



No. 13-105813-00000-0000

Fecha: 2013-04-25 16:36:51
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 4

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/245**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

DOMICILIO **RIXENSART, BÉLGICA.**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

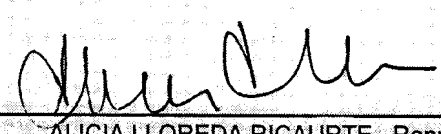
22. BOGOTÁ, D.C. _____

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-105813- -00000-0000 Fecha: 2013-04-25 16:36:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 4	5n
--	--	----

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2011/068040	Fecha 14/10/11
Publicación Internacional No.		WO 2012/049317 A3	Fecha 19/04/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCIÓN:		
"ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 39/245			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica		No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD Rixensart		E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Bélgica
PAÍS DE RESIDENCIA Bélgica			
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. BAUDOUX		Guy Jen, Marie, Fernand, Pierre	Bélgica
2. BLAIS		Normand	Canadá
3. MARCHAND		Martine	Bélgica
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Bélgica		Rixensart	1. GlaxoSmithKline Biologicals S.A., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica.
Canadá		Québec	2. ID Biomedical Corporation of Québec, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8, Canadá.
Bélgica		Rixensart	3. GlaxoSmithKline Biologicals S.A., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P 53.215
DIRECCIÓN Calle 72 No 5-83 Piso 5to		No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD Bogotá		E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS Colombia		No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América.		US	61/393,413	10/10/15

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i> ☐ SI ☒ NO Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.		Universidades públicas o privadas ☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.		Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-0035193	Fecha 15-04-2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>  ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano 1. ☒ Descripción N° de folios: 124 2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 49 3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 33 4. ☒ Resumen. 5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 7. ☐ Arte final 12 x 12. 8. ☒ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica 9. ☒ Poderes, si fuera el caso. 10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso. 12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso. 13. ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica. 14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

VER ANEXO CD

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:	
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1			
2			
3	13-105813		
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
Folio 3 CD

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

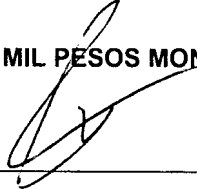
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0035193
		Bogotá D.C., Abril 15 de 2013 - 16:49:09

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.	NI 830.022.145
-----------------------------------	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	561170201	15/04/2013	15.484.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	
			Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
			500.000.00 500.000.00
			\$500.000.00
			=====

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: 

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-105813- -00000-0000
Fecha: 2013-04-25 16:36:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



No. 13-105813- -00000-0000

Fecha: 2013-04-25 16:36:51 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La invención se refiere a un polipéptido gB de citomegalovirus (CMV) que
5 comprende al menos una porción de un dominio extracelular de proteína gB que
comprende un dominio de bucle de fusión 1 (FL1) y un dominio de bucle de fusión
2 (FL2), en donde al menos uno de los dominios FL1 y FL2 comprende al menos
una eliminación o sustitución de aminoácido.

10 **SECTOR:** Industria farmacéutica, y particularmente un polipéptido gB de
Citomegalovirus y preparaciones farmacéuticas que lo contienen.

ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS

CAMPO TECNICO

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología. En particular, la invención proporciona composiciones, tales como, por ejemplo, vacunas, así como métodos para producir una respuesta inmune específica para Citomegalovirus (CMV).

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

 El citomegalovirus humano (HCMV) es un virus de ADN ubicuo que pertenece a la familia del virus de Herpes. El HCMV está hecho de un núcleo de ADN, y otra cápsida y está cubierto por una membrana de lípido la cual incorpora
15 glicoproteínas específicas de virus.

 El HCMV es endémico en la mayor parte del mundo. Sin embargo, la infección primaria normalmente da como resultado una enfermedad subclínica después de la cual el virus se vuelve latente reteniendo la capacidad de reactivarse en cualquier momento posterior. Entre dos poblaciones, el HCMV, sin
20 embargo, es responsable de serias condiciones médicas. El HCMV es la mayor causa de defectos congénitos en recién nacidos infectados en el útero. Es la causa más común de infección congénita en el mundo desarrollado. La infección congénita se refiere a la infección transmitida de la madre al feto antes del

nacimiento del recién nacido. Entre los recién nacidos congénitamente infectados, un 5-10% tienen síntomas clínicos mayores al nacer, tales como microcefalia, calcificaciones intracraneal, y hepatitis. Muchos bebés con infección por HCMV congénita son asintomáticos al nacer. Sin embargo, más estudios han mostrado
5 que el 15% de dichos bebés tendrán secuelas tales como pérdida del oído o anomalías del sistema nervioso central ocasionando, en particular, un deficiente desempeño intelectual.

La segunda población en riesgo son los pacientes inmunocomprometidos, tales como aquellos que padecen infección por VIH y aquellos que experimentan
10 trasplantes. En esta situación, el virus se vuelve un patógeno oportunista y ocasiona una enfermedad severa con alta morbilidad y mortalidad. La enfermedad clínica ocasiona una variedad de síntomas incluyendo fiebre, hepatitis, neumonitis y mononucleosis infecciosa.

Para dirigir enfermedades asociadas con HCMV, se desarrollaron vacunas
15 candidato que incluyen vacunas vivas atenuadas y vacunas de subunidad. En particular, recientemente una vacuna de subunidad que comprende una glicoproteína B modificada (gB) eliminada de su dominio de transmembrana combinada con la emulsión MF59™ se probó en un ensayo clínico de fase II (WO 2009/037359, N. Engl. J. Med. 2009; 360: 1 191 -9).

20

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

En un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un

polipéptido gB de citomegalovirus (CMV) que comprende al menos una porción de un dominio extracelular de proteína gB que comprende un dominio de bucle de fusión 1 (FL1) y un dominio de bucle de fusión 2 (FL2), en donde al menos uno de los dominios FL1 y FL2 comprende al menos una eliminación o sustitución de aminoácido.

En un segundo aspecto, se proporciona un polipéptido gB de CMV que comprende una eliminación de al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% de los aminoácidos de la secuencia líder, o de toda la secuencia líder.

En un tercer aspecto, se proporciona un polipéptido gB de CMV que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de las secuencias establecidas en: SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:10, SEC ID NO:12, SEC ID NO:14, SEC ID NO:16, SEC ID NO:18, SEC ID NO:19, SEC ID NO:20 y SEC ID NO:21.

En un cuarto aspecto se proporciona una preparación que comprende una población de polipéptidos gB de CMV, en donde al menos 50%, al menos 60%, o al menos 70% de la población está en una forma trimérica.

En un quinto aspecto, se proporciona una composición inmunogénica que comprende los polipéptidos gB de CMV de la invención mezclados con un vehículo farmacéutico adecuado.

En un aspecto adicional, se proporciona un polinucleótido que codifica los polipéptidos gB de CMV de la invención.

En otro aspecto más, se proporciona un polinucleótido que tiene la

secuencia seleccionada del grupo que consiste de las secuencias establecidas en: SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, SEC ID NO:11 , SEC ID NO:13, SEC ID NO:15, y SEC ID NO:17.

En otro aspecto adicional, se proporciona un vector recombinante que
5 comprende los polinucleótidos de la invención.

En otro aspecto más, se proporciona una célula huésped transformada con el vector recombinante de la invención.

En un aspecto más, se proporciona el uso de los polipéptidos gB de CMV de la invención en la preparación de un medicamento para evitar y/o tratar una
10 infección por CMV.

En otro aspecto, se proporcionan los polipéptidos gB de CMV de la invención para usarse en la prevención y/o tratamiento de la infección de CMV.

En otro aspecto más, se proporciona un método para producir una respuesta inmune contra CMV que comprende el paso de administrar a un sujeto
15 una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que comprende los polipéptidos gB de CMV de la invención.

DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es una representación esquemática del polipéptido gB de CMV derivado de la cepa AD169 que carece del dominio de transmembrana (gB-DeltaTM), así como tres polipéptidos gB de CMV ilustrativos descritos así: (i) CMV gB eliminado del dominio de transmembrana, en donde ambos bucles de fusión

FL1 y FL2 están mutados (gb-SLP12) (ver, SEC ID NO:3), (ii) CMV gB eliminado del dominio de transmembrana, en donde la mutación de manos bucles de fusión, FL1, y FL2, se combina con la eliminación de una región (Del2) en el dominio citoplásmico C-terminal que comprende un dominio rico en prolina, un patrón

5 hidrofóbico conservado y una región altamente hidrofílica, negativamente cargada (gb-SLP12-Del2) (ver, SEC ID NO:4, y (iii) CMV gB eliminado del dominio de transmembrana, en donde la mutación del bucle de fusión FL1 se combinó con la eliminación de la región antes descrita (Del2) en el dominio citoplásmico C-terminal del polipéptido (gb-SLP1-Del2) (ver, SEC ID NO:5). gb-SLP12, gb-

10 SLP12-Del2 y gb-SLP1-Del2 todos comprenden dos mutaciones de punto adicionales substituyendo arginina (R) con serina (S) en la posición 50 y 357. gb-SLP12-Del2 y gb-SLP1-Del2 ambos comprenden la mutación de punto adicional substituyendo una cisteína (C) por una alanina (A) en la posición 778. TM es para el dominio de transmembrana. FL1 es para Bucle de Fusión 1. FL2 es para Bucle

15 de Fusión 2. La eliminación Del2 empieza con el aminoácido 825 y termina con el aminoácido 877, es decir, estos dos aminoácidos son el primero y el último, respectivamente, de la región que es eliminada. Los números indicados se refieren a la posición de aminoácidos de la secuencia de CMV gB que se originan de la cepa AD169 y se establecen en SEC ID NO: 1.

20 La Figura 2 es una representación esquemática de polipéptidos gB de CMV ilustrativos aquí descritos. Todos los polipéptidos comprenden los bucles de fusión mutados FL1 y FL2. Además, gb-SLP12-Delta113 es eliminado del dominio de transmembrana y la parte C-terminal del dominio citoplásmico, es decir, los

aminoácidos 794 a 906. Además, gB-SLP12-Delta725 es eliminado de todo el dominio citoplásmico y retiene parte del dominio de transmembrana. LVL759 (o gB-SLP12-Delta725-LVL759), LVL776 (o gB-SLP12-Delta725-LVL776) y CD33 (o gB-SLP12-Delta725-CD33) tienen una estructura de base idéntica a gB-SLP12-Delta725, excepto para el extremo N-terminal, en donde la secuencia de aminoácido varía, como se indica. Los números indicados se refieren a la posición de aminoácidos de la secuencia de CMV gB que se origina de la cepa AD169 y se establece en SEC ID NO: 1.

La Figura 3 muestra el mapa del plásmido pMax que corresponde a la construcción gB-SLP12.

La Figura 4 muestra el mapa del plásmido pTT5 que corresponde a la construcción gB-SLP12-Delta725.

La Figura 5 muestra el nivel de expresión y de secreción de los tres diferentes polipéptidos gB ilustrativos expresados recombinantemente en células CHO, según comparado con el nivel de expresión y secreción del polipéptido gB de CMV eliminado del dominio de transmembrana de la técnica anterior. Se muestra un análisis de Tinción Western utilizando un anticuerpo anti-gB indicando el nivel de la proteína gB (ubicada en la tinción entre 150 kDa y 100 kDa) presente tanto en fracciones celulares (representando la forma no secretada de gB) como en sobrenadantes de cultivo (representando la forma secretada de gB) de distintos cultivos transfectados con las construcciones idénticas de gB. **Carril MW:** escalera de Peso Molecular, **Carril A:** fracción celular (C-Fr) de un cultivo transfectado con gB-DeltaTM, **Carril B:** C-Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP12, **Carril C:** C-

Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP1-Del2, **Carril D:** C-Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Del2, **Carril E:** sobrenadante de cultivo (C-Sn) de un cultivo transfectado con gB-DeltaTM, **Carril F:** C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12, **Carril G:** C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP1-Del2, **Carril H:**

5 C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Del2.

La Figura 6 muestra el nivel de expresión y de secreción de tres diferentes polipéptidos gB ilustrativos de acuerdo con la presente invención, gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113, y gB-SLP12-Delta725, los cuales fueron recombinantemente expresados en células CHO, según comparado con el nivel de expresión y

10 secreción del polipéptido gB de CMV de la técnica anterior eliminado del dominio de transmembrana. Se muestra un ensayo de Elisa cuantitativo utilizando un anticuerpo anti-gB presentando el nivel de proteína gB presente tanto en fracciones celulares (barras negras representando la forma no secretada de gB) como en sobrenadantes de cultivo (barras grises representando la forma

15 secretada de gB).

La Figura 7 muestra el nivel de expresión y de secreción de polipéptidos gB ilustrativos adicionales de acuerdo con la presente invención, los cuales fueron recombinantemente expresados en células CHO. Se muestran tres análisis de tinción Western utilizando un anticuerpo anti-gB presentando el nivel de proteína

20 gB (ubicada en la tinción entre 150 kDa y 100 kDa) presente tanto en fracciones celulares (C-Fr representando la forma no secretada de gB) como en sobrenadantes de cultivo (C-Sn, representando la forma secretada de gB) surgiendo de distintos cultivos transfectados con las construcciones de gB

indicadas. La Figura 7A - **Carriles A, B, E, F, I, J, M y N** representan la cantidad de proteína presente en las 2600 células totales. **Carriles C, D, G, H, K, L, O y P** representan la cantidad de proteína presente en las 520 células totales. **Carril MW**: escalera de Peso Molecular, **Carriles A y C**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-DeltaTM, **Carriles B y D**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-DeltaTM, **Carriles E y G**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP12, **Carriles F y H**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12, **Carriles I y K**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725, **Carriles J y L**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725, **Carriles M y O**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-Delta725 (teniendo Bucles de Fusión intactos), **Carriles N y P**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-Delta725 (teniendo Bucles de Fusión intactos). La Figura 7B, **Carriles 1, 2, 5, 6, 1', 2', 5' y 6'** representan la cantidad de proteína presente en las 2600 células totales. **Carriles 3, 4, 7, 8, 3', 4', 7' y 8'** representan la cantidad de proteína presente en las 520 células totales. **Carril MW**: escalera de Peso Molecular, **Carriles 1 y 3**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725, **Carriles 2 y 4**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725, **Carriles 5 y 7**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-Delta725 (teniendo Bucles de Fusión intactos), **Carriles 6 y 8**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-Delta725 (teniendo Bucles de Fusión intactos), **Carriles 1' y 3'**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta113, **Carriles 2' y 4'**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta113, **Carriles 5' y 7'**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-Delta113 (teniendo Bucles de Fusión intactos), **Carriles 6' y 8'**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta113 (teniendo

Bucles de Fusión intactos).

La Figura 8 muestra el nivel de expresión y secreción de polipéptidos gB ilustrativos adicionales de acuerdo con la presente invención, los cuales fueron recombinantemente expresados en células CHO. La Figura 8A muestra un análisis

5 de tinción Western utilizando un anticuerpo anti-gB presentando el nivel de proteína gB (ubicada en la tinción entre 150 kDa y 100 kDa) presente tanto en fracciones celulares (C-Fr, representando la forma no secretada de gB) como sobrenadantes de cultivo (C-Sn, representando la forma secretada de gB) surgiendo de distintos cultivos transfectados con las construcciones de gB

10 indicadas. Los carriles **a, b, c, d, i, j, k** y **l** representan la cantidad de proteína presente en 11700 células totales, mientras que los carriles **e, f, g, h, m, n, o** y **p** representan la cantidad de proteína presente en 5100 células totales. **Carril MW**: escalera de Peso Molecular, **Carriles a** y **e**: C-Sn de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725, **Carriles i** y **m**: C-Fr de un cultivo transfectado con gB-

15 SLP12-Delta725, **Carriles b** y **f**: C-Sn de un cultivo transfectado con CD33, **Carriles j** y **n**: C-Fr de un cultivo transfectado con CD33, **Carriles c** y **g**: C-Sn de un cultivo transfectado con LVL759, **Carriles k** y **o**: C-Fr de un cultivo transfectado con LVL759, **Carriles d** y **h**: C-Sn de un cultivo transfectado con LVL776, **Carriles l** y **p**: C-Fr de un cultivo transfectado con LVL776. La Figura 8B muestra un

20 análisis de Elisa cuantitativo utilizando un anticuerpo anti-gB presentando el nivel de proteína gB presente tanto en fracciones celulares (barras negras - representando la forma no secretada de gB) como en sobrenadantes de cultivo (barras grises - representando la forma secretada de gB).

La Figura 9 muestra el perfil de producto de los polipéptidos gB-DeltaTM, gB-SLP12 y gB-SLP1 -Del2, como se analizó a través de entrelazamiento inducido por glutaraldehído, después de su expresión recombinante en células CHO. Se muestra una imagen de un gel de poliacrilamida. Las flechas indican multímeros de diferentes tamaños. Se han utilizada dosis en incremento (0, 0.5, 1%) de glutaraldehído. **Carril MW:** escalera de Peso Molecular, **Carril A:** gB-DeltaTM - 0% glutaraldehído, **Carril B:** gB-DeltaTM - 0.5% glutaraldehído, **Carril C:** gB-DeltaTM - 1% glutaraldehído, **Carril D:** gB-SLP12 - 0% glutaraldehído, **Carril E:** gB-SLP12 - 0.5% glutaraldehído, **Carril F:** gB-SLP12 - 1% glutaraldehído, **Carril G:** gB-SLP1-Del2 - 0% glutaraldehído, **Carril H:** gB-SLP1-Del2 - 0.5% glutaraldehído, y **Carril I:** gB-SLP1-Del2 - 1% glutaraldehído.

La Figura 10 muestra el perfil de producto de los polipéptidos gB-DeltaTM, gB-SLP12 y gB-SLP1 -Del2, según analizado a través de ultracentrifugación analítica (AUC), después de su expresión recombinante en células CHO. Los picos representan multímeros de tamaño variable, como se indica. El porcentaje de los multímeros identificados dentro de cada población de polipéptido también se especifica, como se indica.

La Figura 11 muestra el perfil de producto o polipéptidos gB de CMV ilustrativos adicionales, como se indica y como se analiza a través de ultracentrifugación analítica (AUC), después de su expresión recombinante en células CHO. Los picos representan multímeros de tamaño variable, como se indica. El porcentaje de multímeros identificados dentro de cada población de polipéptido también se especifica, como se indica. La Figura 11A presenta el perfil

de producto del polipéptido gB-SLP12-Delta113 (indicado como gB-Delta113 en la figura) obtenido en presencia o ausencia de Pluronic. La Figura 11B presenta el perfil de producto del polipéptido gB-SLP12-Delta725 (indicado como gB-Delta725 en la figura) obtenido en presencia o ausencia de Pluronic.

5 La Figura 12 muestra un análisis de péptido a través de MS/MS trazando el extremo N-terminal de los polipéptidos indicados generados después de su expresión recombinante y secreción en células CHO y después la secuencia de señal se dividió. La Figura 12A indica la abundancia relativa de diferentes polipéptidos que tienen un aminoácido N-terminal diferente dentro de la población
10 de gB-SLP12-Delta725 recombinantemente expresada después de la secuencia de señal se dividió. La Figura 12B indica la abundancia relativa de los diferentes polipéptidos que tienen un aminoácido N-terminal diferente presente dentro de la población de gB-SLP12-Delta725-LVL759 recombinantemente expresado después de que la secuencia de señal se dividió. La Figura 12C indica la abundancia
15 relativa de los diferentes polipéptidos que tienen un aminoácido N-terminal diferente presente dentro de la población de gB-SLP12-Delta725-LVL776 recombinantemente expresado después de que la secuencia de señal se dividió. La Figura 12D indica la abundancia relativa de los diferentes polipéptidos que tienen un aminoácido N-terminal diferente presente dentro de la población de gB-SLP12-Delta725-CD33 recombinantemente expresado después de que la
20 secuencia de señal se dividió.

La Figura 13 muestra el perfil de producto de los polipéptidos gB-DeltaTM, gB-S50-DeltaTM y gB-SLP12, después de la expresión recombinante en células

CHO, según analizado mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaño basado en UV (SEC-UV). Los picos representan multímeros del tamaño indicado.

La Figura 14 muestra un análisis de tinción Western utilizando un anticuerpo anti-gB o un anticuerpo anti-His presentando el nivel de proteína gB después de que los polipéptidos indicados fueron recombinantemente expresados, secretados, purificados y desglicosilados. La Figura 14A corresponde a gB-DeltaTM y muestra una tinción Western en sonda con un anticuerpo anti-gB. La Figura 14B corresponde a gB-SLP12 y muestra una tinción Western en sonda con un anticuerpo anti-His (carril 2) y con un anticuerpo anti-gB (carril 3). La Figura 14C corresponde a gB-SLP12-Delta113 y muestra una tinción Western en sonda con un anticuerpo anti-His (carril A) y con un anticuerpo anti-gB (carril B). La Figura 14D corresponde a gB-SLP12-Delta725 y muestra una tinción Western en sonda con un anticuerpo anti-His (carril C) y con un anticuerpo anti-gB (carril D).

La Figura 15 presenta datos de inmunogenicidad. La Figura 15A muestra titulaciones de neutralización inducidas después de la administración de los polipéptidos indicados formulados para inyección. La Figura 15B muestra titulaciones de anticuerpo anti-gB de ELISA inducidas después de la administración de los polipéptidos indicados formulados para inyección.

La Figura 16 muestra las secuencias SEC ID NO: 1 a SEC ID NO: 21, como se describe más adelante.

DESCRIPCION DE LISTA DE SECUENCIA

- SEC ID NO:1 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB de longitud completa
5 de la cepa CMV AD169.
- SEC ID NO:2 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-DeltaTM de la cepa
CMV AD169.
- SEC ID NO:3 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12 de la cepa
CMV AD169.
- 10 SEC ID NO:4 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Del2 de la cepa
CMV AD169.
- SEC ID NO:5 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP1-Del2 de la cepa
CMV AD169.
- SEC ID NO:6 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12 de la
15 cepa CMV AD169.
- SEC ID NO:7 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP1 -Del2
de la cepa CMV AD169.
- SEC ID NO:8 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12-Del2
de la cepa CMV AD169.
- 20 SEC ID NO:9 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12-
Delta725 de la cepa CMV AD169.
- SEC ID NO:10 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725 de la
cepa CMV AD169.

SEC ID NO:11 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12-Delta113 de la cepa CMV AD169.

SEC ID NO:12 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta113 de la cepa CMV AD169.

- 5 SEC ID NO: 13 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12-Delta725-LVL759 (o LVL759) de la cepa CMV AD169.

SEC ID NO: 14 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725-LVL759 (LVL759) de la cepa CMV AD169.

- 10 SEC ID NO: 15 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12-Delta725-LVL776 (o LVL776) de la cepa CMV AD169.

SEC ID NO: 16 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725-LVL776 (o LVL776) de la cepa CMV AD169.

SEC ID NO:17 - Secuencia de nucleótido que codifica el polipéptido gB-SLP12-Delta725-CD33 (o CD33) de la cepa CMV AD169.

- 15 SEC ID NO: 18 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725-CD33 (o CD33) de la cepa CMV AD169.

SEC ID NO: 19 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725-LVL759 (o LVL759) de la cepa CMV AD169 en su forma madura.

- 20 SEC ID NO:20 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725-LVL776 (o LVL776) de la cepa CMV AD169 en su forma madura.

SEC ID NO:21 - secuencia de aminoácido de polipéptido gB-SLP12-Delta725-CD33 (o CD33) de la cepa CMV AD169 en su forma madura.

DESCRIPCION DETALLADA

La presente invención se refiere a un polipéptido gB de CMV novedoso, el cual presenta excelentes características de inmunogenicidad y procedimiento superior. El polipéptido gB de la invención es particularmente adecuado como un antígeno para incluirse en una composición inmunogénica, tal como vacunas. En particular, el polipéptido gB de la invención presenta un perfil de producto homogéneo mejorado. En realidad, los inventores observaron que después de la expresión, los polipéptidos gB de la técnica anterior, tal como un polipéptido gB que carece del dominio de transmembrana (gB-DeltaTM), se ensambló en multímeros de diferentes tamaños, incluyendo multímeros de alto peso molecular, haciendo a la población heterogénea. También se observó que el perfil de multímero no fue consistente, ya que la proporción de multímeros de un tamaño dado varió de un experimento a otro. Este tipo de variabilidad e inconsistencia no es aceptable en términos de formulaciones de vacuna. Por lo tanto, permanece una necesidad para un polipéptido gB de CMV, el cual presente un producto de perfil homogéneo y consistente mejorado. También, la agregación en multímeros de alto peso molecular puede tener un impacto negativo en el procedimiento subsecuente de purificación del polipéptido recombinante, ya que la agregación puede conducir, en particular, a una forma menos soluble del polipéptido. Por lo tanto, existe la necesidad de un polipéptido gB de CMV que presente características de procedimiento mejorado.

Un polipéptido gB de CMV que carece del dominio de transmembrana se

describe en EP 0 802 979.

Sorprendentemente, los inventores de la presente observaron que la introducción de mutaciones en regiones específicas de dicho polipéptido gB de CMV que carece del dominio de transmembrana da como resultado un producto

5 de perfil mejorado, de manera que la población no solo es más homogénea que el polipéptido no mutado correspondiente, sino que también exhibe un perfil que es consistente de un experimento a otro. En particular, se reducen los multímeros de alto peso molecular y la proporción de trímeros se incrementa por un factor de dos veces. Típicamente, los trímeros representan al menos 50%. Convenientemente al

10 menos 60%, y más convenientemente al menos 70% de la población de polipéptidos gB de CMV de la presente invención. Estas mutaciones no impactan el nivel de expresión, ni el nivel de secreción de los mutantes resultantes, según comparado con el polipéptido gB de CMV que carece del dominio de transmembrana. Estas mutaciones están ubicadas fuera de los epítomos

15 antigénicos de CMV gB conocidos por ser responsables de inducir una respuesta inmune. El desplazamiento observado de una población en donde los polipéptidos se ensamblaron en multímeros de alto peso molecular, tal como el polipéptido de la técnica anterior que carece del dominio de transmembrana, a una población en donde los polipéptidos tienen un perfil de trimerización mejorado y está asociado

20 con una purificación más fácil y mejor de los polipéptidos. En particular, los inventores observaron que el rendimiento de purificación de los polipéptidos de acuerdo con la invención es significativamente mayor que el desempeño de purificación obtenido con el polipéptido gB de CMV de la técnica anterior que

carece del dominio de transmembrana. La mejora de rendimiento es al menos 2 veces, y posiblemente al menos 3 a 5 veces. Además, se muestra que más mutaciones en los polipéptidos novedosos de acuerdo con la invención dan como resultado polipéptidos que son más eficientemente expresados y secretados que los polipéptidos de la técnica anterior. Dicha propiedad presenta una ventaja importante en términos de producción de antígeno para la fabricación de vacuna, un campo en donde la producción de antígeno es típicamente un factor limitante.

