCCAGTTGCTGCTGGTGAACCTGCTGACTTTCGGACTGGAGGTGTGCC
H R K A Q L L L V N L L T F G L E V C L

TGGCTGCCGGGATCACGTACGTGCCCCCCTGCTGCTGGAGGTGGGCGTGGAGGAGTGAG

228

AAGITYVPPLLEVGVEE*
GATCC

226

Construcción D = SEC ID N° 40 (nucleótido) y 48 (polipéptido)

CGGGCCGCGCCACCATGGTGCAGCGGCTGTGGGTGTCCCGGCTGCTGCGCCATAGAAAGG

M V Q R L W V S R L L R H R K A

CCCAGTTGCTGCTGGTGAACCTGCTGACTTTCGGACTGGAGGTGTGCCTGGCTGCCGGGA

Q L L L V N L L T F G L E V C L A A G I

TCACGTACGTGCCCCCCTGCTGCTGGAGGTGGGCGTGGAGGAGATGGCCGCGCCTACG

T Y V P P L L L E V G V E E M A A A Y V

TGCATAGCGACGGGAGCTACCCCAAGGACAAGTTCGAGAAGATCAACGGGACATGGTACT

H S D G S Y P K D K F E K I N G T W Y Y

ACTTCGACTCCTCCGGCTACATGCTCGCCGACCGCTGGCGGAAGCACACCGACGGCAACT

F D S S G Y M L A D R W R K H T D G N W

GGTACTGGTTTCGATAACTCGGGAGAGATGGCCACCGGCTGGAAGAAGATCGCGGACAAGT

Y W F D N S G E M A T G W K K I A D K W

GGTACTATTTCAACGAGGAGGGCGCCATGAAGACCGGCTGGGTGAAGTATAAGGACACCT

Y Y F N E E G A M K T G W V K Y K D T W

GGTACTACCTCGACGCCAAGGAGGGCGCCATGCAGTATATCAAGGCCAACAGCAAGTTCA

Y Y L D A K E G A M Q Y I K A N S K F I

TCGGCATCACCGAGGGAGTGATGGTCAGCAACGCCTTTATCCAGAGCGCCGACGGCACCG

G I T E G V M V S N A F I Q S A D G T G

GATGGTACTACTTGAAGCCGGACGGCACCCCTCGCGGATCGGCCCGAGAAGTTCATGTACA

W Y Y L K P D G T L A D R P E K F M Y M

TGGTGCTGGGCATCGGCCCCGTCCTGGGCCTCGTGTGTGTGCCCTCCTCGGGAGTGCGT

V L G I G P V L G L V C V P L L G S A S

CCGATCATTGGCGGGGCGCTACGGCCGCGCAGACCGTTCATCTGGGCCCTGAGCCTGG

D H W R G R Y G R R R P F I W A L S L G

GCATCCTGCTCTCTCTTCTGATCCCCGGGGCCGGCTGGCTGGCCGGCCTGCTGTGTC

I L L S L F L I P R A G W L A G L L C P

CCGACCCCGCCCTCTGGAGCTGGCCCTCCTGATCCTGGGCGTGGGCCTGCTGGACTTCT

D P R P L E L A L L I L G V G L L D F C

GCGGCCAGGTGTGTTTCACTCCCCTGGAGGCTCTGCTCTCCGACCTCTCCGCGACCCCG

G Q V C F T P L E A L L S D L F R D P D

ACCACTGTAGGCAGGCTTACAGCGTGTACGCCTTCATGATCAGTCTGGGGGGATGCCTGG

H C R Q A Y S V Y A F M I S L G G C L G

GCTATCTGCTGCCCGCTATCGACTGGGACACCAGCGCCCTGGCCCCCTACCTGGGGACTC

Y L L P A I D W D T S A L A P Y L G T Q

AGGAGGAGTGCCTGTTTCGGCCTGCTCACCTTGATCTTCCTGACGTGCGTCGCCGCCACCC
E E C L F G L L T L I F L T C V A A T L