Los inventores también observaron que los polipéptidos gB de la técnica anterior, tal como un polipéptido gB de CMV que carece del dominio de transmembrana, presentaron heterogeneidad en los extremos N-terminal y C-terminal del polipéptido. En realidad observaron que ocurrió un recorte en el dominio citoplásmico C-terminal de gB dando como resultado al menos dos diferentes formas del polipéptido teniendo un diferente tamaño después de la expresión recombinante en células y secreción. Con el propósito de incluir una composición inmunogénica, tal como en una vacuna, se prefiere tener una población homogénea de polipéptidos gB en el sentido que se hizo de una forma principalmente individual. Los inventores encontraron que cuando se elimina al menos parte del dominio citoplásmico C-terminal, el recorte ya no ocurrió más y la población resultante de los polipéptidos principalmente se hizo de una forma individual de gB.

Similarmente, se observó que los polipéptidos gB de la técnica anterior, tal como un polipéptido gB de CMV que carece del dominio de transmembrana, presentaron heterogeneidad en la parte N-terminal del polipéptido. En realidad, los

inventores observaron que la secuencia de señal, después de expresión recombinante y secreción de los polipéptidos, se dividió a través de una peptidasa de señal en diferentes posiciones de aminoácido, generando así una población de polipéptidos gB mutantes teniendo un extremo variable en el término N, es decir, una población hecha de polipéptidos gB teniendo un aminoácido diferente en el término N. Este fenómeno también se denomina como “bamboleo” de peptidasa de señal. Para propósitos de eficacia, y en particular para consistencia, es importante, en el campo de vacuna, que un antígeno sea incluido en una vacuna que es lo más homogénea posible y lo más no degradada posible, de manera que son reproducibles y consistentes.

Se debe entender en el sentido de la presente invención que un perfil de producto homogéneo mejorado significa que la población de polipéptidos gB de CMV de la invención, después de su expresión recombinante, está hecha de al menos 50% de trímeros, por ejemplo, según medido a través de ultracentrifugación analítica (Ver Ejemplo 2, sección 1.2). Típicamente, una preparación que comprende una población de polipéptidos gB de CMV de la invención está hecha de al menos 50%, convenientemente al menos 60%, y muy convenientemente al menos 70% de trímeros. Dicho perfil de al menos 50% de trímeros también será denominado como un “perfil de trimerización mejorado” o un “perfil rico en trímero” en la presente especificación. Estos términos deben ser considerados como sinónimos e intercambiables.

Cuando se hace referencia a “homogeneidad/heterogeneidad” en la parte C-terminal de los polipéptidos, una población heterogénea significa que la

población está hecha de al menos dos polipéptidos que tienen diferentes tamaños, mientras que una población homogénea se entiende que es una población hecha principalmente de un polipéptido individual de un tamaño dado.

Cuando se hace referencia a “homogeneidad/heterogeneidad” en la parte N-terminal de los polipéptidos, una población heterogénea significa que la población está hecha de diferentes polipéptidos maduros empezando cada uno con un aminoácido diferente en el término N. De lo contrario, de acuerdo con la invención, se debe entender que una población homogénea es una población hecha principalmente de un polipéptido maduro individual, dicho polipéptido empezando invariablemente con un aminoácido dado idéntico en el extremo N-terminal. En la presente invención, un polipéptido “maduro” se refiere a un polipéptido, en donde la secuencia de señal ha sido dividida. Típicamente, en una población homogénea N-terminal en el sentido de la presente invención, mas del 30%, convenientemente al menos 80%, muy convenientemente de 80% a 90%, más convenientemente al menos 99% de los polipéptidos maduros producidos después de la escisión de la secuencia de señal empieza con el mismo aminoácido en el extremo N-terminal. Por consiguiente, en una modalidad, se proporciona una preparación que comprende una población madura de polipéptidos gB de CMV producidos después de la escisión de la secuencia de señal, en donde al menos 30%, al menos 80%, de 80% a 90% de los polipéptidos gB maduros comprenden el mismo aminoácido en el extremo N-terminal. En particular, los polipéptidos maduros de la invención convenientemente empiezan con una serina o una histidina en la posición N-terminal.

gB es una glicoproteína B envolvente que tiene numerosos papeles, uno de los cuales es la implicación en la fusión del citomegalovirus con células huésped. Se codifica a través del gen UL55 del genoma de HCMV. El tamaño de la forma nativa de gB depende del tamaño del marco de lectura abierto (ORF) que puede

5 variar un poco de acuerdo con la cepa. Por ejemplo, el ORF de la cepa AD169, el cual tiene una longitud de 2717 bp, codifica un gB de longitud completa de 906 aminoácidos, mientras que el ORF de la cepa Towne codifica un gB de longitud completa de 907 aminoácidos. Aunque la presente invención es aplicable a proteínas gB que se originan de cualquier cepa de CMV, con el fin de facilitar su

10 entendimiento, cuando se hace referencia a posiciones de aminoácido en la presente especificación, la numeración es dada con relación a la secuencia de aminoácido del polipéptido gB de SEC ID NO: 1 que se origina de la cepa AD169, a menos que se establezca otra cosa. La presente invención, sin embargo, no está limitada a la cepa AD169. Las posiciones comparables de aminoácido en un

15 polipéptido gB de cualquier otra cepa de CMV pueden ser determinadas por aquellos expertos en la técnica al alinear las secuencias de aminoácido utilizando algoritmos de alineación fácilmente aplicables y bien conocidos (tales como, BLAST). Por consiguiente, cuando se hace referencia “otros polipéptidos gB de CMV”, esto se debe entender como polipéptidos gB de CMV de cualquier cepa

20 diferente de AD169. La forma nativa de AD169 contiene, en la dirección N-terminal a C-terminal de la proteína (ver también Figura 1), (i) una secuencia de señal de aminoácido, o péptido de señal, que se sabe que está involucrada en el tráfico intracelular de polipéptido incluyendo activación del polipéptido hacia la secreción,

seguido por (ii) una región denominada la secuencia líder, (iii) un dominio extracelular conteniendo un sitio de escisión endoproteolítica de un tipo furina entre los aminoácidos 456 y 460 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, (iv) un dominio de transmembrana, y (v) un dominio citoplásmico C-terminal. Además,

5 se han identificado estiramientos de aminoácido en la secuencia de aminoácido de CMV gB como bucles de fusión putativa basados en alineación de secuencia con proteínas gB que se originan de distintos virus de herpes (Backovic et al. 2007. J. Virol. 81 (17): 9596-600), tales como HSV. Experimentalmente se determinaron bucles de fusión de HSV (Hannah, B.P. et al. 2009. J. Virol. 83(13): 6825-6836).

10 Dichos estiramientos fueron así llamados por estar involucrados en la fusión de los virus con células huésped. De acuerdo con la literatura anterior, se identificaron dos bucles de fusión putativa a través de la alineación de secuencia en CMV gB, los cuales se denominan FL1 y FL2, en el resto de la especificación. Dichos bucles de fusión están localizados en el dominio extracelular de la proteína corriente

15 arriba al dominio de transmembrana.

Sorprendentemente, los inventores de la presente observaron que la disrupción de los bucles de fusión, FL1 y FL2 de un polipéptido gB de CMV, teniendo un dominio de transmembrana no funcional, al mutar aminoácidos específicos, dio como resultado un producto, el cual, después de expresión,

20 presentó un perfil de trimerización mejorado, según comparado con un polipéptido gB de CMV, teniendo un dominio de transmembrana no funcional, pero teniendo bucles de fusión intactos. Por consiguiente, en algunas modalidades, el polipéptido gB de CMV de la invención comprende la mutación, tal como, por ejemplo,

substitución, o eliminación de aminoácido, de al menos uno de los bucles de fusión FL1 o FL2, posiblemente ambos. De forma conveniente, el polipéptido de la invención comprende al menos una substitución, o eliminación de aminoácido, en el bucle de fusión FL1. Convenientemente, el polipéptido de la invención

5 comprende al menos una substitución, o eliminación de aminoácido, en el bucle de fusión FL2. Más convenientemente, el polipéptido gB de CMV de la invención comprende una mutación de ambos bucles de fusión, FL1 y FL2, y dicho polipéptido gB de CMV mutado forma un objeto de la presente invención. Por ejemplo, el polipéptido gB de la invención comprende al menos una substitución, o

10 eliminación de aminoácido, en el bucle de fusión FL1 y al menos una substitución, o eliminación de aminoácido, en el bucle de fusión FL2.

En el sentido de la presente invención, los aminoácidos que abarcan el bucle de fusión FL1 de CMV AD169 gB, es decir la secuencia de aminoácido de FL1, se definen como ¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷ de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1.

15 Asimismo, los aminoácidos que abarcan el bucle de fusión FL2, es decir, la secuencia de aminoácido de FL2, dentro del significado de la presente invención, se definen como ²⁴⁰W.L.Y²⁴² de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1. Se pueden identificar secuencias de los bucles de fusión, FL1 y FL2, correspondientes dentro de los polipéptidos gB a partir de otras cepas de CMV,

20 por ejemplo, a través de alineación de secuencia. La disrupción de dichos bucles de fusión puede incluir cualquier tipo de mutación con relación a estos tripletes de aminoácido, ya sea a través de eliminación o mutaciones de punto, tales como substituciones de aminoácido, lo que da como resultado un producto, después de

expresión recombinante, que tiene un perfil mejorado, rico en trímero, que es el producto que tiene una mayor proporción de polipéptidos en una forma trimérica según comparado con la forma no mutada. Una mutación adecuada no limitante concerniente a FL1 es la eliminación, o sustitución, de al menos, convenientemente al menos dos, aminoácidos seleccionados de los aminoácidos ¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷ de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de diferentes cepas, como un aminoácido polar, en particular, un aminoácido polar no aromático, más particularmente, un aminoácido seleccionado del grupo de aminoácidos positivamente cargados que consisten de lisina (K), histidina (H), y arginina (R). Por consiguiente, en algunas modalidades, el polipéptido gB de CMV de la invención, en particular los polipéptidos que tienen un dominio de transmembrana no funcional, tiene un bucle de fusión mutado FL1, en donde al menos la isoleucina (I¹⁵⁶), convenientemente al menos la tirosina (Y¹⁵⁵), convenientemente al menos la tirosina (Y¹⁵⁷), está substituida con una histidina (H), o se elimina. Alternativamente, el polipéptido gB de CMV de la invención tiene un bucle de fusión mutado FL1, en donde al menos la tirosina (Y¹⁵⁷) es substituida con una arginina (R). En una modalidad particular, el polipéptido gB de CMV de la invención, en particular un polipéptido que tiene un dominio de transmembrana no funcional, tiene un bucle de fusión mutado FL1, en donde al menos la isoleucina (I¹⁵⁶) y tirosina (Y¹⁵⁵) están substituidas con histidina (H¹⁵⁶) y arginina (R¹⁵⁷), respectivamente, o eliminadas. En una modalidad más, el polipéptido gB de CMV de la invención que tiene un dominio de transmembrana no funcional tiene un

bucle de fusión mutado FL1, en donde al menos la tirosina (Y¹⁵⁵) es substituida con un glicina (G), o es eliminada, opcionalmente, en combinación con la substitución, o eliminación, de la isoleucina (I¹⁵⁶) con una histidina (H) o con la substitución, o eliminación, de la tirosina (Y¹⁵⁷) con un arginina (R), o en

5 combinación tanto con substituciones como eliminaciones. En una modalidad específica, el polipéptido gB de CMV de la invención que tiene un dominio de transmembrana no funcional tiene un bucle de fusión mutado FL1, en donde los tres aminoácidos, ¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷, de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de

10 diferentes cepas, están substituidos con aminoácidos ¹⁵⁵G.H.R¹⁵⁷, o eliminados. La mutación del dominio FL1 puede ser definida en una forma alternativa. Como se describe más adelante, la hidrofobicidad de una secuencia de aminoácido particular puede ser determinada utilizando una escala de hidrofobicidad, tal como la escala de Kyte y Dolittle (Kyte et al. 1982. J. Mol. Bio. 157: 105-132). El dominio

15 FL1, el cual abarca los aminoácidos ¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷, obtiene una clasificación de +1.9 en esa escala. En una modalidad, en el polipéptido gB de CMV de la invención, el estiramiento de los aminoácidos Y.I.Y localizados en la posición 155-157 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituido con un estiramiento de tres

20 aminoácidos que tienen una escala de hidrofobicidad de menos de -3, en particular menos de -7, más particularmente menos de -8, según medido utilizando la escala de Kyte y Dolittle. Los tres aminoácidos pueden no ser substituidos simultáneamente, siempre que la escala global del estiramiento de aminoácido

alcance los valores antes especificados. Por ejemplo, solo uno o dos aminoácidos del estiramiento largo de tres aminoácidos pueden ser substituidos, la clasificación siendo después calculada basándose en la identidad de los aminoácidos substituidos, es decir, uno o dos, más la identidad de los nativos, dos o uno, respectivamente.

Una mutación adecuada no limitante concerniente con el bucle de fusión FL2 es la eliminación, o substitución de al menos uno, convenientemente al menos dos aminoácidos seleccionados de ²⁴⁰W.L.Y²⁴² de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de diferentes cepas, con un aminoácido positivamente cargado seleccionado del grupo que consiste de lisina (K), histidina (H) y arginina (R), convenientemente una histidina (H). Por consiguiente, en algunas modalidades, el polipéptido gB de CMV de la invención tiene un bucle de fusión mutado FL2, en donde al menos la tirosina (Y²⁴²), convenientemente al menos la leucina (L²⁴¹), convenientemente al menos el triptófano (W²⁴⁰), está substituido con una histidina (H), o eliminado, opcionalmente, en combinación con un bucle de fusión mutado FL1 como se describió anteriormente. En modalidades particulares, el polipéptido gB de CMV de la invención tiene un bucle de fusión mutado FL2, en donde los tres aminoácidos ²⁴⁰W.L.Y²⁴² de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de diferentes cepas, están substituidos con los aminoácidos ²⁴⁰A.F.H²⁴², opcionalmente, en combinación con mutaciones FL1 como se describió anteriormente.

Las mutaciones con relación a los bucles de fusión FL1 y/o FL2, no están limitadas a las mutaciones anteriormente descritas. Se pueden realizar otras mutaciones, además de o no de las descritas anteriormente, tales como, por ejemplo, la mutación de los aminoácidos que rodean los tripletes anteriores
5 ¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷ y ²⁴⁰W.L.Y²⁴² de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de diferentes cepas, siempre que el polipéptido mutante resultante presente un perfil, rico en trímero, mejorado, y dichas mutaciones adicionales no interfieran con la producción (expresión y secreción), procesamiento o estabilidad del polipéptido
10 cuando se expresa recombinantemente en células huésped.

Los inventores de la presente también observaron que la combinación de la mutación de al menos un bucle de fusión (FL1 y/o FL2), tal como cualquiera de las mutaciones descritas anteriormente, con una mutación adicional en el dominio citoplásmico C-terminal del polipéptido también proporcionó un polipéptido gB de
15 CMV con un perfil de trimerización mejorado. En el sentido de la presente invención, se entiende que el dominio citoplásmico C-terminal de un polipéptido gB de CMV es el dominio ubicado corriente abajo al dominio de transmembrana (ver también Figura 1). En particular, la mutación adicional en el dominio citoplásmico C-terminal convenientemente concierne con la eliminación de una región
20 hidrofóbica, convenientemente una región rica en prolina, adecuadamente una región altamente hidrofílica, negativamente cargada, posiblemente todas éstas. Como un ejemplo no limitante, una mutación adecuada corresponde a la eliminación de los aminoácidos 825 a 877 de la secuencia establecida en SEC ID

NO: 1, la cual es denominada Del2. La delineación de la secuencia anterior que está eliminada, no está estrictamente limitada a la posición de aminoácido 825 a 877 y puede variar, siempre que el polipéptido mutante resultante presente un perfil rico en trímero, mejorado, y no se vea afectado en términos de producción, procesamiento o estabilidad cuando se expresa recombinantemente en células huésped. Por consiguiente, en algunas modalidades, el polipéptido gB de CMV de la invención comprende tanto la mutación de al menos un bucle de fusión (FL1 y/o FL2), convenientemente FL1, como la eliminación de al menos una región hidrofóbica, una región rica en prolina y una región altamente hidrofílica en el dominio citoplásmico C-terminal, en particular la eliminación de los aminoácidos 825 a 877 (Del2) de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1.

La hidrofobicidad de una secuencia de aminoácido o un fragmento del mismo es dictada por el tipo de aminoácidos que componen esta secuencia o un fragmento de la misma. Los aminoácidos son comúnmente clasificados en distintos grupos de acuerdo con sus cadenas laterales. Por ejemplo, algunas cadenas laterales se consideran no polares, es decir, hidrofóbicas, mientras otras se consideran polares. En el sentido de la presente invención, se considera que la alanina (A), glicina (G), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), prolina (P), fenilalanina (F) y triptófano (W) son parte de los aminoácidos hidrofóbicos, mientras que la serina (S), treonina (T), asparagina (N), glutamina (Q), tirosina (Y), cisteína (C), lisina (K), arginina (R), histidina (H), ácido aspártico (D) y ácido glutámico (E) se consideran parte de los aminoácidos polares. Sin considerar su hidrofobicidad, los aminoácidos también se clasifican en subgrupos basándose en

propiedades comunes compartidas por sus cadenas laterales. Por ejemplo, la fenilalanina, triptófano y tirosina están conjuntamente clasificados como aminoácidos aromáticos y serán considerados como aminoácidos aromáticos dentro del significado de la presente invención. El aspartato (D) y glutamato (E) son parte de los aminoácidos negativamente cargados o ácidos, mientras que la lisina (K), arginina (R) e histidina (H) son parte de los aminoácidos positivamente cargados o básicos, y serán considerados como tales en el sentido de la presente invención. Están disponibles escalas de hidrofobicidad que utilizan las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de cada uno de los 20 aminoácidos y distribuyen una escala hidrofóbica a cada aminoácido, creando así un rango de hidrofobicidad. Solo como un ejemplo ilustrativo, se puede citar la escala de Kyte y Dolittle previamente discutida (Kyte et al. 1982. J. Mol. Bio. 157: 105-132). Esta escala permite calcular la hidrofobicidad promedio dentro de un segmento de longitud predeterminada. Por consiguiente, las regiones hidrofóbicas en una secuencia de aminoácido pueden ser identificadas por un experto en la técnica como objetivos potenciales para la mutación de acuerdo con la presente invención. La habilidad de la mutación de dichas regiones para inducir un perfil de producto mejorado de la proteína mutante resultante, es decir favoreciendo la proporción de trímeros dentro de la población, entonces puede ser probada como se describe más adelante. La mutación de una región hidrofóbica puede consistir de una eliminación de dicha región como se indicó anteriormente, o parte de ella, o en mutaciones de punto substituyendo aminoácidos hidrofóbicos con aminoácidos polares dentro de dicha región. La relevancia de la mutación será

determinada al analizar el efecto resultante de dicha mutación en el perfil de producto del polipéptido mutado, después de la expresión recombinante en células huésped, es decir, una mutación relevante es para inducir un perfil, rico en trímero, mejorado, en donde al menos 50%, convenientemente al menos 60% y más convenientemente al menos 70% de los trímeros están presentes dentro de la población del polipéptido mutado. Los inventores observaron que el dominio citoplásmico C-terminal puede ser eliminado a un grado variable mientras se mantiene el perfil de producto mejorado, como se describió anteriormente. Por consiguiente, la presente invención contempla polipéptidos gB de CMV, en donde convenientemente 10%, más convenientemente 20%, con mayor conveniencia 80%, mucho mejor 90% de los aminoácidos del dominio citoplásmico es eliminado. Posiblemente, todo el dominio citoplásmico puede ser eliminado. En particular, los inventores observaron que cuando se elimina al menos 70%, convenientemente 80%, o más del dominio citoplásmico, los polipéptidos gB de CMV resultantes mostraron una mejor expresión y mejor nivel de secreción cuando se expresan recombinantemente en células huésped. Por consiguiente, en algunas modalidades, los polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden tanto la mutación de al menos un bucle de fusión (FL1 y/o FL2), convenientemente FL1, o posiblemente ambos, como la eliminación de todo el dominio citoplásmico, por ejemplo, los aminoácidos 776 al 906 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV.

Cualquier método que permita discriminar los constituyentes dentro de una población, tal como polipéptidos purificados posiblemente agregados entre sí, de

acuerdo con su tamaño o densidad, puede ser utilizado para verificar el perfil de producto y, de esta manera, para determinar si mutaciones dadas están confiriendo un producto de perfil mejorado como se describió anteriormente. Los métodos adecuados pueden basarse en sedimentación, tal como ultracentrifugación analítica (AUC), o en cromatografía, en particular, 5 cromatografía de exclusión de tamaño, tal como cromatografía de exclusión de tamaño basada en UV (SEC-UV). Alternativamente, un método para evaluar el nivel de agregación dentro de una muestra de proteína o polipéptido puede consistir de tratar la muestra con un agente de entrelazamiento, con el fin de 10 formar enlaces entre dos proteínas, o polipéptidos, o más. Convenientemente, se puede utilizar glutaraldehído como un entrelazador. Después del entrelazamiento, de cargar la muestra en un gel en condiciones de desnaturalización, tales como SDS-PAGE, y de teñir el gel para la presencia de proteínas, por ejemplo, con azul de Coomassie o nitrato de plata, se presentarán agregados, si hay alguno, los 15 cuales se separan de acuerdo con su peso molecular. La carga en paralelo de una escalera hecha de proteínas con un peso molecular conocido permitirá determinar el peso molecular de los diferentes agregados. Siempre que el peso molecular de la unidad mínima, tal como un polipéptido en su forma monomérica, sea conocido, entonces el peso molecular observado de los agregados será indicativo del nivel 20 de multimerización dentro de los agregados. Por ejemplo, el polipéptido gB de CMV AD169 eliminado del dominio de transmembrana tiene una longitud de 838 aminoácidos. Si se considera que el peso molecular promedio de un aminoácido es de 110 kDa, entonces el peso molecular esperado de este polipéptido es de 92

kDa. Por lo tanto, si dicho polipéptido se agrega, entonces se podría esperar que el peso molecular promedio de los multímeros resultantes sea un múltiplo de 92. En particular, si se forman trímeros, el peso molecular promedio esperado de dichos trímeros, hechos de 3 moléculas de gB eliminado del dominio de transmembrana, es de 276 kDa.

Cualquiera de las mutaciones antes descritas en los bucles de fusión FL1 y/o FL2 puede ser combinada con mutaciones adicionales. En particular, se entiende que los polipéptidos gB de CMV de acuerdo con la presente invención tienen un dominio de transmembrana no funcional y comprenden mutaciones específicas adicionales, tales como las mutaciones de bucles de fusión. La ubicación de un dominio de transmembrana dentro de un polipéptido puede predecirse a través del uso de programas de computadora para formular una escala de hidropatía a partir de la secuencia de aminoácido, utilizando las propiedades hidrofóbicas e hidrofílicas de los 20 aminoácidos (Kyte et al. 1982. J. Mol. Bio. 157: 105-132). La hidropatía promedio dentro de un segmento de longitud predeterminada de secuencia se calcula continuamente a medida que el programa se mueve a través de la secuencia. Estas clasificaciones de hidropatía consecutivas después son graficadas del término N al término C, y se imprime una línea de punto medio que corresponde a un promedio grande de hidropatía de composiciones de aminoácido encontradas en la mayoría de las proteínas secuenciadas conocidas. Las proteínas unidas a membrana exhiben regiones no interrumpidas grandes en el lado hidrofóbico de la línea que corresponde a una porción de secuencia que está embebida en la bicapa de lípido de la membrana.

Un dominio de transmembrana es responsable de anclar un polipéptido a la membrana de célula. En glicoproteínas envoltantes virales, el dominio de transmembrana típicamente contiene estiramientos de 20-27 aminoácidos no cargados, principalmente hidrofóbicos cerca de la parte C-terminal del polipéptido.

5 Como un ejemplo de la aplicación del análisis de hidropatía como se describió anteriormente, con respecto a CMV gB, puede ser la publicación de Spaete et al. (Spaete et al., 1988, Virology 167: 207-225) citada. En realidad, los autores identificaron en el polipéptido gB de CMV, a partir de las cepas AD169 y Towne, un dominio de transmembrana hidrofóbico putativo fácilmente evidente como dos

10 picos hidrofóbicos adyacentes, anchos cerca del término C del polipéptido gB. El primero comprende los aminoácidos 715 a 748 y el segundo los aminoácidos 752 a 772 (la numeración corresponde a la secuencia de aminoácido del polipéptido gB de la cepa AD169 como se muestra en SEC ID NO: 1). Una publicación de Reschke et al. (Reschke et al., 1995, J. of Gen. Virology 76: 1 13-122)

15 alternativamente identificó el segundo estiramiento de los aminoácidos 751 a 771 como el dominio de transmembrana putativo de AD169 CMV gB. Estas dos publicaciones sugieren de esta manera que el dominio de transmembrana putativo de AD169 CMV gB incluye al menos los aminoácidos 751 a 771, y posiblemente los aminoácidos 714 a 771. En el sentido de la presente invención, el dominio de

20 transmembrana del polipéptido gB de CMV abarca al menos los aminoácidos 701 a 775 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, y de esta manera la longitud de 74 aminoácidos.

Por “un dominio de transmembrana no funcional”, se debe entender dentro del significado de la presente invención que al menos parte del dominio de transmembrana putativo se altera para permitir la secreción del polipéptido resultante a partir de una célula huésped después de la expresión en dicha célula.

- 5 En una modalidad, el polipéptido gB de la invención se elimina de todo el dominio de transmembrana. En modalidades alternativas, los polipéptidos gB de CMV de la invención retienen una porción del dominio de transmembrana. En particular, los polipéptidos gB de CMV retienen al menos 5%, convenientemente al menos 10%, más convenientemente al menos 20%, con mayor conveniencia al menos 30%, o
- 10 al menos 50% de los aminoácidos del dominio de transmembrana. Por consiguiente, en algunas modalidades, al menos 50% del número de aminoácido del dominio de transmembrana se elimina de los polipéptidos gB de CMV de la invención, convenientemente al menos 70%, más convenientemente al menos 80%, con mayor conveniencia al menos 90% y más aún 95% del número de
- 15 aminoácido del dominio de transmembrana es eliminado. De acuerdo con una modalidad particular, el dominio de transmembrana del polipéptido gB de CMV de la invención se hace no funcional al eliminar los aminoácidos 701 a 775 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV. Con base en la predicción antes descrita para
- 20 determinar la ubicación de un dominio de transmembrana dentro de un polipéptido, el grado de la eliminación además puede variar, siempre que el polipéptido gB de CMV eliminado resultante sea secretado de las células huésped después de la expresión en dichas células. La alteración funcional del dominio de

transmembrana no está limitada a la eliminación de aminoácidos. La alteración puede consistir en cualquier otro tipo de mutaciones de aminoácido, tales como inserción y/o substituciones. Las eliminaciones, inserciones y substituciones de aminoácidos también puede ser combinada en cualquier forma, siempre que el

5 polipéptido gB de CMV mutado resultante sea secretado de células huésped después de la expresión en dichas células. Está dentro de las habilidades del experto en la técnica valorar el impacto de una mutación dada, tal como, por ejemplo, la eliminación de una porción dada del dominio de transmembrana, sobre la habilidad del polipéptido mutado resultante a ser secretado de las células. La

10 secreción de un polipéptido puede ser detectada y el nivel de secreción puede ser valorado a través de cualquier técnica conocida en el campo. Como un ejemplo ilustrativo no limitante, es posible medir en forma separada el contenido del polipéptido expresado que es retenido dentro de las células y el cual es secretado en el sobrenadante de cultivo de célula o medio de cultivo de célula después de

15 expresión. Típicamente, después de la expresión, el sobrenadante de cultivo de célula se recolectó antes de que las células se lisaran de acuerdo con cualquier método común de lisis, proporcionando de esta manera dos fracciones, una celular y una sobrenadante. El contenido del polipéptido entonces puede ser medido en cada fracción a través de cualquier técnica de detección de proteína

20 conocida en el campo. Por ejemplo, el polipéptido puede ser detectado a través de tinción Western o a través de un análisis de ELISA.

Por “que comprende al menos una porción del dominio extracelular”, se debe entender en el sentido de presente invención como al menos la parte del

dominio extracelular que comprende o abarca los bucles de fusión FL1 y FL2. El número de aminoácidos adicionales fuera de los bucles de fusión en el dominio extracelular puede variar. El número apropiado de aminoácidos, o el porcentaje de aminoácidos del dominio extracelular presentado en los polipéptidos de la invención debe ser tal que los polipéptidos resultantes comprenden los epítopos antigénicos y presentan un perfil mejorado de trimerización. Convenientemente, al menos un 50%, más convenientemente al menos 70%, con mayor conveniencia al menos 80% y aún más 90% de los aminoácidos del dominio extracelular es retenido en los polipéptidos de la invención, dicho porcentaje necesariamente abarca los bucles de fusión FL1 y FL2. En una modalidad, el polipéptido gB de CMV de la invención retiene todo el dominio extracelular, dicho dominio comprende al menos una mutación en uno de los dos bucles de fusión FL1 y FL2, posiblemente ambos.

Por retención de “al menos una porción del dominio citoplásmico” significa el número de aminoácidos necesarios para la expresión y secreción. Convenientemente, los polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden al menos 5%, convenientemente al menos 10%, y puede ser 20%, o más, de los aminoácidos del dominio citoplásmico. Por consiguiente, en algunas modalidades al menos 80%, al menos 90%, o al menos 95% de los aminoácidos del dominio citoplásmico en los polipéptidos gB de CMV de la invención es eliminado. En una modalidad más, los polipéptidos gB de CMV de la invención son eliminados de todo el dominio citoplásmico.

Las mutaciones del dominio de transmembrana, tales como, por ejemplo,

eliminaciones de al menos parte del mismo, pueden ser combinadas con mutaciones del dominio citoplásmico, tal como, por ejemplo, eliminaciones de al menos parte del mismo. Cualquier combinación se contempla en la presente invención, siempre que el polipéptido gB de CMV mutado resultante sea secretado

5 de células huésped después de la expresión en dichas células, como se describió anteriormente y presente un perfil mejorado de trimerización. Por consiguiente, en modalidades particulares, los polipéptidos gB de CMV de la invención se eliminan tanto de todo el dominio de transmembrana como de todo el dominio citoplásmico. En modalidades alternativas, los polipéptidos gB de CMV de la invención son

10 eliminados de todo el dominio de transmembrana y retienen al menos parte del dominio citoplásmico, tal como, por ejemplo, 10% de mismo. En modalidades alternativas adicionales, los polipéptidos gB de CMV de la invención son eliminados de todo el dominio citoplásmico y retiene al menos 30% del dominio de transmembrana.

15 Sorprendentemente, los inventores observaron que al combinar mutaciones de los bucles de fusión FL1 y/o FL2 con la detección de al menos parte del dominio citoplásmico, posiblemente la eliminación de todo esto, y la eliminación de al menos parte del dominio de transmembrana, posiblemente la eliminación de todo esto, proporcionó polipéptidos siendo más eficientemente expresados y

20 secretados que los polipéptidos de la técnica anterior.

También, los inventores observaron que la secuencia de señal de los polipéptidos de CMV de la técnica anterior, después de expresión recombinante y secreción de los polipéptidos, fue dividida a través de peptidasa de señal en

diferentes posiciones de aminoácido, generando así una población de polipéptidos gB maduros teniendo un extremo variable en el término N, es decir, una población hecha de polipéptidos gB teniendo un aminoácido diferente en el término N. Sorprendentemente, observaron que la introducción de mutaciones en la

5 secuencia líder del polipéptido gB dio como resultado la división de la secuencia de señal principalmente en un sitio, generando así una población homogénea de polipéptidos gB maduros teniendo el mismo aminoácido en el término N. Por consiguiente, en una modalidad, se proporciona una preparación que comprende una población de polipéptidos gB de CMV maduros producidos después de la

10 escisión de la secuencia de señal, en donde al menos 30%, al menos 80%, de 80% a 90% de los polipéptidos gB maduros comprende el mismo aminoácido en el término N. En particular, los polipéptidos maduros de la invención convenientemente empiezan con una serina o una histidina en la posición N-terminal. Es un objeto de la invención proporcionar un polipéptido gB de CMV que

15 comprenda una eliminación de al menos 40%, convenientemente al menos 50%, más convenientemente al menos 70%, con mayor conveniencia al menos 80% o aún más al menos 90% de los aminoácidos de la secuencia líder. En una modalidad, se proporciona un polipéptido gB de CMV que comprende la eliminación de toda la secuencia líder. Los inventores también observaron que la

20 eliminación anterior de la secuencia líder puede ser combinada con mutaciones que ocurren en la secuencia de señal, tal como al menos una substitución de aminoácido, convenientemente la parte C-terminal del péptido de señal. Alternativamente, dicha secuencia de señal puede comprender al menos una

inserción de aminoácido, adecuadamente en la parte C-terminal del péptido de señal. El grado de la eliminación de la secuencia líder, así como el tipo de mutaciones en la secuencia de señal, puede variar siempre que el polipéptido gB resultante, después de la expresión recombinante y secreción, sea dividido por

5 una peptidasa de señal en un sitio principal, generando así una población de polipéptidos gB maduros teniendo el mismo aminoácido en el término N. La identidad del aminoácido N-terminal dentro de una población de polipéptidos puede ser determinada a través de cualquiera de las técnicas de secuenciación conocidas en el campo. Alternativamente, las diferentes formas de polipéptidos

10 dentro de una población de polipéptidos pueden ser sometidas a una digestión triptica, y los diferentes péptidos generados pueden ser analizados a través de espectroscopia de masas, tal como MS/MS. La comparación con péptidos estándares de secuencias conocidas permitirá determinar la composición de aminoácido de los péptidos digeridos.

15 Los inventores observaron que la eliminación anterior de la secuencia líder y/o la mutación de la secuencia de señal puede ser combinada con cualquiera de las mutaciones descritas anteriormente con relación a los dominios de Bucles de Fusión FL1 y/o FL2 y/o a la eliminación de al menos una porción del dominio TM y/o a la detección de al menos una porción del dominio citoplásmico, mientras,

20 mientras sigue manteniendo las propiedades conferidas por cada tipo de mutación, tales como un perfil mejorado de trimerización, una mejor expresión y secreción, la ausencia de la sujeción C-terminal, y la homogeneidad en el término N después de la escisión de la secuencia de señal, según comparado con los

polipéptidos gB de CMV de la técnica anterior, tales como gB-DeltaTM. Por consiguiente, en algunas modalidades, los polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden mutaciones en la secuencia líder opcionalmente combinadas con mutaciones en la secuencia de señal, cualquiera de las mutaciones de dominio FL1 y/o FL2 previamente descritas, y cualquiera de las mutaciones en el dominio citoplásmico y en el dominio TM ahí descrito.

Los polipéptidos gB de CMV de la invención no son de “existencia natural” en el sentido de que no están presentes en el mismo estado como en la naturaleza, es decir, su secuencia ha sido modificada artificialmente. Los términos “polipéptido” o “proteína” se refieren a un polímero en donde los monómeros son aminoácidos que están unidos conjuntamente a través de enlaces amida. Los términos “polipéptido” o “proteína”, como se utiliza aquí, pretenden abarcar cualquier secuencia de aminoácido e incluyen secuencias modificadas tales como glicoproteínas. El término “polipéptido” específicamente pretende cubrir tanto proteínas de existencia natural como proteínas de existencia no natural, las cuales son recombinante o sintéticamente producidas. El término “fragmento”, con referencia a un polipéptido, se refiere a una porción (es decir, una sub-secuencia) de un polipéptido. El término “fragmento inmunogénico” se refiere a todos los fragmentos de un polipéptido que retienen al menos un epítipo inmunogénico predominante de la proteína o polipéptido de referencia de longitud completa. La orientación dentro de un polipéptido generalmente es dictada en una dirección N-terminal o C-terminal, definida por la orientación de las porciones amino y carboxi de aminoácidos individuales. Los polipéptidos son traducidos de la terminal N o

término amino hacia la terminal C o término carboxi.

También es posible utilizar en la presente invención una polipéptido gB como se describió anteriormente realizando más mutaciones, tales como, por ejemplo, mutaciones en sitios endoproteolíticos de manera que dichos sitios se hacen ineficaces. Por ejemplo, el sitio de escisión de furina ubicado alrededor de los aminoácidos 456 a 460 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de diferentes cepas, puede ser mutado. Convenientemente, al menos se realiza una de las substituciones de aminoácido a partir del grupo que consiste de: R⁴⁵⁶ substituido con T⁴⁵⁶, R⁴⁵⁸ substituido con Q⁴⁵⁸, y R⁴⁵⁹ substituido con T⁴⁵⁹, con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, Por consiguiente, en ciertas modalidades, los polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden mutaciones de punto adicionales, en donde la arginina R⁴⁵⁶, R⁴⁵⁸ y R⁴⁵⁹ de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV que se originan de diferentes cepas, está substituida con una treonina (T⁴⁵⁶), un ácido glutámico (Q⁴⁵⁸) y una treonina (T⁴⁵⁹), respectivamente. En algunas otras modalidades, la arginina en la posición 50 y 357 de la secuencia como se establece en SEC ID NO: 1 fue substituida con una serina. En otras modalidades más, los polipéptidos gB de la invención, en particular, los que comprenden una eliminación de una región hidrofóbica en el dominio citoplásmico C-terminal, comprenden una mutación de punto adicional, en donde la cisteína en la posición 778 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1 está substituida con una alanina.

Opcionalmente, para facilitar la expresión y recuperación, el polipéptido gB de la presente invención puede incluir un péptido de señal en el término N. un péptido de señal puede ser seleccionado de entre numerosos péptidos de señal conocidos en la técnica, y típicamente se selecciona para facilitar la producción y procesamiento en un sistema seleccionado para la expresión recombinante del polipéptido gB de la presente invención. En ciertas modalidades, el péptido de señal es el naturalmente presente en la proteína gB nativa de la cepa AD169, es decir, aminoácidos 1-20 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1. Alternativamente, el péptido de señal puede ser una secuencia heteróloga ya que la secuencia surge de una proteína distinta de gB. Los péptidos de señal ilustrativos adecuados para usarse en el contexto de los polipéptidos gB de CMV de la invención incluyen péptidos de señal del activador de plasminógeno de tejido (tPA), proteína gD de Virus de Herpes Simple (HSV), endostatina humana, HIV gp120, CD33, Her2Neu humana, o gp350 de virus de Epstein Barr (EBV). Un “péptido de señal” es una secuencia corta de aminoácido (por ejemplo, una longitud de aproximadamente 18-25 aminoácidos) que dirige proteínas de secreción o de membrana recientemente sintetizada a y a raves de membranas, por ejemplo, del retículo endoplásmico. Los péptidos de señal están frecuentemente, pero no universalmente, localizados en el término N de un polipéptido, y con frecuencia se divididos por peptidasas de señal después de que la proteína ha cruzado la membrana. Esta escisión comúnmente es considerada como un paso en el procedimiento de “maduración” de proteína. En particular, una vez que el péptido de señal es dividido, la proteína se denomina como en su forma

“madura”. Las secuencias de señal típicamente contienen tres características estructurales comunes: una región básica polar N-terminal (región n), un núcleo hidrofóbico, y una región c hidrofílica). De acuerdo con una modalidad, el polipéptido gB de la invención comprende el péptido de señal naturalmente presente en el gB nativo. En una modalidad alternativa, el polipéptido gB de la invención comprende un péptido de señal heterólogo, tal como el péptido de señal de la proteína CD33. Las secuencias de señal pueden ser no nativas y pueden comprender mutaciones, tales como sustituciones, inserciones, o eliminaciones de aminoácidos. Por consiguiente, en algunas modalidades, en donde los polipéptidos gB de la invención comprenden un péptido de señal, en particular, el péptido de señal nativo, dicho péptido de señal comprende al menos una sustitución de aminoácido, convenientemente en la parte C-terminal del péptido de señal. Alternativamente, dicho péptido de señal comprende al menos una inserción de aminoácido, convenientemente en la parte C-terminal del péptido de señal.

Opcionalmente, los polipéptidos gB de CMV de la invención, como se describe ahí, pueden incluir la adición de una secuencia de aminoácido que constituye una etiqueta, la cual facilita el procesamiento o purificación subsecuente de un polipéptido recombinantemente expresado. Dicha etiqueta puede ser una etiqueta antigénica o de epítipo, una etiqueta enzimática o una etiqueta de polihistidina. Típicamente, la etiqueta está situada en uno o el otro extremo del polipéptido, tal como en el término C o término N del polipéptido. Por consiguiente, en algunas modalidades, los polipéptidos gB de CMV de la invención

comprenden una etiqueta de polihistidina en el término C de los polipéptidos.

En ciertas modalidades, el polipéptido gB de CMV de la invención tiene una secuencia de aminoácido seleccionada de: SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 16 y SEC ID NO: 18, o una sub-secuencia de la misma (por ejemplo, una sub-secuencia que carece de la secuencia de señal de aminoácidos, o que tiene una substitución de una secuencia de señal diferente). Alternativamente, en distintas modalidades, el polipéptido gB de CMV de la invención tiene una secuencia de aminoácido seleccionada de: SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20, SEC ID NO: 21.

Otro aspecto de esta descripción se refiere a ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos gB de CMV de la presente invención. Las células en las cuales dichos ácidos nucleicos o vectores son introducidos (es decir, células huésped) también son parte de la invención. Las células huésped pueden ser células bacterianas, pero más comúnmente serán células eucarióticas, tales como células de levadura (por ejemplo, *Pichia*), células vegetales, células de insecto, o células de mamífero (por ejemplo, células CHO). De acuerdo con una modalidad, los polipéptidos gB de CMV de la invención son recombinantemente expresados en células CHO.

Los términos “polinucleótido” y “secuencia de ácido nucleico” se refieren a una forma polimérica de nucleótidos con una longitud de al menos 10 bases. Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxiribonucleótidos, o formas modificadas de cualquier nucleótido. El término incluye formas individuales y dobles de ADN. Por “polinucleótido aislado” se refiere a un polinucleótido que no

está inmediatamente continuo con ambas de las secuencias de codificación con las cuales está inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma de existencia natural del organismo a partir del cual se deriva. En una modalidad, un polinucleótido codifica un polipéptido. La dirección de 5' y 3' de un ácido nucleico se define haciendo referencia a la conectividad de unidades de nucleótido individuales, y se designa de acuerdo con las posiciones de carbón del anillo de azúcar desoxiribosa (o ribosa). El contenido de información (codificación) de una secuencia de polinucleótido se lee en una dirección 5' a 3'.

Un ácido nucleico “recombinante” es uno que tiene una secuencia que no es de existencia natural o tiene una secuencia que se hace a través de una combinación artificial de dos segmentos, de otra manera separados, de secuencia. Esta combinación artificial puede lograrse a través de síntesis química o, más comúnmente, a través de la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, a través de técnicas de ingeniería genética. Una proteína “recombinante” es una que es codificada por un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, recombinante), el cual ha sido introducido en una célula huésped, tal como una célula bacteriana o eucariótica. El ácido nucleico puede ser introducido, en un vector de expresión que tiene señales capaces de expresar la proteína codificada por el ácido nucleico introducido o el ácido nucleico puede ser integrado en el cromosoma de la célula huésped.

En ciertas modalidades, los ácidos nucleicos recombinantes son codón optimizado para la expresión en una célula huésped procariótica o eucariótica seleccionada, tal como una célula de mamífero, vegetal o de insecto. Para facilitar

la replicación y expresión, los ácidos nucleicos pueden ser incorporados en un vector, tal como un vector de expresión procariótico o eucariótico. Aunque los ácidos nucleicos aquí descritos pueden ser incluidos en cualquiera de una variedad de vectores (incluyendo, por ejemplo, plásmidos bacterianos; ADN de fago; baculovirus; plásmidos de levadura; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN viral tal como vacuna, adenovirus, virus de viruela aviar, pseudorrabia, adenovirus, virus adeno-asociado, retrovirus y muchos otros), más comúnmente el vector será un vector de expresión adecuado para generar productos de expresión de polipéptido. En un vector de expresión, el ácido nucleico que codifica el polipéptido gB de CMV es típicamente dispuesto cerca y en orientación hacia una secuencia de control de transcripción apropiada (promotor, y opcionalmente, uno o más mejoradores) para dirigir la síntesis de ARNm. Es decir, la secuencia de polinucleótido de interés está operablemente enlazada a una secuencia de control de transcripción apropiada. Ejemplos de dichos promotores incluyen: el promotor temprano inmediato de CMV, LTR o promotor SV40, promotor de poliedro de baculovirus, promotor lac o trp de *E. coli*, fago T7 y promotor lambda P_L, y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión típicamente también contiene un sitio de unión de ribosoma para el inicio de traducción, y un terminador de transcripción. El vector opcionalmente incluye secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión opcionalmente comprenden uno o más genes marcadores para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células huésped

transformadas, tales como dihidrofolato reductasa, resistencia a neomicina o resistencia de canamicina para el cultivo de célula eucariótica, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

El vector de expresión también puede incluir elementos de expresión
5 adicionales, por ejemplo, para mejorar la eficiencia de la traducción. Estas señales pueden incluir un codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes. En algunos casos, por ejemplo, se insertan un codón de iniciación de traducción y elementos de secuencia asociados en el vector de expresión apropiado simultáneamente con la secuencia de polipéptido de interés (por ejemplo, un codón de inicio nativo). En
10 dichos casos, no se requieren señales de control de traducción adicionales. Sin embargo, en casos en donde solo una secuencia de codificación de polipéptido, o una porción de la misma, sea insertada, se proporcionan señales de control de traducción exógena, incluyendo un codón de iniciación ATG para la expresión de la secuencia gB de CMV. El codón de iniciación se coloca en el marco de lectura
15 correcto para asegurar la traducción de la secuencia de polipéptido de interés. Los elementos de transcripción exógena y los codones de iniciación pueden ser de varios orígenes, tanto natural como sintético. Si se desea, la eficiencia de la expresión además puede ser incrementada a través de la inclusión de mejoradores apropiados al sistema celular en uso (Scharf et al. (1994) Results
20 Probl Cell Differ 20:125-62; Bitter et al. (1987) Methods in Enzymol 153:516-544).

Los procedimientos ilustrativos suficientes para guiar a un experto en la técnica a través de la producción de ácidos nucleicos gB de CMV recombinantes se pueden encontrar en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,

2° ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3° ed., Cold Spring Harbor Press, 2001; Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, 1992 (y Suplementos del 2003); y Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 4° ed.,
5 Wiley & Sons, 1999.

Los ácidos nucleicos ilustrativos que codifican los polipéptido gB de CMV de la invención están representados por SEC ID NOs: 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15 y 17. Expertos en la técnica pueden producir variantes de secuencia adicionales que
10 comparte identidad de secuencia con las variantes ilustrativas. Típicamente, las variantes de ácido nucleico codificarán polipéptidos que difieren por no más de 1%, o 2%, o 5%, o 10%, o 15%, o 20% del nucleótido o aminoácidos. Es decir, los polipéptidos codificados comparten al menos 80%, u 85%, más comúnmente, al menos alrededor de 90% o más, tal como 95%, o aún 98% o 99% de identidad de
15 secuencia. Se entenderá inmediatamente por aquellos expertos en la técnica, que las secuencias de polinucleótido que codifican los polipéptidos gB de CMV, pueden por si mismas compartir menos identidad de secuencia debido a la redundancia del código genético.

Se entenderá por aquellos expertos en la técnica que la similitud entre los
20 polipéptidos gB de CMV y las secuencias de polinucleótido, como para las secuencias de polipéptido y nucleótido en general, puede ser expresada en términos de similitud entre las secuencias, de otra forma denominada como identidad de secuencia. La identidad de secuencia frecuentemente es medida en

términos de porcentaje de identidad (o similitud); entre más alto es el porcentaje, más similares son las estructuras primarias de las dos secuencias. En general, entre más similares sean las estructuras primarias de dos secuencias de aminoácido (o polinucleótido), más similares son las estructuras de orden superior

5 que resultan del pliegue y ensamble. Las variantes de polipéptidos gB de CMV y secuencias de polipéptido pueden tener una o un número pequeño de eliminaciones, adiciones o substituciones de aminoácido pero, sin embargo, compartirán un porcentaje muy alto de su aminoácido, y en general su secuencia de polinucleótido. En la técnica son bien conocidos métodos para determinar la

10 identidad de secuencia. Varios programas y algoritmos de alineación se describen en: Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970; Higgins y Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins y Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988; y Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988. Altschul et al.,

15 Nature Genet. 6:1 19, 1994, presentan una consideración detallada de métodos de alineación de secuencia y cálculos de homología. The NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990) está disponible de varias fuentes, incluyendo el National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para usarse junto con los programas de

20 análisis de secuencia blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx. Una descripción de cómo determinar la identidad de secuencia utilizando este programa está disponible en el sitio web de NCBI en Internet.

Otro indicio de similitud de secuencia entre dos ácidos nucleicos es la

habilidad de hibridizar. Entre las similares sean las secuencias de los dos ácidos nucleicos, más severas serán las condiciones a las cuales se hibridiza. La severidad de las condiciones de hibridación es dependiente de secuencia y son diferentes bajo diferentes parámetros ambientales. De esta manera, las

5 condiciones de hibridación que dan como resultado grados particulares de severidad variarán dependiendo de la naturaleza del método de hibridación de elección y la composición y longitud de la hibridación de las secuencias de ácido nucleico. Generalmente, la temperatura de hibridación y la resistencia iónica (especialmente la concentración de Na^+ y/o Mg^+) del regulador de pH de

10 hibridación determinarán la severidad de la hibridación, aunque los tiempos de lavado también tienen influencia sobre la severidad. En general, las condiciones severas se seleccionan para ser de aproximadamente 5°C a 20°C más bajas que el punto de fusión término (T_m) para la secuencia específica a una resistencia iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo resistencia iónica y pH

15 definidos) a la cual el 50% de la secuencia objetivo hibridiza a una sonda perfectamente coincidente. Las condiciones para la hibridación de ácido nucleico y el cálculo de severidades se pueden encontrar en, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001; Tijssen, Hybridization With Nucleic Acid Probes,

20 Part I: Theory and Nucleic Acid Preparation, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Ltd., NY, NY, 1993, y Ausubel et al. Short Protocols en Molecular Biology, 4^o ed., John Wiley & Sons, Inc., 1999.