TGCTGGTGGCCGAGGAGGCGGCCCTGGGGCCCAOCCAGCCCGCCGAGGGCCTGAGCGCTC
L V A E E A A L G P T E P A E G L S A P

CCAGCCTGAGCCCCATTGCTGCCCGTGACAGGGCTAGGCTCGCCTTCAGGAATCTGGGCG
S L S P H C C P C R A R L A F R N L G A

CTTTGCTGCCCCGCTGCATCAGCTGTGCTGTGCGCATGCCTCGCACCCCTGCGCCGCTGT
L L P R L H Q L C C R M P R T L R R L F

TCGTGCTGAGCTCTGTTCTGATGGCCCTGATGACGTTACCCCTCTTCTACACCGACT
V A E L C S W M A L M T F T L F Y T D F

TCGTGGGGGAGGGCCTGTACCAGGGCGTGCCAGGGCCGAGCCCGGCACCGAGGCTAGGC
V G E G L Y Q G V P R A E P G T E A R R

GCCATTACGACGAGGGCGTCAGGATGGGCTCTCTGGGCCTCTTCCTGCAGTGCGCCATCA
H Y D E G V R M G S L G L F L Q C A I S

GTCTGGTGTCTCTCTGGTGATGGACCGGCTGGTGCAGCGCTTCGGCACCCGGGCGCTGT
L V F S L V M D R L V Q R F G T R A V Y

ACCTCGCCTCTGTGGCGGCTTTCCCGTCGCCGCCGGCGCGACCTGCCTGTCTCATTCTG
L A S V A A F P V A A G A T C L S H S V

TCGCCGTGGTGACCGCCAGCGCCGCCCTGACCGGCTTCACCTTCAGTGCGCTCCAGATTC
A V V T A S A A L T G F T F S A L Q I L

TGCCCTACACCCTGGCGTCTCTGTACCATCGCGAGAAGCAGGTGTTCTCGCCCAAGTACC
P Y T L A S L Y H R E K Q V F L P K Y R

GCGGGGACACAGGGGGAGCTTCCTCTGAGGACAGCCTGATGACCAGCTTCTTGCCCGGCC
G D T G G A S S E D S L M T S F L P G P

CCAAGCCGGGGGCCCTTTCCCAACGGCCATGTGCGGGCGGGCGGCAGCGGCCTGCTCC
K P G A P F P N G H V G A G G S G L L P

CTCCCCCCCCCGCCCTGTGCGGCGCTAGTGCCTGCGACGTGAGCGTGCGGGTGGTGGTGG
P P P A L C G A S A C D V S V R V V V G

GGGAGCCACCGAGGCTAGGGTCGTGCCTGGCCGGGGATCTGCCTGGACCTGGCCATCC
E P T E A R V V P G R G I C L D L A I L

TCGACTCCGCCTTCCTGCTCTCCAGGTGGCGCCAGCCTGTTTCATGGGCAGTATCGTGC
D S A F L L S Q V A P S L F M G S I V Q

AGCTGAGCCAGAGCGTGACCGCCTACATGGTGAGCGCCGCCGGCCTGGGGTTGGTGGCCA
L S Q S V T A Y M V S A A G L G L V A I

TCTACTTTGCCACCCAGGTGCTGTTTCGACAAGAGCGATCTCGCCAAGTATAGCGCCTGAG
Y F A T Q V V F D K S D L A K Y S A *

GATCC

FIG. 21 – Análís de transferencias de Western de células CHO seguido de transfección transitoria con P501S (JNW680), CPC-P501S (JNW735) y control de vector vacío.

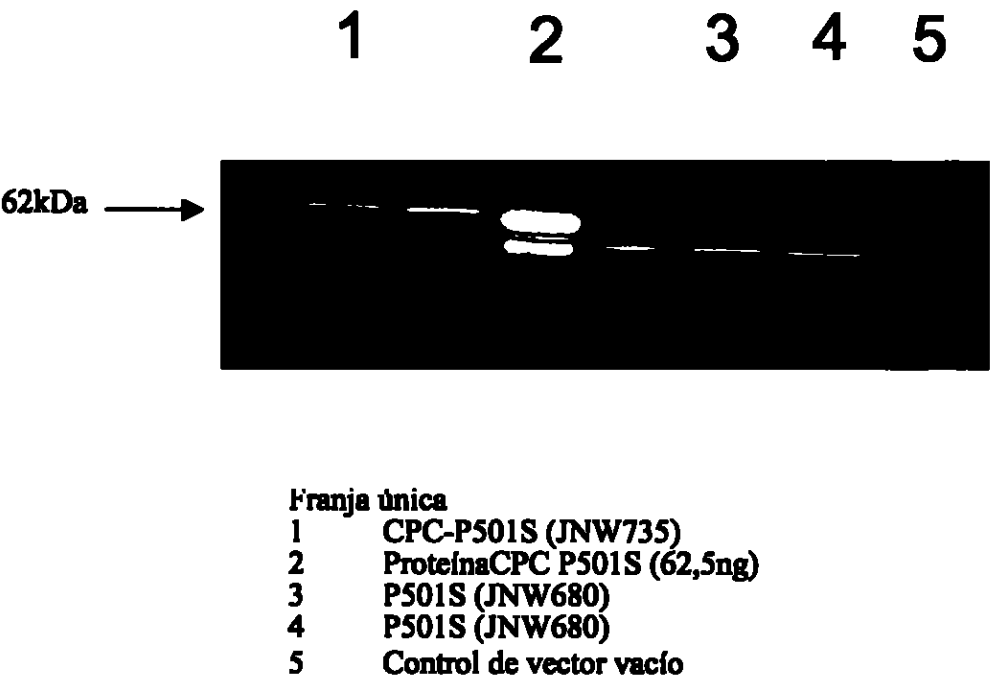


FIG. 22 – Respuestas anticuerpo Anti-P501S seguido de inmunización en los días 0, 21 y 42 con pVAC-P501S (JNW680, ratones B1-9) o vector vacío (pVAC, ratones A1-6).

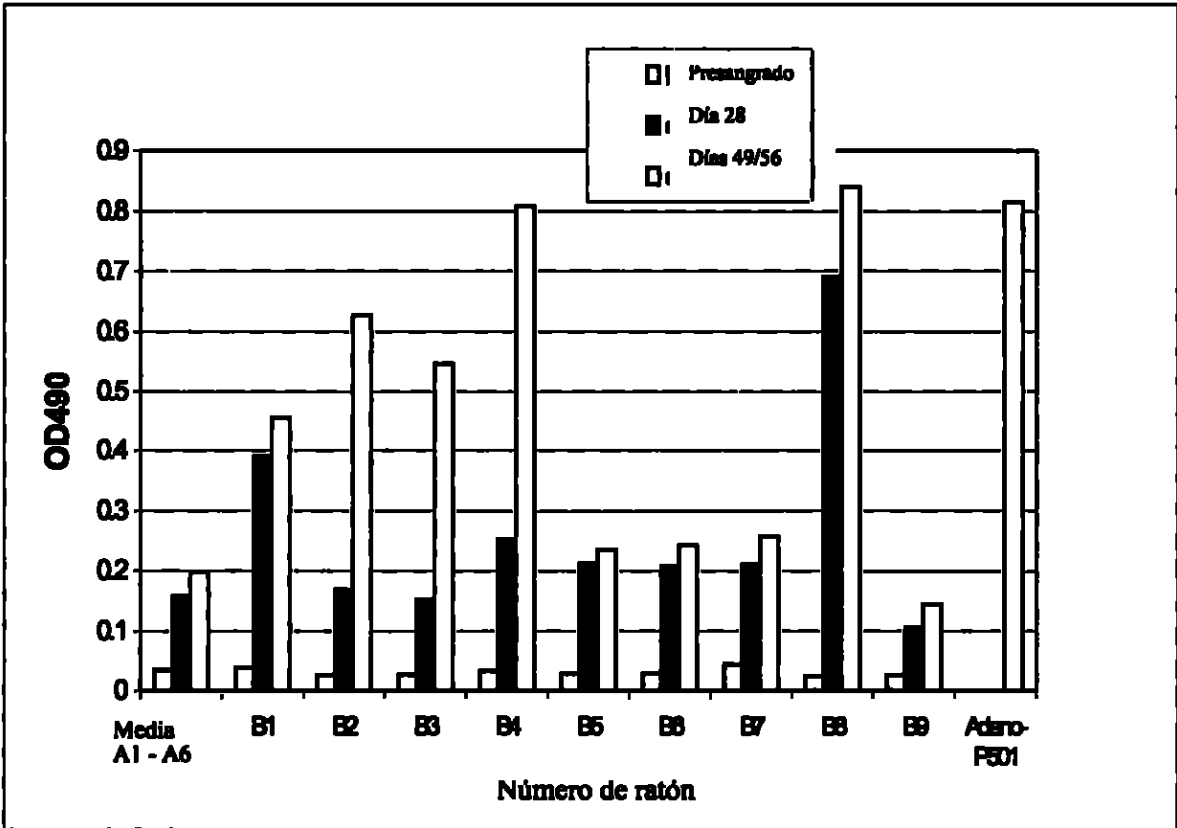
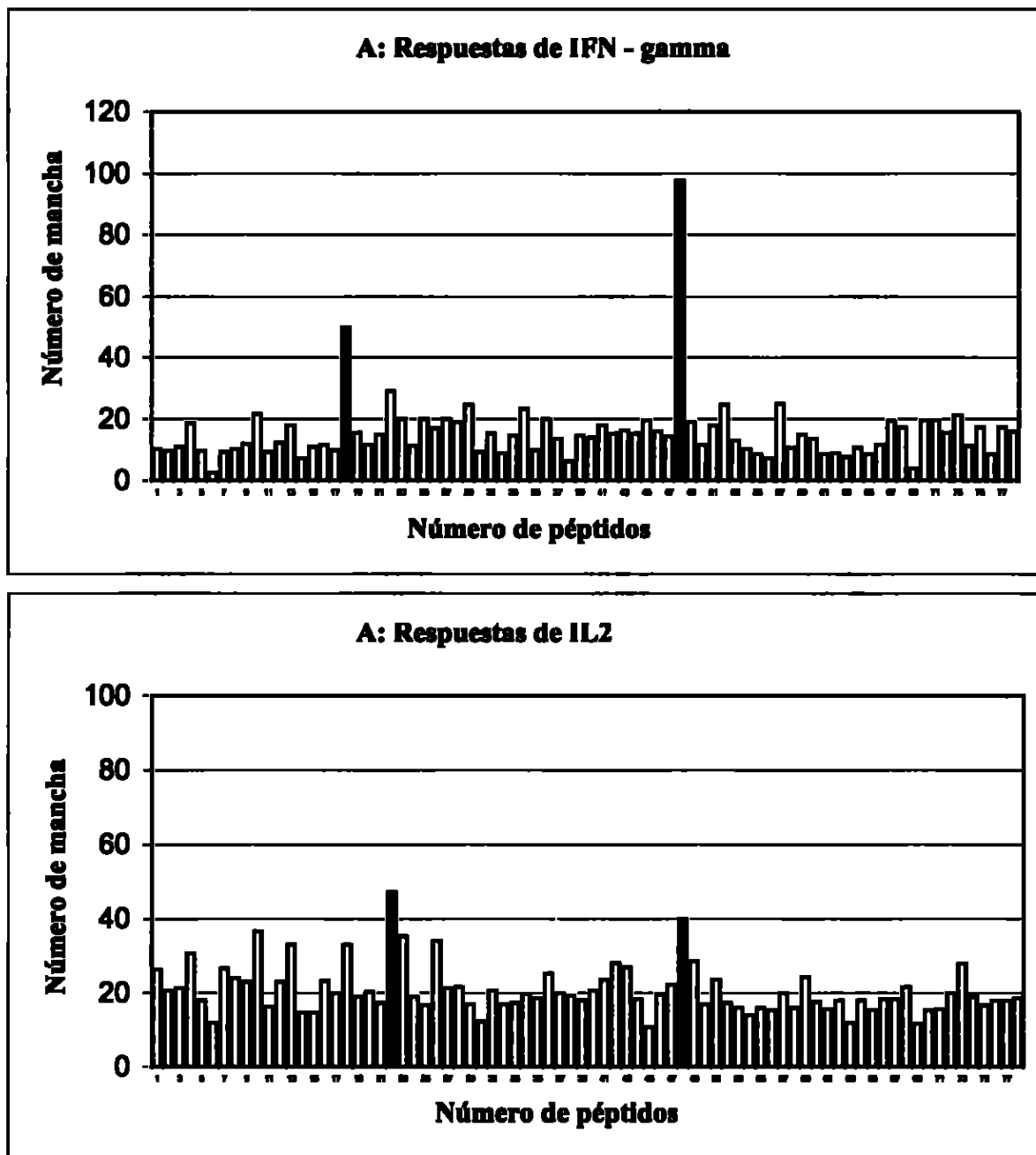