Para los propósitos de la presente descripción, “condiciones severas” abarcan condiciones bajo las cuales la hibridación solo ocurrirá si existe menos de un 25% de desigualdad entre la molécula de hibridación y la secuencia objetivo. Las “Condiciones severas” pueden ser divididas en niveles particulares de severidad para una definición más precisa. De esta manera, como se utiliza aquí, las condiciones de “severidad moderada” son aquellas bajo las cuales las moléculas con más de un 25% de desigualdad no se hibridarán; las condiciones de “severidad media” son aquellas bajo las cuales las moléculas con más de 15% de desigualdad no se hibridarán, y las condiciones de “severidad alta” son aquellas bajo las cuales las secuencias con más de 10% de desigualdad no hibridarán. Las condiciones de “severidad muy alta” son aquellas bajo las cuales las secuencias con más de 6% de desigualdad no hibridarán. En contraste, los ácidos nucleicos que hibridizan bajo condiciones de “severidad baja” incluyen aquellos con una identidad de secuencia mucho menor, o con una identidad de secuencia solo sobre sub-secuencias cortas del ácido nucleico. Por lo tanto, se entenderá que las varias variantes de ácidos nucleicos que están abarcadas por esta descripción son capaces de hibridizar a al menos una de SEC ID NOs: 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15 y 17, sobre substancialmente toda su longitud.

Los polipéptidos gB de CMV aquí descritos se producen utilizando procedimiento bien establecidos para la expresión y purificación de proteínas recombinantes. Los procedimientos suficientes para guiar a un experto en la técnica se pueden encontrar en, por ejemplo, las referencias de Sambrook y Ausubel antes citadas. Más adelante se proporcionan detalles adicionales y

específicos. Se introducen en células huésped, ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos gB de CMV, tales como (pero no limitado a) los ácidos nucleicos ilustrativos representados por SEC ID NOs: 6, 7, 8, 9, 11, 13, 15 y 17, a través de cualquiera de una variedad de procedimientos bien conocidos, tal es como electroporación, transfección mediada por liposoma, precipitación de fosfato de calcio, infección, transfección y similares, dependiendo de la selección de vectores y células huésped. Las células huésped que incluyen ácidos nucleicos que codifican al polipéptido gB de CMV recombinante, de esta forma, también son una característica de esta descripción. Las células huésped favorables incluyen células huésped procarióticas (es decir, bacterianas), tales como *E. coli*, así como numerosas células huésped eucarióticas, incluyendo células fúngicas (por ejemplo, levadura, tales como *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*), células de insecto, células vegetales, y células de mamífero (tales como células CHO). Los ácidos nucleicos de CMV gB recombinantes se introducen (por ejemplo, transducidos, transformados o transfectados) en células huésped, por ejemplo, a través de un vector, tal como un vector de expresión. Como se describió anteriormente, el vector muy típicamente es un plásmido, pero dichos vectores también pueden ser, por ejemplo, una particular viral, un fago, etc. ejemplos de huéspedes de expresión adecuados incluyen: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Neurospora crassa*; células de insecto, tales como *Drosophila* y *Spodoptera frugiperda*; células de mamífero, tales como 3T3, COS, CHO, BHK, HEK 293 o melanoma de Bowes,

incluyendo células de algas, etc.

Las células huésped pueden ser cultivadas en medios convencionales de nutriente modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, o amplificar las secuencias de polinucleótido insertadas. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son típicamente aquellas previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para aquellos expertos en la técnica y en las referencias aquí citadas, incluyendo, por ejemplo, Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, tercera edición, Wiley- Liss, New York y las referencias ahí citadas. Los productos de expresión que corresponden a los ácidos nucleicos de la invención también pueden ser producidos en células que no son de animal, tales como, plantas, levadura, hongos, bacterias, y similares. Además de Sambrook, Berger y Ausubel, detalles con respecto al cultivo de célula pueden encontrarse en Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlín Heidelberg New York) y Atlas and Parks (eds) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FL. En sistemas bacterianos, se puede seleccionar un número de vectores de expresión dependiendo del uso pretendido para el producto expresado. Por ejemplo, cuando, para la producción de anticuerpos, se necesitan grandes cantidades de un polipéptido o fragmentos del mismo, favorablemente se emplean vectores que dirigen una expresión de alto nivel de proteínas que son rápidamente purificadas.

Dichos vectores incluyen, pero no se limitan a, clonación multifuncional de *E. coli* y vectores de expresión tales como BLUESCRIPT (Stratagene), en donde la secuencia de codificación de interés, por ejemplo, un polipéptido de la invención como se describió anteriormente, puede ser ligada en el vector enmarco con 5 secuencias para la traducción amino-terminal que inicia metionina y los 7 residuos subsecuentes de beta-galactosidasa que produce una proteína de fusión de beta-galactosidasa catalíticamente activa; vectores pIN (Van Heeke & Schuster (1989) J Biol Chem 264:5503-5509); vectores pET (Novagen, Madison WI), en donde la metionina amino-terminal está ligada en marco con una etiqueta de histidina; y 10 similares. Similarmente, en levadura, tal como *Saccharomyces cerevisiae*, se puede utilizar un número de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles, tales como, factor alfa, oxidasa alcohólica y PGH, para la producción de los productos de expresión deseados. Para revisiones, ver Berger, Ausubel, y, por ejemplo, Grant et al. (1987; Methods in Enzymology 153:516-544). En células 15 huésped de mamífero, se puede utilizar un número de sistemas de expresión, incluyendo tanto plásmidos como sistemas de base viral.

Una célula huésped opcionalmente se selecciona por su habilidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar la proteína expresada en la forma deseada. Dichas modificaciones de la proteína incluyen, 20 pero no se limitan a, glicosilación, (así como, por ejemplo, acetilación, carboxilación, fosforilación, lipidación y acilación). El procesamiento de post-traducción, por ejemplo, el cual divide una forma de precursor en una forma madura de la proteína (por ejemplo, a través de furina proteasa) es opcionalmente

realizado en el contexto de la célula huésped. Diferentes células huésped, tales como, 3T3, COS, CHO, HeLa, BHK, MDCK, 293, WI38, etc., tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para dichas actividades de pos-traducción y se pueden seleccionar para asegurar la modificación correcta y procesamiento de la proteína extraña, introducida. Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo del polipéptido gB de CMV recombinante codificado por los ácidos nucleicos aquí descritos, se utilizan típicamente sistemas de expresión estable. Por ejemplo, las líneas de célula que establemente expresan un polipéptido gB de CMV de la invención se obtienen al introducir los vectores de expresión de célula huésped que contienen orígenes virales de replicación o elementos de expresión endógena y un gen marcador seleccionable. Después de la introducción del vector, las células se dejan desarrollar durante 1-2 días en un medio enriquecido antes de que sean conmutadas a medios selectivos. El propósito del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección, y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que exitosamente expresan las secuencias introducidas. Por ejemplo, se pueden hacer proliferar grupos o colonias resistentes de células establemente transformadas utilizando técnicas de cultivo de tejido apropiadas para el tipo de célula. Las células huésped transformadas con un ácido nucleico que codifica un polipéptido gB de CMV son opcionalmente cultivadas bajo condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de la proteína codificada a partir del cultivo de célula.

Después de la transducción de una línea de célula huésped adecuada y del

desarrollo de las células huésped a una densidad apropiada de célula, el promotor seleccionado es inducido a través de medios apropiados (por ejemplo, desplazamiento de temperatura o inducción química) y las células se cultivaron durante un período adicional, el producto de polipéptido secretado después es recuperado del medio de cultivo y se purifica. Alternativamente, las células pueden ser cosechadas a través de centrifugación, separación a través de medios físicos o químicos, y el extracto crudo resultante es retenido para purificación adicional. Las células eucarióticas o microbianas empleadas en la expresión de proteínas pueden ser separadas a través de cualquier método convencional, incluyendo ciclización de congelación-descongelación, aplicación de sonido, disrupción mecánica, o el uso de polipéptidos gB de CMV de célula, pueden ser recuperadas y purificadas de cultivos de célula recombinante a través de cualquiera de un número de métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo sulfato de amonio o precipitación de etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio de anión o catión, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad (por ejemplo, utilizando cualquiera de los sistemas de etiquetado vistos aquí), cromatografía de hidroxapatita, y cromatografía de lectina. Se pueden utilizar pasos de replegado de proteína, según se desee, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear cromatografía de líquido de alto rendimiento (HPLC) en los pasos de purificación finales. Además de las referencias observadas anteriormente, una variedad de métodos de purificación son bien conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, aquellos establecidos por

- Sandana (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; y Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2^o Edición Wiley-Liss, NY; Walker (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, U.K.;
- 5 Scopes (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3^o Edición Springer Verlag, NY; Janson and Ryden (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Segunda Edición Wiley-VCH, NY; y Walker (1998) Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJ.

En un ejemplo, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos gB de CMV

10 son clonados en un vector adecuado para la introducción en células de mamífero (por ejemplo, células CHO). En esta modalidad ilustrativa, la secuencia de polinucleótido que codifica el polipéptido gB de CMV es introducido en el vector pMax desarrollado por Amaxa. El polipéptido es expresado bajo un promotor constitutivo, el promotor de CMV temprano inmediato. La selección de las células

15 establemente transfectadas que expresan la quimera se hace con base en la habilidad de las células transfectadas para crecer en presencia de canamicina. Las células que se han integrado exitosamente a pMax son capaces de crecer en presencia de canamicina, ya que el vector pMax expresa un gen de resistencia a canamicina. Las células seleccionadas pueden ser clonalmente expandidas y

20 caracterizadas para la expresión de los polipéptidos gB de CMV. Alternativamente, las secuencias de polinucleótido que codifican los polipéptidos gB de CMV de la invención pueden ser introducidas en el vector pTT5 desarrollado por NRC, el cual expresa un gen de resistencia a ampicilina.

Después de la transfección e inducción de expresión (de acuerdo con el promotor seleccionado y/o mejoradores u otros elementos reguladores), los polipéptidos de expresión son recuperados (por ejemplo, purificados o enriquecidos). Lo siguiente es un procedimiento ilustrativo para purificar los polipéptido gB de CMV. Para facilitar la purificación, los polipéptido gB de CMV incluyen una etiqueta de polihistidina C-terminal. En resumen, el sobrenadante de cultivo de célula se recolectó 6 días después de la transfección. Después de la clarificación, los sobrenadantes se cargaron a columnas de níquel.

El término “purificación” se refiere al procedimiento de remover componentes de una composición, la presencia de los cuales no es necesaria. La purificación es un término relativo, y no requiera que todas las huellas del componente indeseable sean removidas de la composición. En el contexto de producción de vacuna, la purificación incluye procedimientos tales como centrifugación, diálisis, cromatografía de intercambio de ion, y cromatografía de exclusión de tamaño, purificación de afinidad o precipitación. De esta forma, el término “purificado(a)” no requiere de pureza absoluta; más bien, se considera como un término relativo. Una preparación de ácido nucleico o proteína substancialmente pura puede ser purificada de manera que el ácido nucleico deseado, o proteína, representa al menos un 50% del contenido total de ácido nucleico de la preparación. En ciertas modalidades, un ácido nucleico substancialmente puro, o proteína, representará al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o al menos 95% o más del total de ácido nucleico o contenido de proteína de la preparación.

En el sentido de la presente invención, un componente biológico “aislado” (tal como una molécula de ácido nucleico, o proteína) ha sido substancialmente separado o purificado de otros componentes biológicos en la célula del organismo en donde el componente ocurre naturalmente, tal como, otros ADN y ARN cromosomales y extra-cromosomales, proteínas y orgánulos. Los ácidos nucleicos y proteínas que han sido “aisladas” incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificadas a través de métodos de purificación estándares. El término también abarca ácidos nucleicos y proteínas preparadas a través de expresión recombinante en una célula huésped así como ácidos nucleicos químicamente sintetizados y proteínas.

Los polipéptidos gB de CMV y ácidos nucleicos de la invención son útiles en la preparación de medicamentos para tratar una infección por CMV. Los polipéptidos gB de CMV de la invención son particularmente adecuados como antígenos para incluirse en una composición inmunogénica, tales como vacunas. Por consiguiente, la presente invención también abarca métodos para producir una respuesta inmune contra CMV al administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que contiene cualquiera de los polipéptidos gB de CMV de la invención. Los sujetos pueden ser sujetos ya sea HCMV-seropositivos o HCMV-seronegativos. En algunas modalidades, los sujetos son niñas adolescentes, típicamente de 12 a 16 años de edad. Alternativamente, los sujetos pueden ser mujeres en edad de reproducción. Típicamente, el grupo de mujeres en edad de reproducción representan mujeres que tienen entre 16 y 45 años de edad que han quedado embarazadas. En una modalidad particular, la

invención contempla un método para producir una respuesta inmune contra CMV, que comprende los pasos de administrar a mujeres en edad de reproducción HCMV-seronegativas, una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que comprende un polipéptido gB de la invención, en una modalidad

5 alternativa, los polipéptidos gB de CMV de la invención se utilizan en la preparación de un medicamento para evitar y/o tratar una infección por CMV. Convenientemente, la composición, o medicamento, produce una respuesta inmune protectora que reduce o evita la infección con CMV y/o reduce o evita una respuesta patológica después de infección con CMV. En particular, el método de

10 la invención, en donde a mujeres en edad de reproducción se les administra una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que contiene cualquiera de los polipéptidos gB de CMV de la invención, evita la transmisión de CMV de la madre al feto, es decir, evita la infección congénita por CMV. Los términos “prevención de infección congénita por HCMV en un recién nacido” significa que el

15 recién nacido está libre de infección por HCMV al nacer. Alternativamente, los sujetos adecuados para recibir la composición inmunogénica de la invención son sujetos inmunocomprometidos, tales como, por ejemplo, pacientes trasplantados. Por consiguiente, en algunas modalidades, la presente invención contempla el uso de polipéptidos gB de CMV de la invención para reducir y/o evitar la infección por

20 CMV en sujetos inmunocomprometidos. En modalidades adicionales, la presente invención contempla métodos para producir una respuesta inmune contra CMV que comprende los pasos de administrar polipéptidos gB de CMV de la invención a sujetos inmunocomprometidos.

Un “sujeto” es un organismo viviente vertebrado multi-celular. En el contexto de esta descripción, el sujeto puede ser un sujeto experimental, tal como un animal que no es un ser humano, por ejemplo, un ratón, una rata aldonera, o un primate no humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un sujeto ser humano, como se indicó anteriormente.

Un “antígeno” es un compuesto, composición, o substancia que puede estimular una respuesta inmune al producir anticuerpos y/o una respuesta de célula T en un animal, incluyendo composiciones que son inyectadas, absorbidas, o de otra manera introducidas en el animal. El término “antígeno” incluye todos los epítopos antigénicos relacionados. El término “epítipo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al cual responden las células B y/o T. Los “epítopos antigénicos predominantes” son aquellos epítopos para los cuales se hace una respuesta inmune huésped funcionalmente importante, por ejemplo, una respuesta de anticuerpo de una respuesta de célula T. De esta manera, con respecto a una respuesta inmune protectora contra un patógeno, los epítopos antigénicos predominantes son aquellas porciones antigénicas que cuando son reconocidas por el sistema inmune huésped dan como resultado protección contra la enfermedad causada por el patógeno. El término “epítipo de célula T” se refiere a un epítipo que cuando se une a una molécula MHC apropiada específicamente se une a través de una célula T (mediante un receptor de célula T). Un “epítipo de célula B” es un epítipo que es específicamente unido a través de un anticuerpo (o molécula de receptor de célula B).

Una “respuesta inmune” es una respuesta de una célula del sistema

inmune, tal como una célula B, célula T, o monocito, a un estímulo. Una respuesta inmune puede ser una respuesta de célula B, la cual da como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos de neutralización de antígeno específico. Una respuesta inmune también puede ser una respuesta de célula T, tal como una respuesta CD4⁺ o una respuesta CD8⁺. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno particular (es decir, una “respuesta específica para antígeno”), en particular, CMV. Si el antígeno se deriva de un patógeno, la respuesta específica para antígeno es una “respuesta específica para patógeno”. Una “respuesta inmune protectora” es una respuesta inmune que inhibe una función o actividad peligrosa de un patógeno, reduce la infección por un patógeno, o disminuye los síntomas (incluyendo la muerte) que resultan de la infección por el patógeno. Una respuesta inmune protectora puede ser medida, por ejemplo, a través de la inhibición de replicación viral o formación de placa en un ensayo de reducción de placa o ensayo de neutralización de ELISA, o al medir la resistencia al ataque del patógeno *in vivo*.

Típicamente, la respuesta inmune produce una respuesta inmune caracterizada por la producción de citocinas de tipo Th1, por ejemplo, una respuesta inmune de tipo Th1. Una respuesta inmune de tipo “Th1” se caracteriza por células colaboradoras T CD4⁺ que producen IL-2 e IFN- γ . En contraste, una respuesta inmune de tipo “Th2” se caracteriza por células colaboradoras CD4⁺ que producen IL-4, IL-5 e IL-13.

Una “cantidad inmunológicamente efectiva” es una cantidad de una composición (típicamente, una composición inmunogénica) usada para producir

una respuesta inmune en un sujeto. Comúnmente, el resultado deseado es la producción de una respuesta inmune específica para antígeno (por ejemplo, patógeno) que es capaz de o contribuye a proteger al sujeto contra el patógeno, tal como CMV. Sin embargo, para obtener una respuesta inmune protectora contra un patógeno se pueden requerir de múltiples administraciones de la composición inmunogénica. De esta forma, en el contexto de esta descripción, el término cantidad inmunológicamente efectiva abarca una dosis fraccionar que contribuye en combinación con administraciones previas o subsecuentes para obtener una respuesta inmune protectora.

10 También se proporcionan composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, incluyendo un polipéptido gB de CMV y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Una “composición inmunogénica” es una composición de materia adecuada para administrarse a un ser humano o animal que sea capaz de producir una respuesta inmune específica, por ejemplo, contra un patógeno, tal como CMV. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, antígenos polipeptídicos) o epítopos antigénicos, tales como, por ejemplo, los polipéptidos gB de CMV de la invención. Una composición inmunogénica también puede incluir uno o más componentes adicionales capaces de producir o mejorar una respuesta inmune, tal como un excipiente, vehículo, y/o auxiliar. En ciertos casos, las composiciones inmunogénicas se administran para producir una respuesta inmune que protege al sujeto contra síntomas o condiciones inducidas por un patógeno. En algunos casos, se evitan (o se reducen o mejoran) los síntomas o la enfermedad causada

por un patógeno al inhibir la replicación del patógeno (por ejemplo, CMV) después de la exposición del sujeto al patógeno. En el contexto de la esta descripción, se entenderá que el término composición inmunogénica abarca composiciones que pretende ser para administrarse a un sujeto o población de sujetos con el

5 propósito de producir una respuesta inmune protectora o paliativa contra CMV (es decir, composiciones de vacuna o vacunas). Las composiciones inmunogénicas de acuerdo con la invención no están limitadas a composiciones que comprenden polipéptidos gB de CMV. La presente invención también contempla composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, que comprenden los polipéptidos gB de CMV

10 de la invención y al menos uno o más antígenos de CMV seleccionados del grupo que consiste de pp65, IE1 , pUL131 , gL, gH, pUL128, pUL130, o cualquier combinación de los mismos. La presente invención también contempla composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, que comprenden los polipéptidos gB de CMV de la invención y al menos uno o más antígenos

15 seleccionados del grupo que consiste de HPV, Chlamydia, RSV, Toxoplasma gondii. Zoster, y Aspergillus.

Numerosos diluyentes y vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, por E. W.

20 Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15^o Edición (1975). El adjetivo "farmacéuticamente aceptable" indica que el diluyente, o vehículo, o excipiente para administrarse a un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal). En general, la naturaleza del diluyente, vehículo y/o excipiente dependerá del modo particular

de administración que se utilice. Por ejemplo, la formulaciones parenterales usualmente incluyen fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, salina fisiológica, soluciones equilibradas de sal, dextrosa acuosa, glicerol o similares, como un vehículo. En

5 ciertas formulaciones (por ejemplo, composiciones sólidas, tales como formas en polvo), no se emplea un diluyente líquido. En dichas formulaciones, se pueden utilizar vehículos sólidos no tóxicos, incluyendo, por ejemplo, grados farmacéuticos de trehalosa, manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio.

Por consiguiente, los excipientes y vehículos adecuados pueden ser

10 seleccionados por aquellos expertos en la técnica para producir una formulación adecuada para suministrarse a un sujeto a través de una ruta seleccionada de administración. Los excipientes incluyen, sin limitación: glicerol, polietilen glicol (PEG), polioles formadores de vidrio (tales como, sorbitol, trehalosa), N-lauroilsarcosina (por ejemplo, sal de sodio), L-prolina, sulfobetaína no detergente,

15 clorhidrato de guanidina, urea, óxido de trimetilamina, KCl, C^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} (y otras sales relacionadas de catión divalente), ditioneitol (DTT), ditioeritol, β -mercaptoetanol, detergentes (incluyendo, por ejemplo, Tween80, Tween20, Triton X-100, NP-40, Empigen BB, Octilglucósido, Lauroil maltósido, Zwittergent 3-08, Zwittergent 3-10, Zwittergent 3-12, Zwittergent 3-14, Zwittergent 3-16, CHAPS,

20 desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, y bromuro de cetiltrimetilamonio.

En ciertos ejemplos, la composición inmunogénica también incluye un auxiliar. Los auxiliares adecuados para usarse en composiciones inmunogénicas que contienen polipéptidos gB de CMV de la invención son auxiliares que, en

combinación con dichos polipéptidos aquí descritos, son seguras y mínimamente reactogénicas cuando se administran a un sujeto.

Un “auxiliar” es un agente que mejora la producción de una respuesta inmune en una forma no específica. Los auxiliares comunes incluyen

5 suspensiones de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) sobre los cuales el antígeno es adsorbido; emulsiones, incluyendo agua en aceite, y aceite en agua (y sus variantes, incluyendo emulsiones dobles y emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas de Receptor Toll

10 (particularmente, agonistas de TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9), y varias combinaciones de dichos componentes.

Los auxiliares adecuados para usarse en combinación con los polipéptidos gB de CMV de la invención son saponinas. Por consiguiente, las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender la saponina QS21

15 (WO8809336A1; US5057540A). QS21 es bien conocida en la técnica como una saponina natural derivada de la corteza de *Quillaja saponaria Molina*, la cual incluye células T citotóxicas CD8⁺ (CTLs), células Th1 y una respuesta de anticuerpo de IgG2a predominante. Para evitar duda la referencia a QS21 incluye OPT-821. En una forma adecuada de la presente invención, las composiciones

20 inmunogénicas de la invención comprenden QS21 en una forma substancialmente pura, es decir, QS21 es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% pura, por ejemplo, al menos 95%, o al menos 98% pura. Las composiciones de la invención pueden comprender QS21 en una cantidad de entre aproximadamente 1 µg a

aproximadamente 100 µg, por ejemplo, de entre aproximadamente 1 µg a aproximadamente 60 µg, o de entre aproximadamente 10 µg y aproximadamente 50 µg, por ejemplo, 10 µg, aproximadamente 12.5 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, aproximadamente 25 µg, aproximadamente 30 µg, aproximadamente 40 µg o en particular aproximadamente 50 µg. En particular, QS21 está presente en una cantidad de entre aproximadamente 40 µg y 60 µg o entre 45 y 55 µg o entre 47 y 53 µg o entre 48 y 52 µg o entre 49 y 51 o aproximadamente 50 µg. Alternativamente, QS21 está presente en una cantidad de entre 21 µg y 29 µg o entre aproximadamente 22 µg y aproximadamente 28 µg o entre aproximadamente 23 µg y aproximadamente 27 µg o entre aproximadamente 24 µg y aproximadamente 26 µg, o aproximadamente 25 µg. En algunas modalidades, las composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden QS21 en una cantidad de aproximadamente 10 µg, por ejemplo, entre aproximadamente 5 µg y 15 µg, aproximadamente 6 µg y aproximadamente 14 µg, aproximadamente 7 µg y aproximadamente 13 µg, aproximadamente 8 µg y aproximadamente 12 µg o aproximadamente 9 µg y aproximadamente 11 µg, o aproximadamente 10 µg. En otras modalidades más, las composiciones inmunogénicas de la invención comprenden QS21 en una cantidad de aproximadamente 5 µg, por ejemplo, entre aproximadamente 1 µg y 9 µg, aproximadamente 2 µg y aproximadamente 8 µg, aproximadamente 3 µg y aproximadamente 7 µg, aproximadamente 4 µg y aproximadamente 6 µg, o aproximadamente 5 µg. Una cantidad adecuada de QS21 en la dosis para ser humano de las composiciones de la invención es, por

ejemplo, de cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 μ g.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden polipéptidos gB de
5 CMV de la invención pueden comprender QS21 y un estero, colesterol en particular. Dichas composiciones muestran una reactogenicidad reducida cuando se comparan con composiciones en donde el estero está ausente, mientras se mantiene el efecto del auxiliar. Los estudios de reactogenicidad pueden ser valorados de acuerdo con los métodos descritos en WO 96/33739. El estero, de
10 acuerdo con la invención, representa un estero exógeno, es decir, un estero, el cual no es endógeno al organismo a partir del cual se puede tomar la preparación de antígeno β -amiloide. Convenientemente, el estero exógeno está asociado al auxiliar de saponina como se describe en WO 96/33739. En una modalidad particular, el colesterol está presente en un exceso a aquel de QS21, por ejemplo,
15 la relación de QS21:estero típicamente será del orden de 1:100 a 1:1 (p/p), convenientemente de entre 1:10 a 1:1 (p/p), y de preferencia de 1:5 a 1:1 (p/p). En particular, la relación de QS21:estero es de al menos 1:2 (p/p). En una modalidad particular, la relación de QS21:estero es de 1:15 (p/p). Los esteroides adecuados incluyen β -sitosterol, estigmasterol, ergosterol, ergocalciferol y colesterol. En una
20 modalidad particular, las composiciones de la invención comprenden colesterol como estero. Estos esteroides son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el colesterol se describe en Merck Index, 11^o Edn, página 341, como un estero de existencia natural encontrado en grasa animal. Por consiguiente, en una

modalidad específica, las composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos gB de CMV de la invención, comprenden QS21 en su composición menos reactogénica, en donde se extingue con un esteroI exógeno, tal como colesterol, por ejemplo. Existen varias formas particulares de composiciones