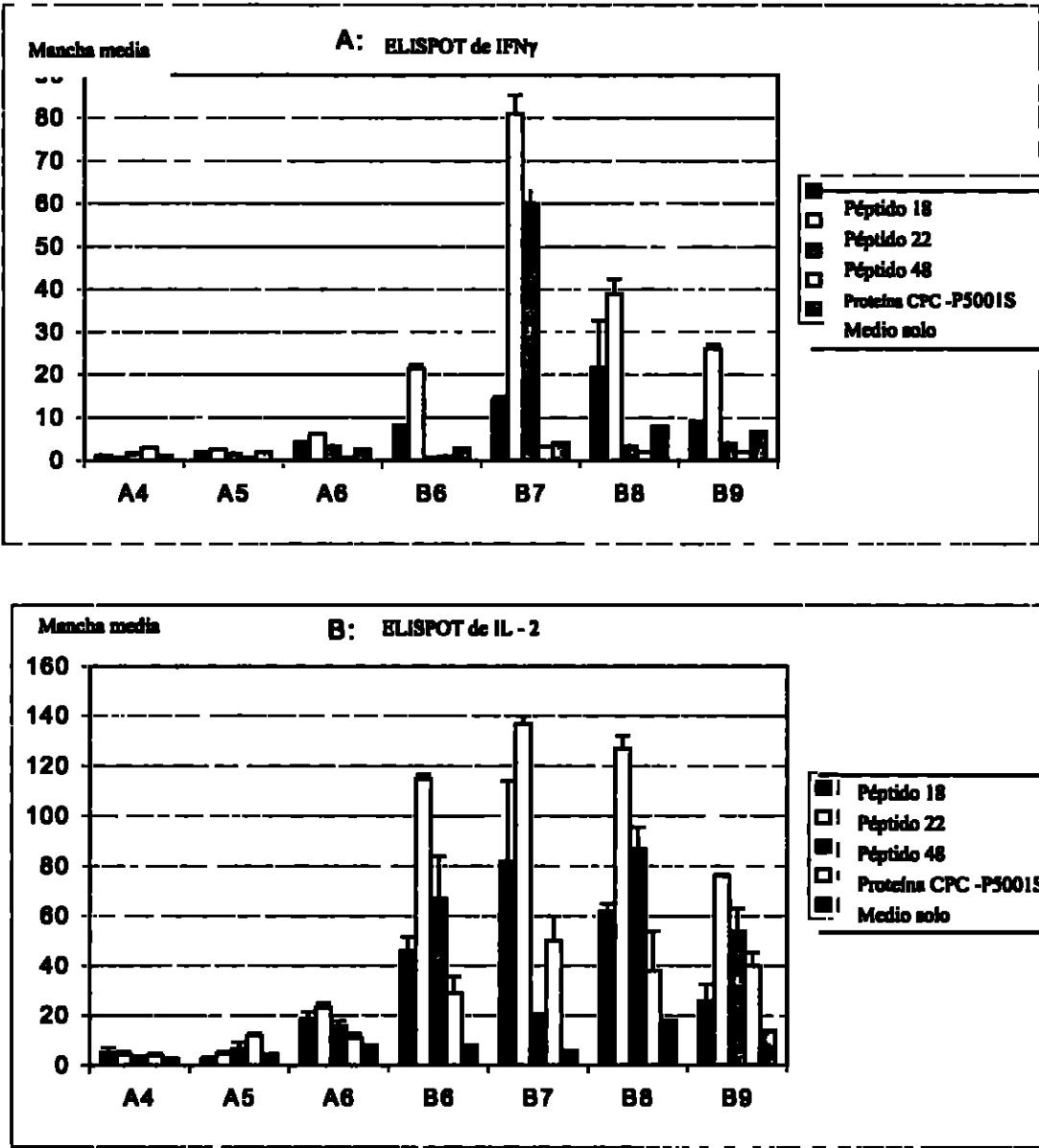
FIG. 23 – Análisis de biblioteca de péptidos usando ratones C57BL/6 inmunizados los días 0, 21, 42, y 70 con pVAC-P501S (JNW680).



13

FIG. 24 – Respuestas celulares mediante ELISPOT el día 77 seguido de inmunización con PMID los días 0, 21, 42, y 70 con pVAC-P501S (JNW680, B6-9) y pVAC vacío (A4-6).

El gráfico A muestra las respuestas de IFN- γ mientras el Gráfico B muestra las respuestas de IL-2.



233

FIG. 25 – Comparación de P501S y CPC-P501S.

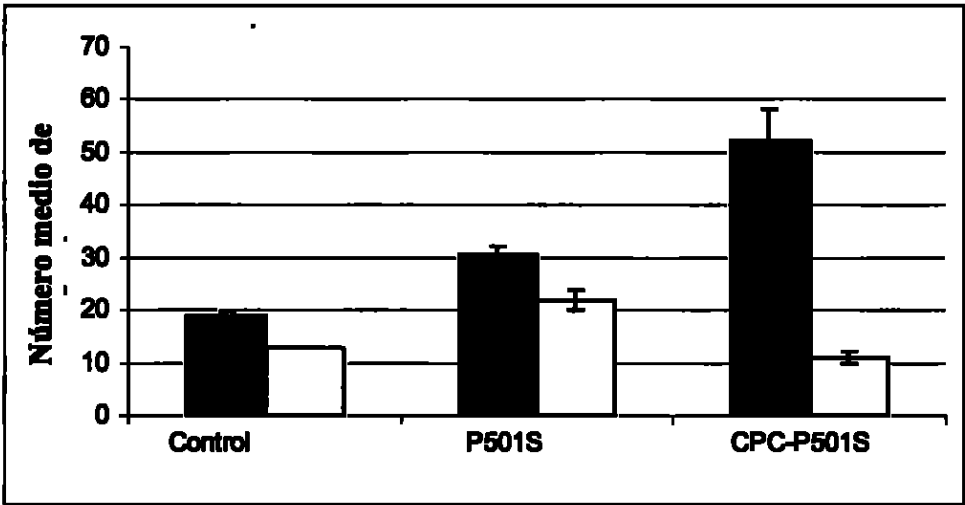
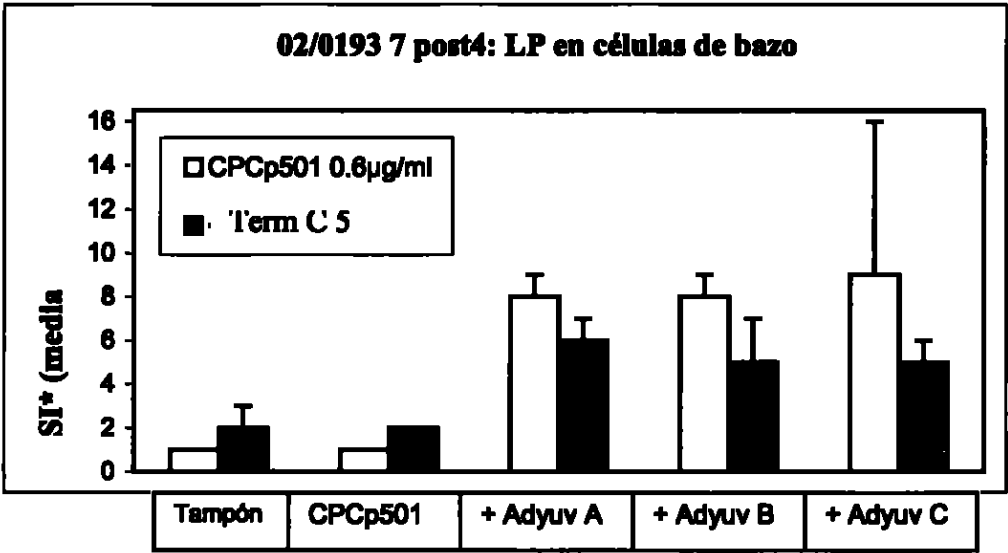


FIG. 26 – Respuesta inmune (linfoproliferación en células de bazo) seguido de inmunización de proteínas con CPC-P501S.