5 menos reactogénicas, en donde QS21 se extinguió con un colesterol exógeno. En una modalidad específica, la saponina/esteroI está en la forma de una estructura de liposoma (WO 96/337391). De esta manera, por ejemplo, los polipéptidos gB de CMV de la invención convenientemente pueden ser empleados en composiciones inmunogénicas con un auxiliar que comprende una combinación de

10 QS21 y colesterol.

El término “liposoma(s)” generalmente se refiere a estructuras de lípido uni- o multi-laminares (en particular, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 láminas dependiendo del número de membranas de lípido formadas) que encierran un interior acuoso. Los liposomas y formulaciones de liposomas con bien conocidos en la técnica. Los

15 lípidos, los cuales son capaces de formas liposomas, incluyen todas las sustancias que tienen propiedades grasas o de tipo graso. Los lípidos que pueden formar los lípidos en los liposomas pueden ser seleccionado del grupo que comprende glicéridos, glicerofosfolípidos, glicerofosfinolípidos, glicerofofonolípidos, sulfolípidos, esfingolípidos, fosfolípidos, isoprenoides,

20 esteroides, estearinas, esteroides, arqueolípidos, lípidos catiónicos sintéticos y lípidos que contiene carbohidrato. Los liposomas convenientemente pueden comprender un fosfolípido. Los fosfolípidos adecuados incluyen (pero no se limitan a): fosfocolina (PC), la cual es un intermediario en la síntesis de fosfatidilcolina;

derivados naturales de fosfolípidos: fosfocolina de huevo, fosfocolina de soya, fosfocolina de soya hidrogenada, esfingomielina como fosfolípidos naturales; y derivados sintéticos de fosfolípidos: (didecanoil-L- α -fosfatidilcolina [DDPC], dilauroilfosfatidilcolina [DLPC], dimiristoilfosfatidilcolina [DMPC], dipalmitoil fosfatidilcolina [DPPC], Distearoil fosfatidilcolina [DSPC], Dioleoil fosfatidilcolina [DOPC], 1-palmitoil, 2-oleoilfosfatidilcolina [POPC], Dielaidoil fosfatidilcolina [DEPC]), fosfoglicerol (1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DMPG], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DPPG], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [DSPG], 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol [POPG]), ácido fosfatídico ácido (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatídico [DMPA], ácido dipalmitoil fosfatídico [DPPA], ácido diestearoil-fosfatídico [DSPA]), fosfoetanolamina (1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DMPE], 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina [DPPE], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina DSPE 1,2-Dioleoil-sn-Glicero-3-Fosfoetanolamina [DOPE]), fosfoserina, polietilen glicol [PEG]

fosfolípido (mPEG-fosfolípido, poliglicerin-fosfolípido, fosfolípido funcionalizado, fosfolípido activado terminal). En una modalidad, los liposomas comprenden 1-palmitoil-2-oleoil-glicero-3-fosfoetanolamina. En una modalidad, se utiliza fosfatidilcolina altamente purificada y puede ser seleccionado del grupo que comprende fosfatidilcolina (EGG), fosfatidilcolina hidrogenada (EGG), fosfatidilcolina (SOYA), fosfatidilcolina hidrogenada (SOYA). En otra modalidad, los liposomas comprenden fosfatidiletanolamina [POPE] o un derivado del mismo. El tamaño del liposoma puede variar de 30 nm a varios μ m dependiendo de la composición de fosfolípido y el método usado para su preparación. En

modalidades particulares de la invención, el tamaño del liposoma estará en la escala de 50 nm a 500 nm y en modalidades adicionales de 50 nm a 200 nm. La dispersión de luz láser dinámica es un método usado para medir el tamaño de liposomas bien conocido por aquellos expertos en la técnica. los liposomas de la invención pueden comprender dioleoil fosfatidilcolina [DOPC] y un esterol, en particular, colesterol. De esta manera, en una modalidad particular, las composiciones inmunogénicas que comprenden polipéptidos gB de CMV de la invención, tales como polipéptidos gB que tienen un dominio de transmembrana no funcional y al menos uno de los Bucles de Fusión FL1 y FL2 mutado, posiblemente ambos, comprenden QS21 en cualquier cantidad aquí descrita en la forma de un liposoma, en donde dicho liposoma comprende dioleoil fosfatidilcolina [DOPC] y un esterol, en particular, colesterol.

Las composiciones inmunogénicas de la invención pueden comprender uno o más inmunoestimulantes adicionales. En una modalidad, las composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos gB de CMV de la invención, como se describe aquí, además comprenden un lipopolisacárido, convenientemente un derivado no tóxico del lípido A, en particular, lípido A de monofosforilo o más particularmente, lípido A de monofosforilo 3-desacilado (3D-MPL). 3D-MPL se vende bajo el nombre de MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A., y se denomina a través de la especificación como MPL o 3D-MPL. Ver, por ejemplo, Patentes de E.U.A. Nos. 4,436,727; 4,877,611 ; 4,866,034 y 4,912,094. 3D-MPL principalmente promueve respuestas de célula T CD4+ con un fenotipo IFN- γ (Th1). 3D-MPL puede ser producido de acuerdo con los métodos descritos

en GB2220211 A. Químicamente es una mezcla de lípido A de monofosforilo 3-desacilado con 3, 4, 5 o 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención se puede utilizar 3D-MPL de partícula pequeña. El 3D-MPL de partícula pequeña tiene un tamaño de partícula de manera que puede ser filtrado de forma
5 estéril a través de un filtro de 0.22 μm . Dichas preparaciones se describen en WO 94/21292.

Las composiciones de la invención pueden comprender 3D-MPL en una cantidad de entre aproximadamente 1 μg a aproximadamente 100 μg , por ejemplo, de entre aproximadamente 1 μg a aproximadamente 60 μg o de entre
10 aproximadamente 10 μg y aproximadamente 50 μg , por ejemplo, aproximadamente 10 μg , aproximadamente 12 μg , aproximadamente 15 μg , aproximadamente 20 μg , aproximadamente 25 μg , aproximadamente 30 μg , aproximadamente 40 μg o en particular aproximadamente 50 μg . En particular, 3D-MPL está presente en una cantidad de entre aproximadamente 40 μg y 60 μg
15 o entre 45 y 55 μg o entre 47 y 53 μg o entre 48 y 52 μg o entre 49 y 51 o aproximadamente 50 μg . Alternativamente, 3D-MPL está presente en una cantidad de entre 21 μg y 29 μg o entre aproximadamente 22 μg y aproximadamente 28 μg o entre aproximadamente 23 μg y aproximadamente 27 μg o entre aproximadamente 24 μg y aproximadamente 26 μg , o aproximadamente 25 μg .

20 En otra modalidad, la dosis para ser humano de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 10 μg , por ejemplo, entre 5 y 15 μg , convenientemente entre 6 y 14 μg , por ejemplo, entre 7 y 13 μg o entre 8 y 12 μg o entre 9 y 11 μg , o 10 μg . En una modalidad más, la

dosis para ser humano de la composición inmunogénica comprende 3D-MPL a un nivel de aproximadamente 5 µg, por ejemplo, entren 1 y 9 µg, o entre 2 y 8 µg o convenientemente entre 3 y 7 µg o 4 y 6 µg, o 5 µg. Una cantidad adecuada de 3D-MPL en las composiciones de la invención es de, por ejemplo, cualquiera de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 µg. En otras modalidades, el lipopolisacárido puede ser un disacárido β1-6) glucosamina, como se en la Patente de E.U.A. No. 6,005,099 y la Patente EP No. 0 729 473 B1. Un experto en la técnica fácilmente podría ser capaz de producir varios lipopolisacáridos, tales como 3D-MPL, basándose en las enseñanzas de estas referencias. Además de los inmunoestimulantes antes mencionados (que son similares en estructura a aquella de LPS o MLP o 3D-MPL), los derivados acilados de monosacárido y disacárido que son una subporción para la estructura anterior también son auxiliares adecuados. En otras modalidades, el auxiliar es un derivado sintético de lípido A, algunos de los cuales se describen como TLR-4, e incluyen, pero no se limitan a:

- OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-o-fosfono-D-D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]-D-D-glucopiranosilfosfato diácido), (WO 95/14026)
- OM 294 DP (3S, 9 R) -3-[(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol, 1,10-bis(fosfato diácido) (WO 99/64301 y WO 00/0462)
- OM 197 MP-Ac DP (3S-,9R)-3-D(R)-dodecanoiloxitetradecanoilamino]-4-oxo-5-

aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoilamino]decan-1,10-diol,1-fosfato diácido 10-(6-aminohexanoato) (WO 01/46127).

Las combinaciones de diferentes auxiliares, tales como aquellos mencionados anteriormente, también pueden ser utilizados en las composiciones con polipéptidos gB de CMV. Por ejemplo, como ya se observó, QS21 puede ser formulado junto con 3D-MPL. La relación de QS21:3D-MPL típicamente estará en el orden de 1:10 a 10:1; tal como 1:5 a 5:1, y por lo regular substancialmente 1:1. Típicamente, la relación está en la escala de 2.5:1 a 1:1 3D-MPL:QS21. Por consiguiente, en algunas modalidades, las composiciones inmunogénicas que comprenden polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden al menos QS21 y 3D-MPL.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden los polipéptidos gB de CMV de la invención también pueden ser convenientemente formuladas con una emulsión de aceite en agua. La emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable (es decir, biodegradable). El aceite puede ser cualquier aceite vegetal, aceite de pescado, aceite animal o aceite sintético, el cual es no tóxico para el receptor y es capaz de ser transformado mediante metabolismo. Las nueces, semillas y granos son fuentes comunes de aceites vegetales. Los aceites sintéticos también son adecuados. Por consiguiente, las emulsiones de aceite en agua usadas en combinación con los polipéptidos gB de CMV de la invención comprenden un aceite metabolizable. En una modalidad particular, las emulsiones de aceite en agua comprenden escualeno (por ejemplo, entre aproximadamente 4% y 6% [v/v]). La emulsión de aceite en agua además comprende un agente

tensoactivo. Las emulsiones de aceite en agua de la invención comprenden uno o más agentes tensoactivos. Los agentes tensoactivos adecuados son bien conocidos a los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween 80, Polisorbato 80), triolato de sorbitán (Span 85), fosfatidilcolina (lecitina), polioxietilen (12) cetoestearil éter y octoxinol-9 (Triton X-100). En una modalidad particular de la invención, las emulsiones de aceite en agua comprenden monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween 80, Polisorbato 80). En una modalidad adicional, las emulsiones de aceite en agua de la invención comprenden monooleato de polioxietilen sorbitán (Tween 80), y un agente tensoactivo adicional, en particular, triolato de sorbitán (Span 85). Las emulsiones de aceite en agua de la invención también pueden comprender un tocol. Los tocoles son bien conocidos en la técnica y se describen en EP0382271. En particular, el tocol es α -tocoferol o un derivado del mismo, tal como succinato de alfa-tocoferol (también conocido como succinato de vitamina E). En una modalidad particular de la invención, se proporcionan composiciones inmunogénicas que comprenden polipéptidos gB de CMV de la invención en combinación con una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno (por ejemplo 5% [v/v]) y α -tocoferol (por ejemplo, aproximadamente 5% [v/v]). En una modalidad particular, la emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable (por ejemplo, escualeno), un tocol (por ejemplo, α -tocoferol) y un agente tensoactivo (por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitán [Polisorbato 80]). En otra modalidad de la invención, las emulsiones de aceite en agua de la invención comprenden un aceite metabolizable (por ejemplo, escualeno), un agente tensoactivo (por

ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitán [Polisorbato 80]), y opcionalmente un segundo agente tensoactivo (por ejemplo, trioleato de sorbitán [Span 85]). En una modalidad más de la invención, las emulsiones de aceite en agua de la invención comprenden un aceite metabolizable (por ejemplo, escualeno), un polioxietilen alquil éter, agente tensoactivo no iónico hidrofílico (por ejemplo, polioxietilen (12) cetoestearil éter) y un agente tensoactivo no iónico hidrofóbico (por ejemplo, monooleato de polioxietilen sorbitán [Polisorbato 80]), o trioleato de sorbitán [Span 85]). En algunas modalidades, las composiciones inmunogénicas que comprende los polipéptidos gB de CMV de la invención, tales como polipéptidos gB que tienen un dominio de transmembrana no funcional y al menos uno de los Bucles de Fusión FL1 y FL2 mutado, posiblemente ambos, comprenden una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y Polisorbato 80.

Convenientemente, la emulsión de aceite en agua comprende 11 mg de aceite metabolizable (tal como escualeno) o más bajo, por ejemplo, entre 0.5-11 mg, 0.5-10 mg o 0.5-9 mg 1-10 mg, 1-11 mg, 2-10 mg, 4-8 mg, o 4.5-5.5 mg, y 5 mg de agente emulsificante (tal como monooleato de polioxietilen sorbitán) o más bajo, por ejemplo, entre 0.1-5 mg, 0.2-5 mg, 0.3-5 mg, 0.4-5 mg, 0.5-4 mg, 1-2 mg o 2-3 mg por dosis de la vacuna. Adecuadamente, el tocol (por ejemplo, alfa-tocoferol), cuando está presente, está en 12 mg o por abajo, por ejemplo entre 0.5-12 mg, 10-11 mg, 1-11 mg, 2-10 mg, 4-9 mg, o 5-7 mg por dosis de vacuna para ser humano.

Por el término “dosis de vacuna para ser humano” se refiere a una dosis que está en un volumen adecuado para uso humano. Generalmente, está entre

0.25 y 1.5 ml. En una modalidad, una dosis para ser humano es de 0.5 ml. En una modalidad más, una dosis para ser humano es mayor que 0.5 ml, por ejemplo, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 o 1 ml. En otra modalidad, en particular cuando la composición inmunogénica es para la población pediátrica, una dosis para ser humano puede ser menor que 0.5 ml tal como entre 0.25 y 0.5 ml.

Una composición inmunogénica típicamente contiene una cantidad inmunoprotectora (o una dosis fraccional del mismo) del antígeno y se puede preparar a través de técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, incluyendo aquellas para administración a seres humanos, generalmente se describen en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, editado por Powell and Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller et al. , University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. La encapsulación dentro de liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, Patente de E.U.A. 4,235,877. La conjugación de proteínas se describe, por ejemplo, por la Patente de E.U.A. 4,372,945 y por Armor et al., Patente de E.U.A. 4,474,757. Típicamente, la cantidad de proteína en cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos laterales adversos, importantes en el sujeto típico. La inmunoprotección, en este contexto, no necesariamente significa una completa protección contra la infección; significa protección contra síntomas o la enfermedad, especialmente una enfermedad severa asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo de cual inmunógeno específico es

empleado. En general, se espera que cada dosis para ser humano comprenderá 1-1000 μg de proteína, tal como de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 10 μg , por ejemplo, de aproximadamente 1 μg a aproximadamente 50 μg , tal como aproximadamente 1 μg , aproximadamente 2 μg , aproximadamente 5 μg ,
5 aproximadamente 10 μg , aproximadamente 15 μg , aproximadamente 20 μg , aproximadamente 25 μg , aproximadamente 30 μg , aproximadamente 40 μg , o aproximadamente 50 μg . La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona con base en la población de sujeto (por ejemplo, bebés o adultos mayores). Una cantidad óptima para una composición particular puede ser
10 determinada a raves de estudios estándares que involucran la observación de titulaciones de anticuerpo y otras respuestas en sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo en aproximadamente 4 semanas.

A menos que se explique de otra manera, todos los términos técnicos y
15 científicos utilizados aquí tienen el mismo significado como el comúnmente entendido por un experto en la técnica a cual pertenece esta descripción. Las definiciones de términos comunes en biología molecular pueden encontrarse en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd; 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A.
20 Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1 -56081 -569-8).

Los términos “un”, “una”, “uno”, y “el”, “la” incluyen referencias plurales a

menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Además se debe entender que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácido, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximaciones y se proporcionan para descripción. El término “pluralidad” se

5 refiere a dos o más. Además se debe entender que todos los tamaños de base o tamaños de aminoácido, y todos los valores de peso molecular o masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos, son aproximaciones, y se proporcionan para descripción. Además, las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno,

10 pretenden ser aproximaciones. De esta manera, cuando una concentración es indicado como al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que la concentración se entienda que sea al menos aproximadamente (o “alrededor de” o “~”) 200 pg.

Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos aquí descritos en la práctica o prueba de esta descripción, más adelante

15 se describen métodos y materiales adecuados. El término “comprende” significa “incluye”. De esta manera, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra “comprende”, y variaciones tales como “comprender” y “que comprende” se entenderá que implican la inclusión de un compuesto o composición establecido (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o paso, o grupo de

20 compuestos o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro compuesto, composición, pasos, o grupo del mismo. La abreviatura, “e.g.”, se deriva del latín *exempli gratia*, y se utiliza aquí para indicar un ejemplo no limitante. De esta forma, la abreviatura “e.g.” es sinónima con el término “por ejemplo”.

Las siguientes modalidades se contemplan en la presente invención:

- 5 a) Un polipéptido gB de citomegalovirus (CMV) que comprende, en una orientación N-terminal a C-terminal; al menos una porción de un dominio extracelular que comprende un dominio de bucle de fusión 1 (FL1) y un dominio de bucle de fusión 2 (FL2), opcionalmente al menos una porción de un dominio de transmembrana TM, y al menos una porción de un dominio citoplásmico, en donde al menos un aminoácido del dominio FL1 está substituido o eliminado, y en donde el dominio TM o porción del mismo, si está presente, es no funcional.
- 10 b) El polipéptido gB de CMV de la modalidad a), en donde el dominio TM se hace no funcional al eliminar los aminoácidos en la posición 701-775 son relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV.
- 15 c) El polipéptido gB de CMV de la modalidad a) o b), que además comprende al menos una substitución de aminoácido, o eliminación, en el dominio de bucle de fusión FL2.
- d) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a c), que además comprende al menos la eliminación de una región de aminoácido hidrofóbica en el dominio citoplásmico del polipéptido.
- 20 e) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a d), en donde la substitución de aminoácido en el dominio de bucle de fusión FL1 consiste de la substitución de al menos un aminoácido entre Y.I.Y según localizado en la posición 155-157 con relación a la

secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, con un aminoácido polar, el cual no es aromático.

- 5 f) El polipéptido gB de CMV de la modalidad e), en donde la substitución consiste de la substitución de al menos dos aminoácidos entre Y.I.Y según localizado en la posición 155-157 con relación a la secuencia como se establece en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, con una aminoácido polar, el cual no es un aromático.
- 10 g) El polipéptido gB de CMV de la modalidad e) o f), en donde el aminoácido polar se selecciona del grupo de aminoácidos positivamente cargados consistiendo de lisina (k), histidina (H) y arginina (R).
- 15 h) El polipéptido gB de CMV de la modalidad g), en donde la isoleucina (I) ubicada en la posición 156 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una histidina (H).
- 20 i) El polipéptido gB de CMV de la modalidad g) o modalidad h), en donde la tirosina (Y) ubicada en la posición 157 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una arginina (R).
- j) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades e) a i),

en donde la tirosina (Y) ubicada en la posición 155 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una glicina (G).

- 5 k) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a d), en donde los aminoácidos Y.I.Y según ubicados en la posición 155-157 en el dominio de bucle de fusión FL1 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, están substituidos con aminoácidos
- 10 G.H.R, respectivamente.
- l) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a d), en donde el estiramiento de aminoácidos Y.I.Y según ubicado en la posición 155-157 en el dominio de bucle de fusión FL1 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición
- 15 correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, teniendo una clasificación de hidrofobicidad de + 1.9, según medido a través de la escala de Kyte y Doolittle, está substituido con un estiramiento de tres aminoácidos teniendo una clasificación de hidrofobicidad menor que -3, menor que -7, menor que -8, según medido a través
- 20 de la escala de Kyte y Doolittle.
- m) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades c) a l), en donde la substitución de aminoácido en el dominio de bucle de fusión FL2 consiste de la substitución de al menos un aminoácidos

- entre W.L.Y según ubicado en la posición 240-242 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, con un aminoácido positivamente cargado seleccionado del grupo que
- 5 consiste de lisina (K), histidina (H), y arginina (R).
- n) El polipéptido gB de CMV de la modalidad m), en donde el aminoácido entre W.L.Y según ubicado en la posición 240-242 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está
- 10 substituido con una histidina (H).
- o) El polipéptido gB de CMV de la modalidad m) o n), en donde al menos la tirosina (Y) ubicada en la posición 242 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida
- 15 con una histidina (H).
- p) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades c) a n), en donde los aminoácidos W.L.Y según ubicados en la posición 240-242 en el dominio de bucle de fusión FL2 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en
- 20 otros polipéptidos gB de CMV, están substituidos con los aminoácidos A.F.H, respectivamente.
- q) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades d) a p), en donde la eliminación en el dominio citoplásmico corresponde a la

región de aminoácidos 825 a 877 con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1.

- r) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a q), en donde dicho polipéptido es mutado en un sitio endoproteolítico.
- 5 s) El polipéptido gB de CMV de la modalidad r), en donde se realiza al menos una de las substituciones de aminoácido, que se selecciona del grupo que consiste de: R⁴⁵⁶ substituido con T⁴⁵⁶, R⁴⁵⁸ substituido con Q⁴⁵⁸, y R⁴⁵⁹ substituido con T⁴⁵⁹, con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en
- 10 otros polipéptidos gB de CMV.
- t) El polipéptido gB de CMV de la modalidad s), en donde R⁴⁵⁶, R⁴⁵⁸ y R⁴⁵⁹, con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, están substituidos con T⁴⁵⁶, Q⁴⁵⁸, y T⁴⁵⁹, respectivamente.
- 15 u) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a t), en donde la arginina (R³⁵⁷) con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1 está substituida con una serina (S³⁵⁷).
- v) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a u), en donde la arginina (R⁵⁰) con relación a la secuencia establecida en
- 20 SEC ID NO: 1 está substituida con una serina (S⁵⁰).
- w) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a v), en donde la cisteína (C⁷⁷⁸) con relación a la secuencia establecida en SEC ID NO: 1 está substituida con una alanina (A⁷⁷⁸).

- x) El polipéptido gB de CMV de la secuencia establecida en SEC ID NO: 3.
- y) El polipéptido gB de CMV de la secuencia establecida en SEC ID NO: 4.
- 5 z) El polipéptido gB de CMV de la secuencia establecida en SEC ID NO: 5.
- aa) Una preparación que comprende un polipéptido gB de CMV, en donde más del 50% de dicho polipéptido está en una forma trimérica, según medido a través de AUC (Ultracentrifugación Analítica).
- 10 bb) Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a z) mezclado con un vehículo farmacéutico adecuado.
- cc) La composición inmunogénica de la modalidad bb), que además comprende un auxiliar.
- 15 dd) Un polinucleótido que codifica al polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a)-z).
- ee) Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de la modalidad dd).
- ff) Una célula huésped transformada con el vector recombinante de la modalidad ee).
- 20 gg) El polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a z), para usarse en la prevención y/o tratamiento de una infección por CMV.

- hh) Uso del polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a z), en la preparación de un medicamento para evitar y/o tratar una infección por CMV.
- ii) Un método para producir una respuesta inmune contra CMV, que comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que comprende el polipéptido gB de CMV de cualquiera de las modalidades a) a z).

La invención además será descrita haciendo referencia los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Polipéptidos gB de CMV

Todas las variantes del polipéptido gB (ver Figura 1 y Figura 2 para una representación esquemática), designados a continuación, se originan de la secuencia de aminoácido de gB de la cepa de CMV, AD169. Por consiguiente, la numeración de aminoácidos cuando se especifica la posición de las mutaciones es relativa a la secuencia de gB de CMV, AD169, establecida en SEC ID NO: 1. También, además de las mutaciones específicas que cada una contiene como se describe más adelante, las siguientes construcciones son (i) todas eliminadas del dominio de transmembrana (eliminación de aminoácidos 701 a 775), y (ii) todas comprenden las siguientes mutaciones de punto: aminoácidos R⁵⁰ y R³⁵⁷ substituidos con el aminoácido S.

Aunque las variantes, que se presentan más adelante, comprenden una

etiqueta histidina en el extremo C-terminal del polipéptido para transfección pasajera, la secuencia de dicha etiqueta no está incluida en la SEC ID descrita ahí.

5 **1.1 gB-SLP12**

La variante gB-SLP12 comprende 2 series de mutaciones de punto apuntando a los bucles de fusión putativos de gB, FL1 y FL2, respectivamente. FL1 fue mutado al substituir los aminoácidos ¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷ con los aminoácidos ¹⁵⁵G.H.R¹⁵⁷, mientras que FL2 fue mutado al substituir los aminoácidos ²⁴⁰W.L.Y²⁴² con los aminoácidos ²⁴⁰A.F.H²⁴². Esta construcción codifica para una proteína de longitud de 830 aminoácidos. La secuencia completa de aminoácido de gB-SLP12 se proporciona en SEC ID NO: 3.