276

234

FIG. 27 – Evaluación de la respuesta inmune a diferentes construcciones de CPC-P501S

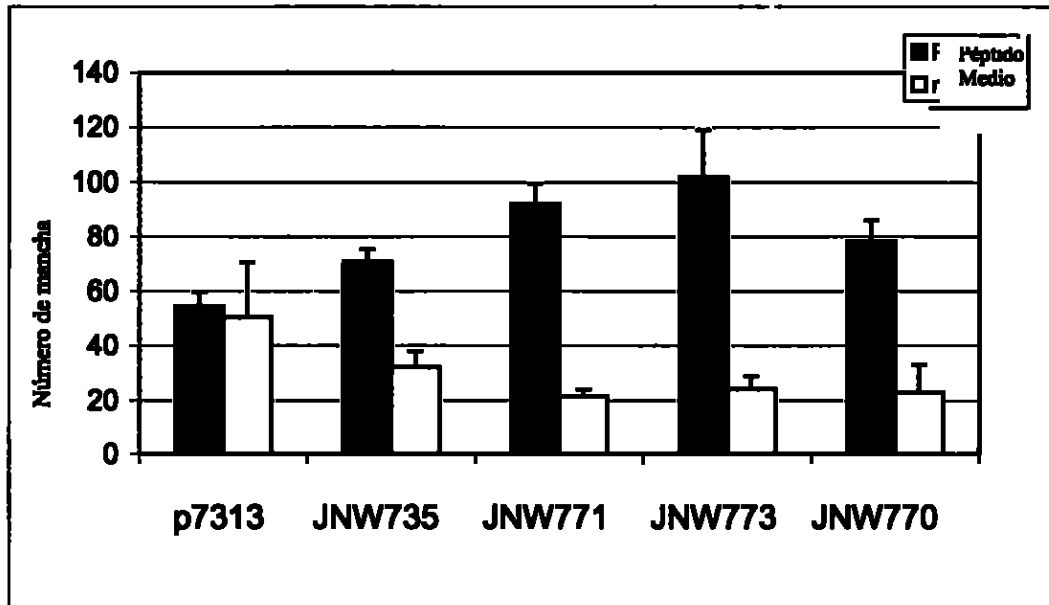


FIG 28. DNA y secuencias polipeptídica de MUC1-CPC**FIG. 28A. Secuencia de DNA (SEC ID N° 49)**

ATGACACCGGGCACCCAGTCTCCTTTCTTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGC
TTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCATGCAAGCTCTACCCCAGGTGGAGAAAA
GGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAGTTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAA
TGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGTACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGG
CTCCTCCACCACTCAGGGACAGGATGTCACTCTGGCCCCGGCCACGGAACC
AGCTTCAGGTTCAGCTGCCACCTGGGGACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTC
ACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACCACCCCGCCAGCCACGATGTCACCTCA
GCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGT
GTCACCTCGGCCCCGGACACCAGGCGCCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCA
GCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCGCCCCCGGGCTCCACC
GCGCCCCGAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGGCGGCCCCCG
GGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCCATGGTGTACCTCGGCCCCGGACAACAGG
CCCGCCTTGGCGTCCACCGCCCCCTCAGTCCACAATGTACCTCGGCCTCAG
GCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACTCTGGTGCACAACGGCACCTCTGCCAG
GGTACCACAACCCAGCCAGCAAGAGCACTCCATTCTCAATTCCCAGCCA
CCTCTGATACTCCTACCACCTTGCCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCC
AGTAGCACTCACCATAGCACGGTACCTCCTCTCACCTCCTCCAATCACAGCA
CTTCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTCTCTTTCTTTTCTGTCTTTTACATTT
CAAACCTCCAGTTTAATTCTCTCTGGAAGATCCCAGCACCGACTACTACCA
AGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAAATGTTTTTGCAGATTTATAACAAGG
GGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTAAGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTA
CAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAGGTACCATCAATGTCCACGACGTGGAG
ACACAGTTCAATCAGTATAAAACGGAAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACG
ATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATGTGCCATTTCTTTCTCTGCCCAGTCTG
GGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCATCGCGCTGCTGGTGTCTGTGTTCT
GGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCATTGCCTTGGCTGTCTGTCAGTGCCGCC
GAAAGAACTACGGGCAGCTGGACATCTTCCAGCCCGGGATACCTACCATC
CTATGAGCGAGTACCCACCTACCACACCCATGGGCGCTATGTGCCCCCTAG
CAGTACCGATCGTAGCCCCTATGAGAAGGTTTCTGCAGGTAATGGTGGCAG
CAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCAGTGGCAGCCACTTCTGCCAACTTGATG
GCGGCCGCTTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCCAAAAGACAAGTTTGAG
AAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTCAGGCTATATGCTTGCAG
ACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTACTGGTTCGACAACTCAG
GCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGATAAGTGGTACTATTTCA
ACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAAGTACAAGGACACTTGG

TACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGCAATACATCAAGGCTAACTCT
AAGTTCATTGGTATCACTGAAGGCGTCATGGTATCAAATGCCTTTATCCAGT
CAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCAGACGGAACACTGGCA
GACAGGCCAGAATGA

FIG. 28B. Secuencia polipeptídica de MUC1-CPC (SEC ID N° 50)

MTPGTQSPFFLLLLLVLT VVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKNAVS
MTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVTSPVTRPALG
STTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPPPGSTAPPAHGVTSAPDT
RPPPGSTAPAAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPALASTAPPVHNV
TSASGSASGSASTLVHNGTSARATTT PASKSTPFSIPSHHSDTP TTLASHSTKTD
SSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLQFNSSLED PSTDYYQELQR
DISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLT LAFREGTINVHDVETQFNQYKT
EAASRYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLVALAIVYLI
ALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSDRSPYEKVSA
GNGGSSLSYTNPAVAATSANLMAAA YVHSDGSSYPKDKFEKINGTWYYFDSSG
YMLADRWRKHTDGNWYWFDNSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTGW
VKYKDTWYYLDAKEGAMQYIKANSKFIGITEGVMVSNAFIQSADGTGWYYLK
PDGTLADRPE

FIG.29. Construcción y secuencia de ss-CPC-MUC1

FIG. 29A. Secuencia de DNA (SEC ID N° 51)

ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCC
ACTCCCAGGTCCAAATGGCGGCCGCTTACGTACATTCCGACGGCTCTTATCC
AAAAGACAAGTTTGAGAAAATCAATGGCACTTGGTACTACTTTGACAGTTC
AGGCTATATGCTTGCAGACCGCTGGAGGAAGCACACAGACGGCAACTGGTA
CTGGTTCGACAACCTCAGGCGAAATGGCTACAGGCTGGAAGAAAATCGCTGA
TAAGTGGTACTATTTCAACGAAGAAGGTGCCATGAAGACAGGCTGGGTCAA
GTACAAGGACACTTGGTACTACTTAGACGCTAAAGAAGGCGCCATGCAATA
CATCAAGGCTAACTCTAAGTTCATTGGTATCACTGAAGGCGTCATGGTATCA
AATGCCTTTATCCAGTCAGCGGACGGAACAGGCTGGTACTACCTCAAACCA
GACGGAACACTGGCAGACAGGCCAGAAATGACACCGGGCACCCAGTCTCCT
TTCTTCCTGCTGCTGCTCCTCACAGTGCTTACAGTTGTTACAGGTTCTGGTCA
TGCAAGCTCTACCCAGGTGGAGAAAAGGAGACTTCGGCTACCCAGAGAAG
TTCAGTGCCCAGCTCTACTGAGAAGAATGCTGTGAGTATGACCAGCAGCGT

ACTCTCCAGCCACAGCCCCGGTTCAGGCTCCTCCACCACTCAGGGACAGGA
 TGTCACCTCTGGCCCCGGCCACGGAACCAGCTTCAGGTTTCAGCTGCCACCTGG
 GGACAGGATGTCACCTCGGTCCCAGTCACCAGGCCAGCCCTGGGCTCCACC
 ACCCCGCCAGCCACGATGTCACCTCAGCCCCGGACAACAAGCCAGCCCCG
 GGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGGACACCAGG
 CCGCCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCACGGTGTACCTCGGCCCCGG
 ACACCAGGCCGCCCCCGGGCTCCACCGCGCCCCGCAGCCACGGTGTACCT
 CGGCCCCGGACACCAGGCCGGCCCCGGGCTCCACCGCCCCCCCCAGCCATG
 GTGTACCTCGGCCCCGGACAACAGGCCCGCCTTGGCGTCCACCGCCCCCTCC
 AGTCCACAATGTCACCTCGGCCTCAGGCTCTGCATCAGGCTCAGCTTCTACT
 CTGGTGCACAACGGCACCTCTGCCAGGGCTACCACAACCCCAGCCAGCAAG
 AGCACTCCATTCTCAATTCAGCCACCACTCTGATACTCCTACCACCCTTG
 CCAGCCATAGCACCAAGACTGATGCCAGTAGCACTCACCATAGCACGGTAC
 CTCCTCTCACCTCCTCAATCACAGCACTTCTCCCCAGTTGTCTACTGGGGTC
 TCTTTCTTTTCTCTGTCTTTTACATTTCAAACCTCCAGTTTAATTCCTCTCTG
 GAAGATCCCAGCACCGACTACTACCAAGAGCTGCAGAGAGACATTTCTGAA
 ATGTTTTTGCAGATTTATAACAAGGGGGTTTTCTGGGCCTCTCCAATATTA
 AGTTCAGGCCAGGATCTGTGGTGGTACAATTGACTCTGGCCTTCCGAGAAG
 GTACCATCAATGTCCACGACGTGGAGACACAGTTCAATCAGTATAAAACGG
 AAGCAGCCTCTCGATATAACCTGACGATCTCAGACGTCAGCGTGAGTGATG
 TGCCATTTCTTTCTCTGCCCAGTCTGGGGCTGGGGTGCCAGGCTGGGGCAT
 CGCGCTGCTGGTGTCTGGTCTGTGTTCTGGTTGCGCTGGCCATTGTCTATCTCA
 TTGCCTTGGCTGTCTGTCAAGTCCGCGCGAAAGAACTACGGGCAGCTGGACA
 TCTTTCCAGCCCGGGATACCTACCATCCTATGAGCGAGTACCCACCTACCA
 CACCCATGGGCGCTATGTGCCCCCTAGCAGTACCGATCGTAGCCCCCTATGAG
 AAGGTTTCTGCAGGTAATGGTGGCAGCAGCCTCTCTTACACAAACCCAGCA
 GTGGCAGCCACTTCTGCCAACTTGTAAG