1.1.1 **Construcción del vector de expresión, pMax-AD169-gB-SLP12**

15 La secuencia de gen de gB-SLP12 (SEC ID NO: 6) se sintetizó a través de la compañía GeneArt. La secuencia de codificación fue de codón optimizado para expresión en células CHO. Se introdujeron sitios de restricción, *HindIII* y *BamHI*, en el extremo 5' (en frente del codón de inicio) y el extremo 3' (justo después del codón de terminación), respectivamente. La secuencia de gen de codón optimizado lleva mutaciones tanto en el primer bucle de fusión putativa (¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷ reemplazado con ¹⁵⁵G.H.R¹⁵⁷) como en el segundo bucle de fusión putativa (²⁴⁰W.L.Y²⁴² reemplazado con ²⁴⁰A.F.H²⁴²). El fragmento de ADN sintético fue recibido como un inserto de ADN con una longitud de 2558 bp clonado en el vector

pMA (plásmido propietario GeneArt) utilizando los sitios de clonación *KpnI* y *SacI*, generando el plásmido AD169-gB-SLP12-pMA. El plásmido AD169-gB-SLP12-pMA fue restringido con *HindIII* y *BamHI*. El fragmento de ADN de 2530 bp conteniendo el gen gB-SLP12 fue purificado con gel y se ligó al vector de expresión de mamífero, pMax, una versión modificada del vector pMaxCloning de Amaxa. La estructura de base del vector pMaxCloning ha sido modificada con el fin de eliminar un codón de inicio, ATG, presente en múltiples sitios de clonación del vector comercial de Amaxa (entre *KpnI* y *HindIII*). Después de la verificación de secuencia a través de secuenciación automática de ADN, se utilizó el plásmido recombinante, pMax-AD169-gB-SLP12, para transfectar pasajeramente células CHO-S.

1.2 gB-SLP12-Del2

La eliminación de una región hidrofóbica que abarca los aminoácidos Pro⁸²⁵ a Lys⁸⁷⁷ se introdujo en la variante gB-SLP12, generando la variante gB-SLP12-Del2. Esta construcción codifica para una proteína con una longitud de 777 aminoácidos. La secuencia de aminoácido completa de la variante gB-SLP12-Del2 se da en SEC ID NO: 4. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP12-Del2 se muestra en SEC ID NO: 8.

20

1.2.1 Construcción del vector de expresión, pMax-AD169-gB-SLP12-Del2

Un fragmento de ADN de 2159 bp abarcando los sitios de restricción únicos, *HindIII* y *Clal*, presente en la secuencia de codificación AD169-gB-SLP12,

se amplificó a través de PCR, utilizando el plásmido AD169-gB-SLP12-pMA, como una plantilla y los iniciadores SLP-Fw (SEC ID NO: 22) (5'-GAAAGCGGGCAGTGAGCGGAAGGC-3') y SLP-Rv (SEC ID NO: 23) (5'-TGTCCTCCACGTACTTCACGCGCTGC-3'). La parte C-terminal del gen AD169-gB-SLP12Del2, también se amplificó mediante PCR como un fragmento de 745 bp abarcando los sitios de restricción *ClaI* y *SacI*, utilizando el vector Del2-pMA como plantilla y los iniciadores Del-Fw (SEC ID NO: 24) (5'-CCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCA-3') y Del-Rv (SEC ID NO: 25) (5'-CCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGC-3'). El vector Del2-pMA, el lleva un fragmento de ADN sintético que codifica para la parte del término C del gen gB-SLP12-Del2, se construyó por la compañía GeneArt. Después de la restricción con las enzimas apropiadas, los fragmentos de PCR fueron clonados en el vector pMax restringido con *HindIII* y *SacI*. Después de la verificación de secuencia a través de secuenciación automática de ADN, se utilizó el plásmido recombinante pMax-AD169-gB-SLP12 para transfectar pasajeramente células CHO-S.

1.3 gB-SLP1-Del2

La eliminación de una región hidrofóbica abarcando los aminoácidos Pro⁸²⁵ a Lys⁸⁷⁷ fue introducida en la variante gB-SLP1, generando la variante gB-SLP1-Del2. Esta variante codifica una proteína con una longitud de 777 aminoácidos. La secuencia de aminoácido completa de gB-SLP1-Del2 se da en SEC ID NO: 5.

1.3.1 Construcción del vector de expresión pMax-AD169-gB-SLP1-Del2

El gen gB-SLP1 primero se sintetizó mediante GeneArt. La secuencia de gen de codón optimizado lleva mutaciones en el primer bucle de fusión putativo (¹⁵⁵Y.I.Y¹⁵⁷ reemplazado con ¹⁵⁵G.H.R¹⁵⁷). Este gen sintético se recibió como un fragmento de ADN de 2558 bp, se clonó en el vector pMA utilizando los sitios de clonación *KpnI* y *SacI*, generando el plásmido AD169-gB-SLP1-pMA. El vector de expresión pMax-AD169-gB-SLP1-Del2 se construyó a partir de AD169-gB-SLP1-pMA y el vector plásmido Del2-pMA. El vector pMA-gB-SLP1 fue restringido con *HindIII* y *Clal*, y el fragmento de ADN de 1964 bp que codifica para la parte N-terminal de la proteína SLP1-Del-2 se aisló a través de purificación de gel. El vector plásmido Del2-pMA fue digerido con *Clal* y *SacI*, y el fragmento de ADN de 420 bp que codifica para la parte C-terminal de la proteína gB-SLP1-Del2 se aisló a través de purificación de gel. Estos dos fragmentos se ligaron conjuntamente al vector de expresión, pMax, restringido con *HindIII* y *SacI*, generando el vector de expresión final, pMax-AD169-gB-SLP1-Del2. Después de la verificación de secuencia a través de secuenciación automática de ADN, se utilizó el plásmido recombinante, pMax-AD169-gB-SLP1-Del2 para transfectar pasajeramente células CHO-S. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP1-Del2 se muestra en SEC ID NO: 7.

20 **1.4 gB-SLP12-Delta113**

La eliminación de la parte C-terminal del dominio citoplásmico, empezando en el aminoácido 793 se realizó en la variante gB-SLP12-Delta113, así como la eliminación de los aminoácidos 701-775 del dominio de transmembrana. Esta

variante codifica para una proteína con una longitud de 717 aminoácidos. La secuencia de aminoácido completa de gB-SLP12-Delta113 se da en SEC ID NO: 12.

5 **1.4.1 Construcción del vector pTT5-gB-SLP12-Delta113**

La estrategia usada para construir el vector de expresión pTT5-gB-SLP-Delta113 es como sigue. Primero, el vector pMax-AD169-gB-SLP12 (ver sección 1.1.1) fue restringido con *HindIII* y *Clal*. El fragmento de gB de 1970 bp, que corresponde a la parte N-terminal de la construcción gB-SLP12-Delta113, se aisló a través de purificación de gel. El extremo C-terminal de la construcción gB-SLP12-Delta113 abarcando los sitios *Clal* y *BamHI* (justo después del codón de terminación), se sintetizó mediante GeneArt y se recibió como un inserto de ADN con una longitud de 230 bp (nombrado nuevo-2) clonado en el vector pMA (plásmido propietario de GeneArt). El vector nuevo-2-pMA se restringió con *Clal* y *BamHI* y el inserto de 230 bp se purificó mediante gel. Los dos fragmentos de ADN purificados con gel se ligaron conjuntamente en el vector de expresión pMax previamente restringido con *HindIII* y *BamHI*, generando el plásmido pMax-AD169-gB-SLP12-Delta113. Después, las serinas en la posición 50 y 357 de la construcción AD169-gB-SLP12-Delta113 ambas fueron invertidas a la arginina nativa, utilizando el equipo "QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis" de Stratagene (No. 200513). El plásmido resultante, después de la verificación de secuencia, fue digerido con enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI*. El fragmento gB de 2200 bp fue purificado con gel y se ligó en el vector pTT5 (NCR, Canadá)

previamente restringido con *HindIII* y *BamHI*, generando el vector de expresión final pTT5-gB-SLP12-Delta113. Este vector se utilizó para transfectar pasajeramente células CHO-S. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP12-Delta113 se muestra en SEC ID NO: 11.

5

1.5 **gB-SLP12-Delta113**

La eliminación de la parte del dominio de transmembrana, empezando en el aminoácido 725, y del dominio citoplásmico entero se realizó en gB-SLP12-Delta725. Esta variante codifica para una proteína con una longitud de 724 aminoácidos. La secuencia completa de aminoácido de la variante gB-SLP12-Delta725 se da en SEC ID NO: 10.

10

1.5.1 **Construcción del vector de expresión pTT5-gB-SLP12-Delta725**

Primero, la serina en la posición 50 y 357 de la construcción gB-SLP12-Del2 (ver sección 1.2) se invirtió a la arginina nativa, utilizando el equipo "QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis" de Stratagene (No. 200513). El plásmido resultante, después de la verificación de secuencia, fue digerido con enzimas de restricción *HindIII* y *Clal*, y el fragmento de gB de 1970 bp resultante se asiló a través de purificación de gel. También se generó un fragmento de PCR abarcando los sitios de restricción, *Clal* y *BamHI* (SEC ID NO: 26) y comprendiendo la siguiente secuencia: A

15

20

TCGATCCCCTGGAGAACACCGACTTCAGGGTGCTGGAGCTGTACTCCCAGAA
GGAAGTGGAGGTCCAGCAACGTGTTTCGACCTGGAGGAAATCATGAGAGAGTTC

AACAGCTACAAGCAGCGCGTGAAGTACGTGGAGGACAAGGTGGTGGACCCC
 CTGC CCCCCTACCT
 GAAGGGCCTGGACGACCTGATGAGCGGACTCGGGGCTGCTGGAAAGGCCTG

AGGATCC. El fragmento *HindIII*-*Clal* de 1970 bp y el ADN de PCR restringido con
 5 *Clal* y *BamHI* fueron ligados conjuntamente en el vector pTT5 (NCR, Canadá),
 entre los sitios de clonación *HindIII* y *BamHI* con el fin de generar el vector de
 expresión final, pTT5-gB-SLP12-Delta725. Después de la verificación de
 secuencia a través de secuenciación automática de ADN, el plásmido
 recombinante, pTT5-gB-SLP12-Delta725, se utilizó para transfectar pasajeramente
 10 células CHO-S. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP12-Delta725
 se muestra en SEC ID NO: 9.

1.6 gB-SLP12-Delta725-LVL759

Esta variante codifica para una proteína con una longitud de 683
 15 aminoácidos. La secuencia de aminoácido completa de gB-SLP12-Delta725-
 LVL759 se da en SEC ID NO: 14.

1.6 Construcción del vector de expresión pTT5-AD169-Delta725-LVL759

El plásmido pTT5-gB-SLP12-Delta725-RR-líder2 fue mutado utilizando el
 20 equipo QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis de Stratagene (No. 200522)
 y el iniciador CAN1498 5'-gtgcatcgtgtgcctgggatccgaggccgtgagccacagg-3' y CAN
 1499 5'-cctgtggctcacggcctcgatcccaggcacacgatgcac-3' dando como resultado el
 plásmido intermediario, pTT5-694-13. Este plásmido intermediario fue mutado

utilizando el mismo equipo QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis y el iniciador CAN1650 5'-

gtgaacctgtgcatcgtgtgcctggccctggccagccaccgggccaacgagacaa-3' y CAN1651 5'-
ttgtctcgttggcccgggtggctggccagggccaggcacacgatgcacaggtcac-3' dando como

5 resultado el vector de expresión final, pTT5-gB-SLP12-725-LVL759. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP12-Delta725-LVL759 se muestra en SEC ID NO: 13.

1.7 gB-SLP12-Delta725-LVL776

10 Esta variante codifica para una proteína con una longitud de 683 aminoácidos. La secuencia de aminoácido completa de la variante gB-SLP12-Delta725-LVL776 se da en SEC ID NO: 16.

15 1.7 Construcción del vector de expresión pTT5-AD169-Delta725-LVL776

El plásmido intermediario anterior, pTT5-694-13, fue mutado utilizando el mismo equipo QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis y los iniciadores CAN1648 5'-cctgtgcatcgtgtgcctgggagccctggccagccaccgggccaacgagacaatc-3' y CAN1649 5'-gattgtctcgttggcccgggtggctggccagggctcccaggcacacgatgcacagg-3' dando

20 como resultado un plásmido intermediario adicional, pTT5-LVL758-1. Esta plásmido intermediario fue mutado utilizando el mismo equipo QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis y los iniciadores CAN1697 5'-
tgggtgtcgtgaacctgtgcatcgtgtcctgggagccctggcccaccgggccaacgagacaatctac-3' y

CAN1698

5'-

gtagattgtctcggttgccccgggtggccaggggtcccaggagcacgatgcacaggttcacgcacacca-3'

dando como resultado el vector de expresión fina pTT5-gB-SLP12-Delta725-LVL776. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP12-Delta725-

5 LVL759 se muestra en SEC ID NO: 15.

1.8 **gB-SLP12-Delta725-CD33**

La variante, gB-SLP12-Delta725-CD33, codifica para una proteína con una longitud de 677 aminoácidos. Esta construcción es casi idéntica a la construcción gB-SLP12-Delta725, excepto que la parte N-terminal del gen gB, que abarca los nucleótidos 1 a 192 (la secuencia de señal y los primeros 64 aminoácidos de la proteína gB madura), fueron reemplazados con la secuencia de señal de CD33 (Taylor et al. 1999, Vol. 274, No. 17: p 11505-11512). La secuencia de aminoácido completa de la variante gB-SLP12Delta725-CD33 se da en SEC ID NO: 18.

15

1.8.1 **Construcción del vector de expresión pTT5-gB-SLP12-Delta725-CD33**

El gen, gB-SLP12-Delta725-CD33, se construyó a través de amplificación de PCR utilizando el plásmido pTT5-gB-SLP12-Delta725 como una plantilla y los

iniciadores CD33 (SEC ID NO: 27) (5'-

20 AATCAAAAGCTTACTAGTGCCGCCACCATGGCCCCCTGCTGCTT

CTGCTGCCCCTGCTTTGGGCAGGGGCCCTGGCCCACCGGGGCAACG-3') y

CMO578 (SEC ID NO: 28) (5'-

GTAATAGGATCCGGTACCTCATCAGGCCTTTCCAGCAG-3'). El iniciador hacia

adelante contiene el sitio *HindIII* y la secuencia de señal CD33. El iniciador reverso contiene el codón de terminación y el sitio *BamHI*. Después de la restricción con las enzimas apropiadas, el fragmento de PCR fue clonado en el vector pEE14 restringido con *HindIII* y *BglIII*. El plásmido recombinante pEE14-gB-SLP12-Delta725-CD33 fue seleccionado después de la verificación de secuencia. Finalmente, el gen gB-SLP12-Delta725-CD33 fue sub-clonado en el vector pTT5 como sigue. La secuencia de codificación fue amplificada por PCR utilizando el vector pEE14-gB-SLP12-Delta725-CD33 como una plantilla y los iniciadores CD33F (SEC ID NO: 29) (5'-AATCAAAAGCTTACTAGTGCCGCCACCATGGCCCCC TGCTG-3') y Ecto-Rv (SEC ID NO: 30) (5'-GACTTATAGGATCCTCATCAGTGGTGGTGATGATGGTGGCCGCCGGCCTTTC CAGCAGC-3'). Los iniciadores hacia adelante y reverso contienen los sitios de clonación *HindIII* y *BamHI*, respectivamente. El ADN amplificado y el vector pTT5 fueron restringidos con *HindIII* y *BamHI*, antes de la ligación. El vector de expresión pTT5-gB-SLP12-Delta725-CD33 resultante, después de la verificación de secuencia, se utilizó para transfectar pasajeramente células CHO-S. La secuencia de nucleótido que codifica para gB-SLP12-Delta725-CD33 se muestra en SEC ID NO: 17.

20

Ejemplo 2: Expresión de polipéptidos gB de CMV

Las diferentes construcciones de ADN descritas anteriormente fueron pasajeramente transfectadas en células CHO (Ovario de Hámster Chino),

utilizando el sistema de expresión FreeStyle™ MAX CHO de Invitrogen. La construcción que codifica el polipéptido gB-Delta™ se utilizó como un control. La secuencia de aminoácido de gB-Delta™ se muestra en SEC ID NO: 2. El vector de expresión usado para la expresión de gB-Delta™ fue pMax-AD169. El sistema

5 FreeStyle™ MAX CHO utiliza la línea de célula CHO-S, un sub-clon separado de la línea de célula CHO-K1 común se adaptó a suspensión y un polímero a base de lípido catiónico sintético como reactivo de transfección. El ADN de plásmido para transfección se aisló utilizando el equipo Qiagen Maxiprep (Qiagen, Valencia, CA) siguiendo el protocolo del fabricante. El complejo de transfección se preparó como

10 se recomendó por Invitrogen. En resumen, 37.5 µg de plásmido y 37.5 µl de reactivo de transfección FreeStyle MAX se diluyeron en forma separada en 0.6 ml de un medio Opti-Pro™. Justo después, el reactivo de transfección FreeStyle MAX diluido se agregó a la solución de ADN diluido. La mezcla de ADN-FreeStyle MAX se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente antes de agregarse al

15 cultivo de célula. Los cultivos transfectados se incubaron a 37°C durante 3 días. Después, los cultivos se mantuvieron a 29°C durante un período de otros 3 días. En el día 6 después de la transfección, se recolectó 1 ml de cada cultivo de célula comprendiendo las células transfectadas en suspensión así como el medio de cultivo de célula. Los sobrenadantes de cultivo de célula se separaron de las

20 células suspendidas a través de centrifugación a 12,000 g. Los sobrenadantes se recolectaron y las pellas celulares se solubilizaron con 1 ml de regulador de pH de lisis (PBS suplementado con 1% Triton X-100). El material insoluble se removió de los lisados de célula a través de centrifugación a 12,000 g a 4°C durante 5

minutos. Las alícuotas (15 μ l) de los sobrenadantes de cultivo y fracciones celulares solubilizadas se corrieron en gel Criterion XT 4-12% Bis Tris (Board) utilizando un regulador de pH MOPS. Las proteínas fueron transfectedas a membranas de nitrocelulosa y las membranas se sondearon con el anticuerpo anti-gB, MAb 27-156 (Spaete et al., 1990). Alternativamente, la expresión y el nivel de secreción fueron detectados a través del análisis Elisa utilizando un anticuerpo anti-gB. El ensayo se realizó en placas de 96 cavidades. Las placas se recubrieron con un anticuerpos anti-gB policlona (el anticuerpo se produjo al inyectar el polipéptido gB++ -descrito en EP0759995- en conejos). Después de un paso de saturación en 3% de leche descremada durante 1 hora a 37°C, el anticuerpo se incubó durante la noche a 4°C. Las cavidades después se lavaron 4 veces. Una serie de diez diluciones dobles de cada muestra a ser probada (sobrenadante y fracciones celulares transfectedas con construcciones de gB dadas) se agregó a las placas recubiertas en presencia de un anticuerpo anti-gB monoclonal (el anticuerpo se produjo inyectando ratones con un virus entero de CMV), el cual se conjugó con biotina durante 2 horas a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 0.1%, se agregaron 100 μ l de estreptavidina-peroxidasa de rábano y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 0.1% y una vez con agua. Después, las placas se incubaron durante 10 minutos a 37°C con 100 μ l de tetra-metil-bencidina 75% (TMB) en 0.1 M de regulador de pH de citrato, pH 5.8 (25%). Esta reacción se detuvo con 100 μ l de H₂SO₄ 0.4N y se leyó la colorimetría en un espectrofotómetro a 450/620 nm. Un lote previo de gB-DeltaTM purificado cuya concentración es conocida, se utilizó

como un estándar en este experimento. Al utilizar el software SoftMax Pro, la concentración de cada muestra a ser probada se cuantificó.

5 **2.1 Expresión y secreción de gB-SLP12, gB-SLP1 -Del2 y gB-SLP12-Del2 - análisis de tinción Western**

En la Figura 3 se muestra una tinción Western representativa de tres experimentos realizados independientemente. Los carriles A, B, C y D representan las fracciones celulares de los cultivos transfectados con gB-DeltaTM, gB-SLP12, 10 gB-SLP1-Del2 y gB-SLP12-Del2, respectivamente. El nivel de gB presente en dichas fracciones celulares es indicativo del nivel de gB que es intracelular. Los carriles E, F G y H representan los sobrenadantes de los cultivos transfectados con gB-DeltaTM, gB-SLP12, gB-SLP1-Del2 y gB-SLP12-Del2, respectivamente. El nivel de gB presente en dichos sobrenadantes es indicativo del nivel de gB, el cual 15 es secretado. Si se compara el nivel de gB presente en los carriles B, C y D con el nivel de gB presente en el carril A, se observa que el nivel de gB intracelular permanece sin cambio cuando se mutan los bucles de fusión, es decir, los polipéptidos de la invención, según comparado con gB-DeltaTM con bucles de fusión intactos, es decir, el polipéptido de la técnica anterior, sugiriendo que las 20 mutaciones en los bucles de fusión no afectan la secreción. En realidad, si se compara el nivel de gB presente en los carriles F, G, y H con el nivel de gB presente en el carril E, se observa que la expresión de los polipéptidos gB de la invención (con bucles de fusión mutados) y su secreción son al menos tan

eficientes como la expresión y secreción del polipéptido gB de la técnica anterior (gB-DeltaTM con bucles de fusión intactos).

2.2 Expresión y secreción de gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113 y gB-SLP12-Delta725 - ensayo de Elisa

5 La cuantificación de los resultados a través del ensayo de ELISA y representada en la forma de una gráfica se muestra en la Figura 4. Las barras en negro representan las fracciones celulares de cultivos transfectados con gB-DeltaTM, gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113 y gB-Delta725, respectivamente, mientras que las barras en gris representan los sobrenadantes de los mismos

10 cultivos. Por consiguiente, la suma de la barra gris y de la barra negra por variante expresada representa el nivel de expresión total logrado después de la transfección en células CHO. Con respecto a gB-DeltaTM, se observó que dentro de la población del polipéptido expresado, alrededor de la mitad del polipéptido se retiene intracelularmente (barra gris) y alrededor de la mitad del polipéptido es

15 secretado (barra negra). Sorprendentemente, cuando se expresa gB-SLP12, se observó que el nivel de expresión total fue significativamente más alto que para gB-DeltaTM, alrededor de 2 veces. Además, si se compara el nivel respectivo de la forma intracelular y la forma secretada, se observó que más del 80% del polipéptido fue secretado, mientras que solo un 10-20% permaneció intracelular,

20 sugiriendo que gB-SLP12 también fue más eficientemente secretado que gB-DeltaTM. Esto sugiere que la mutación de los bucles de fusión tiene un impacto positivo sobre la expresión y secreción. Similarmente se observó el nivel más alto de expresión y de secreción sobre gB-DeltaTM con los polipéptidos gB-SLP12-

Delta113 y gB-SLP12-Delta725. Sin embargo, sorprendentemente, los dos polipéptidos fueron aún más significativamente expresados que gB-SLP12, más de 2 veces y alrededor de 1.6 veces, respectivamente, sugiriendo que la combinación de la eliminación de al menos parte del dominio citoplásmico con la mutación de bucle de fusión además mejora la expresión, y de esta manera, el rendimiento final de los polipéptidos secretados resultantes.

2.3 Expresión y secreción de gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113, gB-SLP12-Delta725, gB-SLP12 - Papel de los bucles de fusión

En la Figura 5 se muestran tinciones Western. La Figura 5A muestra que gB-SLP12 fue secretado al menos tan eficientemente como gB-SLP12-Delta725, ambos mostrando un nivel de secreción mayor que gB-DeltaTM (comparar carriles F y J con el carril B), confirmando los resultados observados por el ensayo de Elisa. Los carriles M y N representan las fracciones celulares y el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725 teniendo bucles de fusión intactos FL1 y FL2. La ausencia de detección de gB en el sobrenadante de cultivo (ver carril N) sugiere que el buen nivel de expresión/secreción de gB requiere que los bucles de fusión sean mutados. Se hizo una observación similar en la Figura 5B, en donde no se detectó nada de gB en el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-Delta725 teniendo bucles de fusión, FL1 y FL2, intactos, según comparado con el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725 (comparar carriles 6 y 2, respectivamente). El requerimiento de la mutación de los bucles de fusión FL1 y FL2 para lograr una mejor secreción que gB-DeltaTM fue

similarmente observado para los polipéptidos gB-SLP12-Delta113. gB fue escasamente detectable en el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta113 teniendo bucles de fusión FL1 y FL2 intactos, según comparado con el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta113 (comparar carriles 6' y 4', respectivamente).

2.4 Expresión y secreción de gB-SLP12-Delta725, gB-SLP12-Delta725-LVL759, y gB-SLP12-Delta725-LVL776

En la Figura 5C se muestra una tinción Western. El nivel de gB presente en el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725-LVL759 es al menos tan bueno como el nivel de gB presente en el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725 (comparar carriles f y h con los carriles b y d, respectivamente). El nivel de gB presente en el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725-LVL776 es solo ligeramente más bajo que el nivel de gB presente en el sobrenadante de un cultivo transfectado con gB-SLP12-Delta725 (comparar carriles j y l con los carriles b y d, respectivamente). Estos resultados indican que la mutación en la parte N-terminal en los polipéptidos (ver Figura 2) de la invención no impacta significativamente el nivel de secreción de dichos polipéptidos.

20 Ejemplo 3: Perfil de producto de polipéptidos gB de CMV

Se expresaron pasajeramente gB-DeltaTM, gB-SLP12 y gB-SLP1-Del2 en células CHO como se describió en el Ejemplo 2, y los sobrenadantes de cultivo se recogieron en el día 6 después de la transfección. Después de la clarificación, los

sobrenadantes se suplementaron con 350 mM NaCl y 0.4% Empigen y después se filtraron a través de 0.22 µm. Se utilizaron columnas de níquel para purificar los polipéptidos transfectados y secretados de los sobrenadantes de cultivo de célula correspondientes. Se equilibraron 16 columnas XK (Qiagen) con un regulador de pH comprendiendo 10 mM TRIS-HCl, 350 mM NaCl, 10 mM imidazol y 0.4% Empigen pH 8.0. Los sobrenadantes de cultivo de célula, previamente clarificados, suplementados y filtrados, se cargaron a una velocidad de flujo de 4 ml/minuto y las proteínas retenidas se lavaron con el regulador de pH de equilibrio. La elución se realizó a una velocidad de flujo de 4 ml/minuto con un regulador de pH comprendiendo 10 mM TRIS HCl, 350 mM NaCl, 350 mM imidazol y 0.4% Empigen pH 8.0. Las fracciones eluidas después se inyectaron a una velocidad de flujo de 2 ml/minuto en 26 columnas 26 (GE) equilibradas con un regulador de pH comprendiendo 10 mM de regulador de pH de fosfato (K) y 0.4% Empigen pH 7.2. El primer pico de proteína fue cosechado para análisis adicional. Las fracciones diluidas que corresponden a este pico después se cargaron en columnas de sulfato de celulosa (Chisso Corporation) equilibradas con un regulador de pH comprendiendo 10 mM de regulador de pH de fosfato (K) y 0.4% Empigen pH 7.2. La elución se realizó a una velocidad de flujo de 3 ml/minuto con un regulador de pH comprendiendo 5 mM fosfato (K), 1 M NaCl y 0.1% Pluronic F68 pH 7.2. Los polipéptidos purificados que resultan del procedimiento de purificación anterior después fueron sometidos a los siguientes experimentos.

3.1 Experimentos de entrelazamiento con glutaraldehído

Directamente se agregó glutaraldehído a 15 μ l de cada polipéptido purificado (correspondiendo a aproximadamente 7 μ g de proteína total) con el fin de obtener una concentración final de glutaraldehído de 0.5% y 1%. Como un control, una muestra de cada polipéptido purificado se dejó sin glutaraldehído. Las
5 mezclas se dejaron incubar durante 150 minutos y, después, la reacción de glutaraldehído se detuvo al agregar NaBH₄ (Aldrich) y las muestras se incubaron en hielo durante 20 minutos. Las muestras después se corrieron en el gel Criterion XT 4-12% Bis Tris (Biorad) utilizando el regulador de pH MOPS. El gel se tiñó con azul de Coomassie R-250 y se muestra en la Figura 9.

10

Resultados

Si están presentes multímeros de polipéptidos en las muestras antes de ser tratadas con glutaraldehído, luego los multímeros de cualquier tamaño dado, ya sea dímeros, trímeros, o cualquier otro multímero de peso molecular alto, se
15 entrelazaron y, de esta manera, se mantuvieron como tales cuando emigraron en un gel en condiciones de desnaturalización. Por consiguiente, dichos multímeros emigraron de acuerdo con su peso molecular. En forma contraria, con muestras de control que no fueron tratadas con glutaraldehído, cualquier multímero presente en dicha muestra fue desnaturalizado en monómeros cuando emigran en un gel en
20 condiciones de desnaturalización, de manera que los polipéptidos en las muestras de control emigraron de acuerdo con el peso molecular equivalente a un monómero del polipéptido (ver una banda individual, un bit menor que 150 kDa en los carriles A, D y G). Si se considera el perfil de multímero de gB-DeltaTM

(carriles A, B y C), se observan 2 bandas de peso molecular muy alto (indicado por las flechas) en las muestras tratadas con glutaraldehído. También se muestra que estas dos bandas son de la misma intensidad, sugiriendo que la muestra de gB-DeltaTM comprende la mayoría de los dos tipos de multímeros y que la proporción de cada multímero dentro de la muestra debe ser casi igual. De lo contrario, cuando se considera el perfil de gB-SLP12, en particular, carriles E y F, en donde las muestras se trataron con glutaraldehído, mientras que también se observaron dos bandas de peso molecular alto, la intensidad de cada banda es significativamente diferente. En realidad, la intensidad de la banda de peso molecular más bajo es al menos 3-5 veces más fuerte que la más alta, sugiriendo que la población de multímero de peso molecular más bajo dentro de la muestra de gB-SLP12 es mucho mayor que la población del multímero de peso molecular más alto. Se hizo una observación similar cuando se consideró la muestra de gB-SLP12-Del2 (carriles G, H e I), en donde la intensidad de la banda más baja es alrededor de 2-3 veces más fuerte que la intensidad de la banda más alta. Esto sugiere que gB-SLP12 y gB-SLP1-Del2 tienen un perfil de multímero similar con una proporción enriquecida de los multímeros de peso molecular más bajo, que es diferente de gB-DeltaTM, el polipéptido de la técnica anterior. Se observa que el gel utilizado en ese experimento no proporciona una resolución lo suficientemente buena para determinar si las bandas de peso molecular más bajo observadas en los carriles con relación a gB-DeltaTM son del mismo tamaño como las observadas en los carriles con relación a gB-SLP12 y gB-SLP1-Del2. Por la misma razón, no es posible determinar con precisión el tamaño real de cada banda, por lo

que la identificación de los multímeros observados como dímeros o trímeros, etc., a partir de ese experimento es difícil. Con el fin de obtener esta información, se realizaron los dos siguientes experimentos con los polipéptidos purificados.

5 **3.2 Ultracentrifugación analítica - gB-DeltaTM, gB-SLP12, gB-SLP1 -Del2**

Se utilizó ultracentrifugación analítica (AUC) para determinar la homogeneidad y distribución de tamaño en solución de las diferentes especies (por ejemplo, multímeros de diferentes tamaños de un polipéptido purificado al cual se agrega) dentro de una muestra de polipéptido purificado al medir la
10 velocidad a la cual las moléculas se mueven en respuesta a una fuerza centrífuga. Esto se basa en el cálculo del coeficiente de sedimentación de las diferentes especies que se obtuvieron mediante un experimento de velocidad de sedimentación, que depende de su forma molecular y masa. Después de la purificación, gB-DeltaTM, gB-SLP12 y gB-SLP1-Del2 re-suspendidos en 10 mM
15 fosfato de sodio, 1 M BaCl y 0.1% Pluronic, pH 7.2, se hicieron girar en una ultracentrífuga analítica Beckman-Coulter ProteomeLab XL-1 a 28 000 rpm después de que el rotor AN-60Ti se equilibró a 15°C. Para la recolección de datos, se registraron 160 escaneos a 280 nm y 230 nm cada 5 minutos. Se realizó un análisis de datos utilizando el programa SEDFIT para la determinación de la
20 distribución C(S). La determinación del volumen específico parcial de las proteínas se realizó con el software SEDNTERP a partir de una combinación de su secuencia de aminoácido y de su composición esperada de glicano. También se utilizó, SEDNTERP para determinar la viscosidad y la densidad del regulador de

pH, descuidando la contribución del Pluronic F68, el cual no está representado en la base de datos de este software. Los resultados se presentan en la forma de una gráfica que muestra la concentración de cada especie graficada contra peso molecular. La determinación de la abundancia relativa de todas las especies ha sido realizada al considerar el área total bajo la curva de toda la distribución como 100% de la muestra al calcular el porcentaje de esta área total representada por la contribución de cada especie.

10 **Resultados**

La Figura 10 presenta exitosamente el perfil de gB-DeltaTM, gB-SLP12 y gB-SLP1-Del2 purificados según analizados a través de ultracentrifugación analítica. La gráfica que corresponde a la muestra gB-DeltaTM indica una distribución heteróloga representada por una pluralidad de picos. En particular, la población principal observada en dicha muestra son las especies de 417 kDa (35%) y 723 kDa (30%), las cuales probablemente representan trímeros y hexámeros, respectivamente. Dentro de dicha muestra también se presentan multímeros de peso molecular más alto. De forma contraria, cuando los bucles de fusión FL1 y FL2 fueron mutados, el perfil del polipéptido gB-SLP12 purificado correspondiente indica una población más homogénea, ya que la población principal es una especie de 327 kDa (63%), la cual es muy probable que represente trímeros. La presencia de multímeros de peso molecular más alto es escasamente notoria. Se observó un perfil similar en la muestra de gB-SLP1-Del2,

en donde la población principal es una especie de 311 kDa (67%), la cual es muy probable que represente trímeros también, mientras que la presencia de multímeros de peso molecular más alto es solo marginal.

En conclusión, los polipéptidos gB de la invención (gB-SLP12 y gB-SLP1-Del2) presentan un perfil mejorado de producto, ya que la población de trímeros se incrementa en un factor de aproximadamente 2 veces, según comparado con la población de trímero del polipéptido gB de la técnica anterior (gB-Delta TM).

3.3 Ultracentrifugación Analítica - gB-SLP12-Delta725, gB-SLP12-Delta113

Se realizó ultracentrifugación analítica como se describió anteriormente en la sección 3.2 para determinar la homogeneidad y la distribución de tamaño en solución de las diferentes especies dentro de los polipéptidos purificados gB-SLP12-Delta725 y gB-SLP12-Delta113. Los polipéptidos fueron recombinantemente expresados como se describe en el Ejemplo 2 y se purificaron como se describió en el primer párrafo del Ejemplo 3 de la presente. Después de la purificación, gB-SLP12-Delta725 y gB-SLP12-Delta113 cada uno se volvieron a suspender ya sea en un regulador de pH comprendiendo 0.1% Pluronic o en un regulador de pH sin Pluronic.

Resultados

La Figura 11A exitosamente muestra el perfil del polipéptido gB-SLP12-Delta113 purificado según analizado a través de ultracentrifugación analítica en presencia o ausencia de 0.1% Pluronic, el perfil observado fue similar al perfil observado para gB-SLP12 y gB-SLP12-Del2 en la Figura 10, con una población

similar al 72% representando trímeros dentro de la población del polipéptido purificado, es decir, un perfil mejorado de producto según comparado con el polipéptido gB de la técnica anterior (gB-DeltaTM). Sin embargo, en presencia de Pluronic, el porcentaje de trímeros se redujo con un incremento concomitante del porcentaje de monómeros (25%) y la presencia de multímeros de un tamaño de
5 alrededor de 230 kDa. Esta tendencia del polipéptido gB-SLP12-Delta113 a monomerizarse en presencia de Pluronic es indicativa de una susceptibilidad a detergente.

La Figura 11B exitosamente presenta el perfil del polipéptido purificado gB-SLP12-Delta725 según analizado a través de ultracentrifugación analítica en
10 presencia o ausencia de 0.1% Pluronic. El perfil observado con este polipéptido purificado es similar si está o no presente Pluronic. En realidad, el porcentaje de trímeros en ambos casos es alrededor de 70%, es decir, tan alto como el porcentaje de trímero observado con los polipéptidos gB-SLP12 y gB-SLP12-Del2, y de esta manera, gB-SLP12-Delta725 también presenta un perfil mejorado de
15 producto según comparado con el polipéptido gB de la técnica anterior (gB-DeltaTM).

Conclusión

20 Aunque tanto gB-SLP12-Delta113 como gB-SLP12-Delta725 muestran un perfil mejorado de producto, con una proporción enriquecida de trímeros, los resultados obtenidos indican que gB-SLP12-Delta725 presenta la ventaja adicional de tener una estabilidad estructural mejorada en solución, ya que su perfil de

trímero es mantenido en presencia o ausencia de Pluronic. En realidad, un tratamiento detergente no presentó un impacto observable en las propiedades de sedimentación de ese polipéptido.

5

3.4 Cromatografía de exclusión de tamaño

El tamaño de proteína de gB-DeltaTM y gB-SLP12 también se determinó a través de cromatografía de exclusión de tamaño utilizando un detector UV a 280 nm y una columna TKS G5000PWXL (Tosoh Bioscience). Las muestras se cargaron a temperatura ambiente a una velocidad de flujo de 0.5 ml/minuto. La elución se realizó con PBS + 0.1% Pluronic a la misma velocidad de flujo y a temperatura ambiente. Para la calibración se utilizaron Tiroglobulina (669 kDa), ferritina (440 kDa), catalasa (232 kDa), aldolasa (158 kDa), albúmina (68 kDa), conalbúmina (75 kDa), ovoalbúmina (43 kDa), anhidrasa carbónica (29 kDa), y ribonucleasa (13.7 kDa).

15

Resultados

Como se muestra en la Figura 13, gB-SLP12 tiene un tamaño de 357 kDa, según medido a través de cromatografía de exclusión de tamaño, que probablemente es para representar la forma trimérica. Dos polipéptidos de la técnica anterior, gB-DeltaTM y gB-S50-DeltaTM, es decir, los polipéptidos con bucles de fusión intactos, tienen un tamaño similar de 710 kDa, que representan multímeros de peso molecular más alto. Estos resultados confirman los resultados

20

anteriores obtenidos con ultracentrifugación analítica ya que los polipéptidos de la invención (gB-SLP12) tienen un perfil de producto distinto a los polipéptidos de la técnica anterior (gB-DeltaTM).

5

Ejemplo 4: Sujeción C-terminal de polipéptidos gB-SLP12

4.1 Expresión y purificación

Los polipéptidos gB-DeltaTM, gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113 y gB-SLP12-Delta725 fueron pasajeramente transfectados y expresados como se describió en el Ejemplo 2. Los polipéptidos gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113 y gB-SLP12-Delta725 se purificaron como se describe en el primer párrafo del Ejemplo 3. Después de la recolección en el día 6 después de la transfección, el sobrenadante gB-DeltaTM se suplementó con Bis-Tris y Empigen BB para alcanzar la concentración final de 20 mM y 0.4%, respectivamente. Después se cargó en una columna Q-Sepharose (GE Healthcare) equilibrada en un regulador de pH comprendiendo 20 mM Bis-Tris - 0.4% Empigen BB, pH 6.0. El polipéptido unido se eluyó a partir de la columna con una mezcla de 75% del regulador de pH comprendiendo 20 mM Bis-Tris - 0.4% Empigen BB, pH 6.0 y 25% del regulador de pH comprendiendo 20 mM Bis-Tris - 0.4% Empigen BB, 1 M NaCl, pH 6.0. El producto eluido después se suplementó con fosfato de sodio para alcanzar una concentración final de 10 mM y se ajustó a un pH 6.8. Después se cargó en una columna de hidroxapatita de tipo II (Bio-Rad) equilibrada en un regulador de pH

comprendiendo 10 mM fosfato de sodio - 0.4% Empigen BB - 0.25 M NaCl, pH 6.8. El flujo pasado que contiene el polipéptido se recuperó y se cargó en una columna de Sulfato de Celufina (JNC Corporation) equilibrada en un regulador de pH comprendiendo 10 mM fosfato de sodio - 0.4% Empigen BB - 0.25 M NaCl, regulador de pH, pH 6.8. El flujo pasado conteniendo el polipéptido se recuperó, se concentró a través de ultrafiltración utilizando una membrana de 10 kD Pellicon (Millipore), y se cargó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) equilibrada en un regulador de pH comprendiendo 10 mM fosfato de sodio - 4.0% Empigen BB, pH 7.2. El producto eluido se recolectó, se concentró y se le realizó diafiltración con 10 mM fosfato de potasio, pH 7.2.

4.2 Análisis de tinción Western

Los polipéptidos purificados anteriores se desglicosilaron utilizando el equipo de desglicosilación de N-glicosidasa F (Roche, No. 11836552001) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las cantidades equivalentes de cada uno de los polipéptidos desglicosilados purificados se corrieron en el gel Criterion XT 4-12% Bis Tris (Biorad) utilizando el regulador de pH, MOPS. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y a las membranas se les puso una sonda ya sea con al anticuerpo anti-gB MAb 27-156 (Spaete et al., Virology 167, 207-225 (1988) (FIG. 14A, FIG. 14B, carril 3, FIG. 14C, carriles B, y FIG. 14D, carril D) o el anticuerpo de etiqueta His anti-6X (Abeam, No. ab9108) (FIG. 14B, carril 2, FIG. 14C, carriles A, y FIG. 14D, carril C).

Resultados

La Figura 14A muestra que el anticuerpo anti-gB reconoce dos diferentes formas en la población del polipéptido gB-DeltaTM purificado, sugiriendo que el polipéptido existe en al menos dos formas de diferentes tamaños, 92 kDa y 80 kDa, respectivamente, en la población purificada. Con base en el valor medio del peso molecular de un aminoácido (110 Da), el peso molecular de gB-DeltaTM, el cual comprende 830 aminoácidos, debe ser de alrededor de 91 kDa. Por lo tanto, la banda de 92 kDa probablemente corresponde al polipéptido gB-DeltaTM de longitud completa, mientras que la banda de 80 kDa es probable que corresponda a una versión más corta del polipéptido, sugiriendo que dentro de la población, se producen algunos polipéptidos que son productos de escisión y de sujeción de alrededor de 80 kDa.

La Figura 14B muestra que, después de la expresión recombinante del polipéptido gB-SLP12 en células, el anticuerpo anti-gB (carril 3) proporciona un perfil idéntico que reconoce dos formas de tamaños similares, 92 kDa y 80 kDa, respectivamente, sugiriendo que ocurrió una escisión similar en este polipéptido. Se observa aquí que el peso molecular esperado de gB-SLP12 también está alrededor de 92 kDa, ya que el número de aminoácidos es igual al de gB-DeltaTM. Cuando se aplica una sonda a la membrana con un anticuerpo de etiqueta anti-His (carril 2), solo se detectó la banda a alrededor de 92 kDa. Ya que la etiqueta His está ubicada en el extremo C-terminal del polipéptido, estos datos sugieren que la escisión ocurre en la parte C-terminal del polipéptido, y genera de esta manera un fragmento de 80 kDa faltando el extremo C-terminal.

La Figura 14C muestra que, después de la expresión recombinante del polipéptido gB-SLP12-Delta113 en células, el anticuerpo anti-gB (carril B) solo reconoce una banda (a alrededor de 80 kDa). Ya que gB-SLP12-Delta113 comprende 717 aminoácidos, entonces se espera que el peso molecular medio
5 deba ser alrededor de 79 kDa. Por lo tanto, la observación de una banda solo alrededor de 80 kDa indica que la población de este polipéptido purificado se hace solo del polipéptido de longitud completa, sugiriendo que la escisión previamente observada en la parte C-terminal ya no ocurre más en esta población de polipéptidos. Esto fue confirmado al sondear la membrana con un anticuerpo de
10 etiqueta anti-His (carril A) y al observar una banda idéntica a alrededor de 80 kDa, indicando que el extremo C-terminal del polipéptido está presente.

Se puede sacar una conclusión similar de la tinción de Western presentada en la Figura 14D con relación al polipéptido gB-SLP12-Delta725. El carril D representa la membrana con sonda con un anticuerpo anti-gB que reconoce solo
15 una banda (a alrededor de 80 kDa). El peso molecular medio expresado de este polipéptido que comprende 824 aminoácidos debe ser de alrededor de 79 kDa también. El carril C representa la membrana con sonda con un anticuerpo de etiqueta anti-His y similarmente reconoce solo una banda a alrededor de 80 kDa, indicando que el extremo C-terminal del polipéptido está presente.

20 Los polipéptidos pueden precipitarse en el curso de la desglicosilación, lo cual puede dar como resultado una desglicosilación incompleta. Algunos polipéptidos permanecen en su forma glicosilada, dichas formas típicamente emigran en el gel en una forma difusa, tal como se observa para los polipéptidos

gB-SLP12-Delta113 y gB-SLP12-Delta725 en tinciones Western presentadas en las Figuras 14C y 14D.

Conclusión

- 5 Los datos presentados en la Figura 14 muestran que la sujeción que ocurre con los polipéptidos gB-DeltaTM y gB-SLP12 en la parte C-terminal del polipéptido no ocurre cuando al menos parte del dominio citoplásmico es eliminado.

Ejemplo 5: Heterogeneidad N-terminal de gB-Delta725 de polipéptidos

- 10 Como se muestra en la Figura 12A, el polipéptido gB-SLP12-Delta725 de CMV, cuando se expresa recombinantemente en células, da como resultado una población de polipéptidos maduros que son heterogéneos en el extremo N-terminal. En realidad, la peptidasa de señal parece dividirse fuera de la secuencia de señal en diferentes posiciones de aminoácido, como se indica. Este fenómeno
15 también es denominado como “bamboleo” de peptidasa de señal.

5.1 Expresión y purificación

- Los polipéptidos gB-SLP12-Delta725, gB-SLP12-Delta725-LVL759, gB-SLP12-Delta725-LVL776 y gB-SLP12-Delta725-CD33 que contienen la etiqueta
20 His, como se describe en el Ejemplo 1, fueron recombinantemente expresados como se describe en el Ejemplo 2. En el día 6 después de la transfección, los sobrenadantes de cultivo se recolectaron. Se agregó un coctel de inhibidor de proteasa libre de EDTA (Roche, No. 11873580001) a los sobrenadantes, y se

ajustó la concentración de NaCl a 500 mM, y el pH final a 8.3. Se empacó IMAC Sepharose 6 FF (GE Healthcare) en columnas de vidrio con un diámetro de 5 cm (Waters). Las columnas se equilibraron con 5 volúmenes de columna de regulador de pH de unión (10 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 8.3). Los
5 sobrenadantes se cargaron en las columnas equilibradas a una velocidad de flujo de 10 ml/minuto. El material no unido se lavó con dos volúmenes de columna del regulador de pH de unión anterior. Se cosecharon fracciones de 50 ml. Las columnas además se lavaron con dos volúmenes de columna adicionales del regulador de pH anterior. Se cosecharon fracciones de 10 ml. Las proteínas
10 unidas a las columnas se eluyeron con 6 volúmenes de columna de regulador de pH de elución (Tris, 500 mM NaCl, 350 mM imidazol, pH 8.30). Se cosecharon fracciones de 10 ml. las fracciones se cargaron en un gel de SDS-PAGE y se combinaron fracciones positivas y se concentraron con el dispositivo de ultrafiltración Centricon (Millipore). La proteína concentrada se cuantificó a través
15 del ensayo calorimétrico de Lowry modificado por ODCB (Biorad). Se desglicosilaron de 5 a 10 µg de la proteína purificada utilizando el equipo de desglicosilación N-Glycosidase F (Roche No. 11836552001) siguiendo las instrucciones del fabricante. La proteína desglicosilada se precipitó a través de un reactivo de precipitación RDCB (Biorad), se volvió a suspender en SDS-PAGE
20 reduciendo la carga de regulador de pH y se cargó en SDS-PAGE. La banda de proteína que emigra a la posición correspondiente a la proteína desglicosilada se cortó para la digestión trípica y análisis de mapeo de péptido MS/MS.

5.2 Digestión de tripsina

Las piezas de gel conteniendo la proteína purificada se deshidrataron con acetonitrilo (ACN). Las proteínas se redujeron al agregar el regulador de pH de reducción (10 mM DTT, 100 mM bicarbonato de amonio) durante 30 minutos a 40°C, y se alquilaron al agregar el regulador de pH de alquilación (55 mM yodoacetamida, 10 mM bicarbonato de amonio) durante 20 minutos a 40°C. Las piezas de gel después se deshidrataron adicionalmente y se lavaron a 40°C al agregar ACN durante 5 minutos antes de desechar todos los reactivos. Las piezas de gel después se secaron durante 5 minutos a 40°C y después se volvieron a hidratar a 4°C durante 40 minutos con la solución de tripsina (6 ng/μl de grado de secuenciación de tripsina de Promega, 25 mM bicarbonato de amonio). Se realizó la digestión de proteína a 58°C durante 1 hora y se detuvo con 15 μl de una mezcla de 1% ácido fórmico y 2% ACN. El sobrenadante se transfirió a una placa de 96 cavidades y la extracción de los péptidos digeridos con tripsina se realizó con dos pasos de extracción de 30 minutos a temperatura ambiente utilizando el regulador de pH de extracción (1% ácido fórmico y 50% ACN). Todos los péptidos extraídos se combinaron en la placa de 96 cavidades y después se secaron por completo en una centrifuga a vacío. La placa se selló y se almacenó a -20°C hasta procesarse más al análisis LC-MS/MS.

20

5.3 Espectroscopia de Masas

Antes del análisis de LC-MS/MS, los péptidos extraídos se volvieron a solubilizar bajo agitación durante 15 minutos en 12 μl de 0.2% de ácido fórmico y

después se centrifugó a 2000 rpm durante 1 minuto. La columna LC es una columna de fase inversa C18 empacada con una celda de empaque a alta presión. Se empacó un capilar de sílice fusionado i.d. de 75 µl con una longitud de 100 mm con un material de fase inversa C18 Jupiter 5 µm300 Å (Phenomex). Esta
5 columna se instaló en un sistema nano LC-2D (Eksigent) y se acopló a LTQ Orbitrap (ThermoFisher Scientific). Los reguladores de pH usados para cromatografía fueron 0.2% ácido fórmico (regulador de pH A) y 100% ACN/0.2% ácido fórmico (regulador de pH B). Durante los primeros 12 minutos, se cargaron 5 µl de la muestra en la columna con un flujo de 650 nL/minuto y, subsecuentemente,
10 el gradiente va de 2-80% de regulador de pH B en 20 minutos y después de regreso a 2% de regulador de pH B durante 10 minutos. La adquisición de datos de LC-MS/MS se logró utilizando un ciclo de evento de 4 escaneos compuesto de una MS de escaneo completo para 1 evento de escaneo adquirido en el Orbitrap.

15 **Resultados**

La Figura 12 muestra el resultado de la evaluación cuantitativa de “bamboleo” de peptidasa de señal que ocurre en el sitio de escisión de la secuencia de señal de los diferentes polipéptidos probados. El bamboleo de la peptidasa de señal conduce a la generación de varias formas de polipéptidos
20 maduros empezando con un aminoácido diferente en su extremo N-terminal dentro de cada población del polipéptido indicado.

La Figura 12A muestra que, después de la digestión triptica del extracto total de proteína, seguido por la cuantificación relativa de los péptidos resultantes

comprendiendo el extremo N-terminal a través de MS/MS, se observó que la población del polipéptido gB-SLP12-Delta725, después de la escisión de la secuencia de señal, estuvo principalmente presente en solución como cinco formas diferentes de polipéptido en una proporción relativamente equivalente (variando de aproximadamente 10% a aproximadamente 30%), cada una empezando con un aminoácido diferente, como se indica.