FIG. 29B. Secuencia polipeptídica de la secuencia de proteínas de ss-CPC-MUC1 (SEC ID N° 52)

MGWSCILFLVATATGVHSQVQMAAAYVHSDGSYPKDKFEKINGTWYYFDSS
 GYMLADRWRKHTDGNWYWFDNSGEMATGWKKIADKWYYFNEEGAMKTG
 WVKYKDTWYYLDAKEGAMQYIKANSKFIGITEGVMVSNAFIQSADGTGWYYL
 KPDGTLADRPEMTPGTQSPFFLLLLLTVLTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSS
 VPSSTEKNAVSMSSSVLSSHSPSGSSSTTQGQDVTLPATEPASGSAATWGQDV
 TSVPVTRPALGSTTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPPPGSTAP
 PAHGVTSAPDTRPPPGSTAPAAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDNRPA
 LASTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTTASKSTPFSIPSHHSDTPT
 TLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSFFFLSFHISNLQFNSSLED

PSTDYYQELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVVQLTLAFREGTINVH
DVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCV
LVALAIVYLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSS
TDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

No. SOLICITUD
INTERNACIONAL : PCT/EP03/06096

(51) INT. CL.: C07K 14/315

Fecha: 06/06/03
(21) No. SOLICITUD: 04-122511

(71) SOLICITANTE: GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS
S.A Y GLAXO GROUP LIMITED

(22) FECHA DE
PRESENTACIÓN: 06-12-04

(30) PRIORIDAD: 0213365.0 y

(31) No. DE SOLICITUD: 0300914.9

(72) INVENTORES: CABEZON, Silva, Teresa, Elisa,
Virginia; ELLIS, Jonathan, H.;
GERARD, Catherine, Marie,
Ghislaine; Hamblin, Paul, A.;
PALMANTIER, Remi, M. y VINALS
Y DE BASSOLS, Carlota

(32) FECHA DE
PRESENTACIÓN: 11-06-02 y
15-01-03

(33) PAÍS: GB

(74) REPRESENTANTE LEGAL: ALICIA LLOREDA RICAURTE

(54) TÍTULO:

PI:W003/104272 Fecha: 18/12/2003

"COMPOSICIONES INMUNOGENICAS"

(57) RESUMEN:

Reivindicación número 1.-

Una proteína de la pareja de fusión que comprende un dominio de unión a colina y un epítopo auxiliar T promiscuo.

Reivindicación número 11.-

Una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de la reivindicación 1 a 10.

Reivindicación número 12.-

Un vector de expresión que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 11.

Reivindicación número 13.-

Un hospedador transformado con una secuencia de ácidos nucleicos de la reivindicación 11 o con un vector de expresión de la reivindicación 12.

Reivindicación número 14.-

Una composición inmunogénica que comprende una proteína según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una secuencia de DNA según la reivindicación 11 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

241

2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
ALICIA LLOREDA RICAURTE
Apoderado
GALXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA. Y GLAXO GROUP LIMITED

Oficio N° 11579

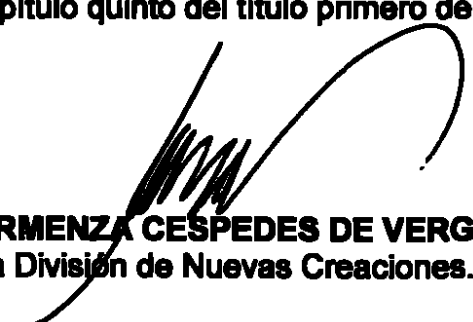
ASUNTO:	Radicación N°	04-122511
	Solicitud internacional	PCT/6
	Fecha inicio fase nacional	30/12/2004
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Folios	001

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

- La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486).
- El solicitante debe presentar un nuevo título que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el título relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9).

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha, 24 DIC. 2004.