Las Figuras 12B y 12C muestran un análisis similar de la cuantificación relativa de MS/MS de las diferentes formas de los polipéptidos presentes en la población de gB-SLP12-Delta725-LVL759 y gB-SLP12-Delta725-LVL776, respectivamente. Se observó que la población de esos dos polipéptidos, después de la escisión de la secuencia de señal, estuvo principalmente presente en solución como una forma principal de polipéptido en un porcentaje mayor que 99%, empezando con el aminoácido en la posición 23 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 14, y con el aminoácido en la posición 24 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 16, respectivamente. Los dos sitios de escisión alternativos divididos por la peptidasa de señal y generando dos formas de polipéptido adicionales que tienen un aminoácido distinto en el extremo N-terminal representado tan pequeño como 1% dentro de la población respectiva de polipéptidos.

La Figura 12D muestra un análisis similar de la cuantificación relativa de MS/MS de las diferentes formas de los polipéptidos presentes en la población del polipéptido gB-SLP12-Delta725-CD33. Se observó que esta población, después de la escisión de la secuencia de señal, estuvo principalmente presente en

solución como una forma principal de polipéptido en un porcentaje mayor que 99%, empezando con el aminoácido en la posición 18 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 18. El otro sitio de escisión dividido por la peptidasa de señal y generando una forma de polipéptido adicional que tiene un aminoácido diferente en el extremo N-terminal representó tan poco como menos de 1% dentro de la población del polipéptido gB-SLP12-Delta725-CD33.

Conclusión

Esos resultados indican que el bamboleo ya no ocurrió más en los polipéptidos gB-SLP12-Delta725-LVL759, gB-SLP12-Delta725-LVL776, y gB-SLP12-Delta725-CD33, ya que la peptidasa de señal consistentemente reconoció solo un sitio de escisión principal. Esto sugiere que las modificaciones hechas a la secuencia de señal y a la secuencia líder del polipéptido gB tienen un impacto positivo significativo en la heterogeneidad de la población de polipéptido maduro, haciendo dichas poblaciones homogéneas a un grado mayor que 99%.

Ejemplo 6: Inmunogenicidad de composiciones inmunogénicas conteniendo polipéptidos gB de CMV ilustrativos de la invención

La inmunogenicidad de las composiciones inmunogénicas que contienen los siguientes polipéptidos que comprenden una etiqueta His C-terminal y que se expresan y se purifican como se describe en la sección, se probaron gB-DeltaTM, gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113, gB-SLP12-Delta725, LVL759, LVL776 y CD33, como sigue.

6.1 Diseño de experimento

Se vacunaron grupos de diez ratones C57BL/6 con dos dosis en 21 días de intervalo con las composiciones inmunogénicas ilustrativas anteriores, como se indica en el Cuadro 1. Las inmunizaciones se hicieron intramuscularmente (1.5 µg de cada polipéptido gB ayudado con el sistema auxiliar ASA comprendiendo 2.5 µg de 3D-MPL y 2.5 µg de QS21 en una formulación liposomal en un volumen total de 50 µl).

10 Cuadro 1 - Grupos de Estudio

	Grupos/Polipéptidos	Concentración (µg/ml)	Arginina (mM)
	1. gB-DeltaTM*	442 µg/ml	346
	2. gB-SLP12*	987 µg/ml	600
	3. gB-SLP12-Delta113*	304 µg/ml	321
	4. gB-SLP12-Delta725*	718 µg/ml	366
15	5. CD33*	256 µg/ml	370
	6. LVL759**	460 µg/ml	348
	7. LVL776**	460 µg/ml	348

* Regulador de pH de polipéptido: 10 mM Fosfato K/K2 Regulador de pH - 500 mM NaCl - pH 8 + Arginina

20 ** Regulador de pH de polipéptido: 10 mM Tris - 500 mM NaCl - pH 8.3 + Arginina

La inmunogenicidad se evaluó al analizar las respuestas inmunes

humorales a la vacunación, según medido a través de un ensayo de neutralización (NT) y ELISA (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) 21 días después de inmunización, 1 y 14 días después de inmunización 2 (ver sección 6.3 y 6.4, respectivamente).

5

6.2 Análisis Estadístico

Se diseñaron grupos de 10 ratones C57BL/6 con el fin de obtener 90% de poder con una diferencia doble para la lectura primaria. Se realizó un análisis estadístico en los días 14 después de la inmunización 2 con datos usando

10 UNISTAT. EL protocolo aplicado para análisis de variación pueden ser descritos en resumen como sigue: transformación de registro de datos; prueba de Shapiro-Wilk en cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad; prueba de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de variación entre diferentes poblaciones (grupo): Análisis de variación en datos seleccionados (ANOVA 1 o 2);

15 prueba de Turkey-HSD para múltiples comparaciones.

6.3 Ensayo de Neutralización

Antes del ensayo, se sembraron células MRC5 en placas de 96 cavidades y se incubaron durante 3 días a 37°C. Se incubaron diluciones en serie de sueros

20 inactivados con calor con una cantidad fija del virus AD169 de CMV humano durante 1 hora a 37°C. Después de la activación, la mezcla de sueros y virus se agregó a las placas de 96 cavidades conteniendo células MRC5. Las placas se centrifugaron a 2000 rpm durante 1 hora a 37°C. Después de una incubación

nocturna a 37°C, las placas se fijaron con una solución de acetona al 80% (20-30 minutos a +4°C). La solución de acetona se removió y las cavidades positivas a CMV se detectaron utilizando un anticuerpo temprano I (IE-I) de anti-intermediario conjugado con biotina monoclonal específico durante 1 hora a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces con PBS. Después del lavado, se agregó estreptavidina-peroxidasa de rábano durante 30 minutos adicionales a 37°C. Las placas se lavaron 3 veces y se incubaron durante 10 minutos con una solución de True-Blue. Se registraron señales de color específicas a través de examen visual bajo microscopio. Las titulaciones de neutralización se expresaron como la forma recíproca de la dilución más alta de suero dando un 50% de reducción en el número de cavidades positivas a CMV cuando se compararon con el control de dosis de virus sin suero.

Resultados

La respuesta de anticuerpo de neutralización se midió en muestras de suero recolectadas 21 días después de la primera inmunización y 14 días después de la segunda inmunización. Las muestras se probaron para su actividad de neutralización contra el virus AD169 de CMV humano. Los resultados se muestran en la Figura 15A. Todos los polipéptidos probados indujeron una respuesta importante 14 días después de la inmunización 2 (ver barras en gris). gB-SLP12, gB-SLP12-Delta113, gB-SLP12-Delta725, y LVL759 indujeron titulaciones que fueron no significativamente* diferentes de gB-DeltaTM. CD33 (valor p: 0.0006) y LVL776 (valor p: 0.0116) indujeron titulaciones significativamente más bajas que

gB-DeltaTM.

* valor $p \geq 0.05 \rightarrow$ ninguna diferencia estadística (con 95% de confianza)

** valor $p < 0.05 \rightarrow$ diferencia estadística

5 **6.4 Ensayo de ELISA**

La cuantificación de anticuerpos anti-gB se realizó a través de ELISA utilizando un polipéptido gB llamado gB** (descrito en EP0759995) como un antígeno de revestimiento. El antígeno se diluyó a una concentración final de 4 µg/ml en PBS (100 µl/cavidad) y se incubó durante la noche a 4°C en placas de 96

10 cavidades. Las placas después se saturaron durante 1 hora a 37°C con 200 µl de PBS conteniendo 1% de Albúmina de Suero Bovino. Se agregaron, a las cavidades, diluciones en serie dobles de suero (100 µl/cavidad) y se incubaron durante 1 hora y 30 minutos a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 0.1%. Se agregaron 100 µl de Ig anti-ratón conjugado con biotina a

15 cada cavidad y se incubaron durante 1 hora a 37°C. Después de 4 lavados con PBS/Tween 20 0.1%, se agregaron 100 µl de estreptavidina/peroxidasa de rábano durante una incubación de 30 minutos adicionales a 37°C. Las placas se lavaron 4 veces con PBS/Tween 20 0.1% y una vez con agua. Después, las placas se incubaron durante 10 minutos a 22°C con 100 µl de Tetra-metil-bencidina 75% en

20 0.1 M regulador de pH de citrato pH 5.8. Esta reacción se detuvo con 100 µl de H₂SO₂ 0.4 N y la colorimetría se leyó en un espectrómetro a 450/620 nm. Se utilizó un lote previo de gB-DeltaTM purificado cuya concentración fue conocida, como un estándar en este experimento. Utilizando el software SoftMax Pro, se

determinaron las titulaciones de ELISA y se expresaron en Unidad/ml de ELISA.

Resultados

La titulación de ELISA se midió en muestras de sueros recolectadas 21 días
 5 después de primera inmunización y 14 días después de la segunda inmunización.
 Los resultados se muestran en la Figura 15B. Todos los polipéptidos probados
 indujeron una respuesta importante 14 días después de la inmunización 2 (ver
 barras en gris). gB-SLP12-Delta113 y gB-SLP12-Delta725 indujeron titulaciones
 que fueron no significativamente* diferentes de la titulación inducida por gB-
 10 DeltaTM. gB-SLP12, CD33, LVL759 y LVL779 indujeron titulaciones que fueron no
 significativamente* diferentes. gB-DeltaTM indujo titulaciones** significativamente
 más altas que gB-SLP12 (valor p: 0.0002), CD33 (valor p: 0.0226), LVL759 (valor
 p: 0.0002) y LVL776 (valor p: 0.0001).

* valor $p \geq 0.05 \rightarrow$ ninguna diferencia estadística (con 95% de confianza)

15 ** valor $p < 0.05 \rightarrow$ diferencia estadística

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido gB de citomegalovirus (CMV) que comprende al menos una porción de un dominio extracelular de proteína gB comprendiendo un
5 dominio de bucle de fusión 1 (FL1) y un dominio de bucle de fusión 2 (FL2), en donde al menos uno de los dominios FL1 y FL2 comprende al menos una eliminación o sustitución de aminoácido.
2. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende al menos 50%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% de los
10 aminoácidos del dominio extracelular, o que comprende el dominio extracelular completo.
3. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende un dominio de transmembrana no funcional (TM).
- 15 4. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una eliminación de al menos una porción del dominio TM.
5. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 4, en donde al menos 50%, al menos 70%, al menos 80%, o al menos 90% de los aminoácidos del dominio TM es eliminado.
- 20 6. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 4 o reivindicación 5, que comprende una eliminación de aminoácidos en la posición 725-775 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV.

7. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, que comprende una eliminación de aminoácidos en la posición 701-775 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV.

5 8. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende al menos una eliminación o sustitución de aminoácido en el dominio FL1.

 9. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende al menos una eliminación o sustitución de
10 aminoácido en el dominio FL2.

 10. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende al menos una eliminación o sustitución en los dominios tanto FL1 como FL2.

 11. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las
15 reivindicaciones 1 a 10, que comprende una eliminación de al menos una porción del dominio citoplásmico.

 12. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende al menos una región de aminoácido hidrofóbico del dominio citoplásmico.

20 13. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende una eliminación de aminoácidos 825 a 877 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV.

14. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende una eliminación de al menos 80%, al menos 90%, al menos 95% de los aminoácidos del dominio citoplásmico, o una eliminación del dominio citoplásmico completo.

5 15. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde al menos una sustitución de aminoácido en el dominio de bucle de fusión FL1 comprende una sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de Y.I.Y ubicado en la posición 155-157 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros
10 polipéptidos gB de CMV, con un aminoácido polar distinto a un aminoácido aromático.

16. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la sustitución comprende la sustitución de al menos dos aminoácidos seleccionados de Y.I.Y ubicados en la posición 155-157 de la secuencia
15 establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, con un aminoácido polar distinto a un aminoácido aromático.

17. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 15 o reivindicación 16, en donde el aminoácido polar se selecciona del grupo que
20 consiste de aminoácidos positivamente cargados que consisten de lisina (K), histidina (H), y arginina (R).

18. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la isoleucina (I) ubicada en la posición 156 de la secuencia establecida en

SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una histidina (H).

19. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 17 o reivindicación 18, en donde la tirosina (Y) ubicada en la posición 157 de la
5 secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una arginina (R).

20. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, en donde la tirosina (Y) ubicada en la posición 155 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en
10 otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una glicina (G).

21. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde los aminoácidos Y.I.Y ubicados en la posición 155-157 en el dominio de bucle de fusión FL1 de la secuencia SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, están substituidos
15 con el aminoácido G.H.R, respectivamente.

22. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde los aminoácidos Y.I.Y ubicados en la posición 155-157 en el dominio de bucle de fusión FL1 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV,
20 están substituidos con un estiramiento de aminoácidos que tienen una clasificación de hidrofobicidad de menos de -3, menos de -7, menos de -8, según medido a través de la escala de Kyte y Doolittle.

23. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 22, en donde al menos una sustitución de aminoácido en el dominio de bucle de fusión FL2 comprende la sustitución de al menos un aminoácido seleccionado de W.L.Y ubicado en la posición 240-242 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en
5 otros polipéptidos gB de CMV, con un aminoácido positivamente cargado del grupo que consiste de lisina (K), histidina (H) y arginina (R).

24. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el aminoácido seleccionado de W.L.Y ubicado en la posición 240-242 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o una posición correspondiente en otros
10 polipéptidos gB de CMV, está substituido con una histidina (H).

25. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 23 o reivindicación 24, en donde la tirosina (Y) ubicada en la posición 242 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, está substituida con una histidina (H).

15 26. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde los aminoácidos W.L.Y ubicados en la posición 240-242 en el dominio de bucle de fusión FL2 de la secuencia establecida en SEC ID NO: 1, o en una posición correspondiente en otros polipéptidos gB de CMV, están substituidos con el aminoácido A.F.H, respectivamente.

20 27. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, que comprende una eliminación de al menos una porción de la secuencia líder.

28. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 27, que

comprende una eliminación de al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% de los aminoácidos de la secuencia líder, o de la secuencia líder completa.

29. Un polipéptido gB de CMV que comprende una eliminación de al menos 40%, al menos 50%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% de los aminoácidos de la secuencia líder, o de la secuencia líder completa.

30. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con la reivindicación 29, que además comprende una o más de las características de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26.

31. Un polipéptido Gb de CMV que tiene la secuencia seleccionada del grupo que consiste de las secuencias establecidas en: SEC ID NO: 3, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 14, SEC ID NO: 16, SEC ID NO: 18, SEC ID NO: 19, SEC ID NO: 20 y SEC ID NO: 21.

32. Una preparación que comprende una población de polipéptidos gB de CMV, en donde al menos 50%, al menos 60%, o al menos 70% de la población está en forma trimérica.

33. Una composición inmunogénica que comprende el polipéptido gB de CMV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 mezclado con un vehículo farmacéutico adecuado.

34. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 33, que además comprende al menos uno o más antígenos de CMV seleccionados del grupo que consiste de pUL131, gL, gH, pUL128, pUL130, o cualquier combinación de los mismos.

35. La composición inmunogénica de acuerdo con las reivindicaciones 33 a 34, que además comprende un auxiliar.

36. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el auxiliar comprende 3D-MLP y QS21 en una formulación liposomal.

5 37. La composición inmunogénica de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el auxiliar comprende una emulsión de aceite en agua.

38. Un polinucleótido que codifica al polipéptido gB de CMV de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.

39. Un polinucleótido que tiene la secuencia seleccionada del grupo que
10 consiste de las secuencias establecidas en: SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEC ID NO: 9, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 13, SEC ID NO: 15, y SEC ID NO: 17.

40. Un vector recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 38 o reivindicación 39.

15 41. Una célula huésped transformada con el vector recombinante de la reivindicación 40.

42. El polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37, para usarse en la prevención y/o tratamiento de una infección por CMV.

20 43. Uso del polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37, en la preparación de un medicamento para evitar y/o tratar una infección por CMV.

44. El uso de la reivindicación 42 o reivindicación 43 para evitar una infección congénita por CMV en un recién nacido.

45. Un método para producir una respuesta inmune contra CMV, que comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que comprende el polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 o la composición de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 37.

46. Un método para evitar una infección congénita contra CMV en un recién nacido, que comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad inmunológicamente efectiva de una composición que comprende el polipéptido gB de CMV de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31 y 33 a 37.

47. El uso de acuerdo con la reivindicaciones 42 a 44 o el método de acuerdo con la reivindicación 45 o reivindicación 46, en donde los sujetos son sujetos CMV-seronegativos.

48. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 47, en donde los sujetos CMV-seronegativos son mujeres en edad de reproducción.

49. El uso o método de acuerdo con la reivindicación 47, en donde los sujetos CMV-seronegativos son niñas adolescentes.

Box No. VIII(ii) DECLARATION: ENTITLEMENT TO APPLY FOR AND BE GRANTED A PATENT

The declaration must conform to the standardized wording provided for in Section 212; see Notes to Boxes Nos. VIII, VIII(I) to (v) (in general and the specific Notes to Box No. VIII(ii)). If this Box is not used, this sheet should not be included in the request.

Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent (Rules 4.17(ii) and 51*bis*.1(a)(ii)), in a case where the declaration under Rule 4.17(iv) is not appropriate:

in relation to international application No. **PCT/EP2011/068040**

GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. is entitled to apply for and be granted a patent by virtue of the following:

- (i) transfer of entitlement from inventors **Guy Jean Marie Fernand Pierre BAUDOUX** and **Martine MARCHAND** by way of employment contract
- (ii) transfer of entitlement from inventor **Normand BLAIS** to ID Biomedical Corporation of Quebec by way of employment contract
- (iii) an assignment from ID Biomedical Corporation of Quebec to GlaxoSmithKline Biologicals s.a. effective 15 October 2010

☐ This declaration is continued on the following sheet, "Continuation of Box No. VIII(ii)".

Form PCT/RO/101 (declaration sheet (ii)) (March 2001; reprint January 2003)

See Notes to the request form

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 39/245	
(22) Fecha de solicitud: 25-04-13		(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/393,413	(32) Fecha 15-10-10	(33) País US
		(72) Inventor(es): BAUDOUX, Guy Jen, Marie, Fernand, Pierre; BLAIS, Normand y MARCHAND, Martine.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 15-05-13	(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 19-04-12	
	Fecha de presentación de la solicitud: 14-10-11	No. publicación: WO 2012/049317 A3	
	No. de solicitud: PCT/EP2011/068040		
(54) Título:		“ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS”	

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La invención se refiere a un polipéptido gB de citomegalovirus (CMV) que comprende al menos una porción de un dominio extracelular de proteína gB que comprende un dominio de bucle de fusión 1 (FL1) y un dominio de bucle de fusión 2 (FL2), en donde al menos uno de los dominios FL1 y FL2 comprende al menos una eliminación o sustitución de aminoácido.

Sector: Industria farmacéutica, y particularmente un polipéptido gB de Citomegalovirus y preparaciones farmacéuticas que lo contienen.

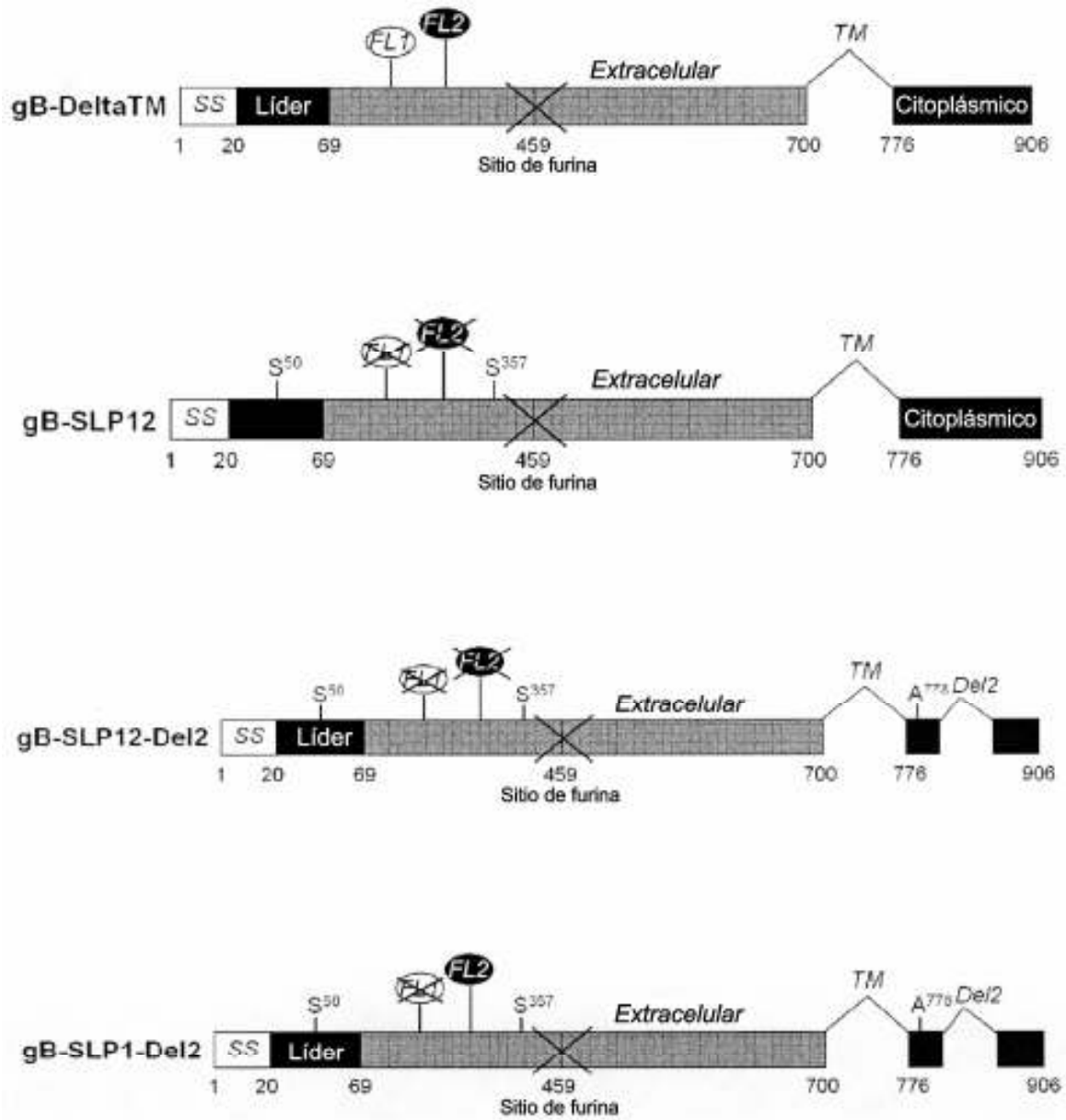


FIG. 1

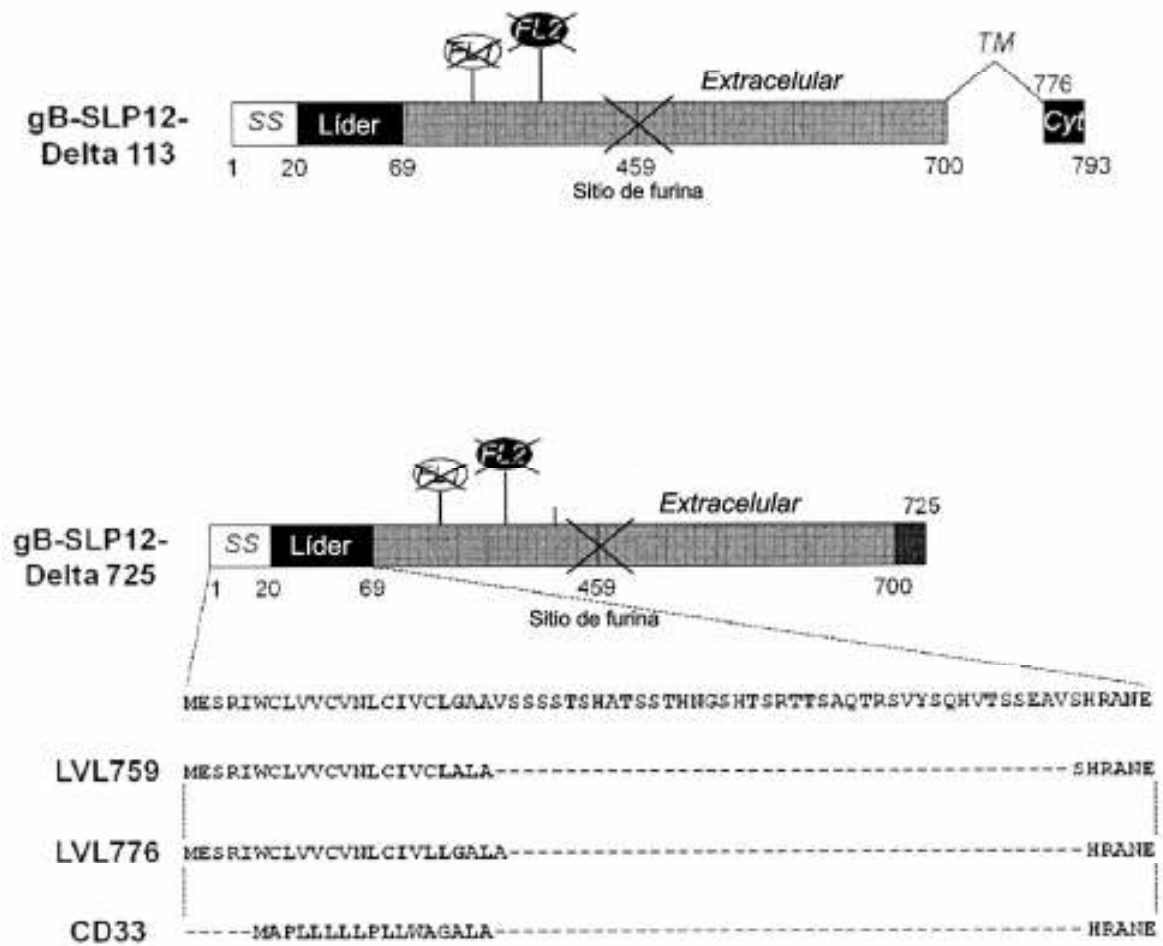


FIG. 2

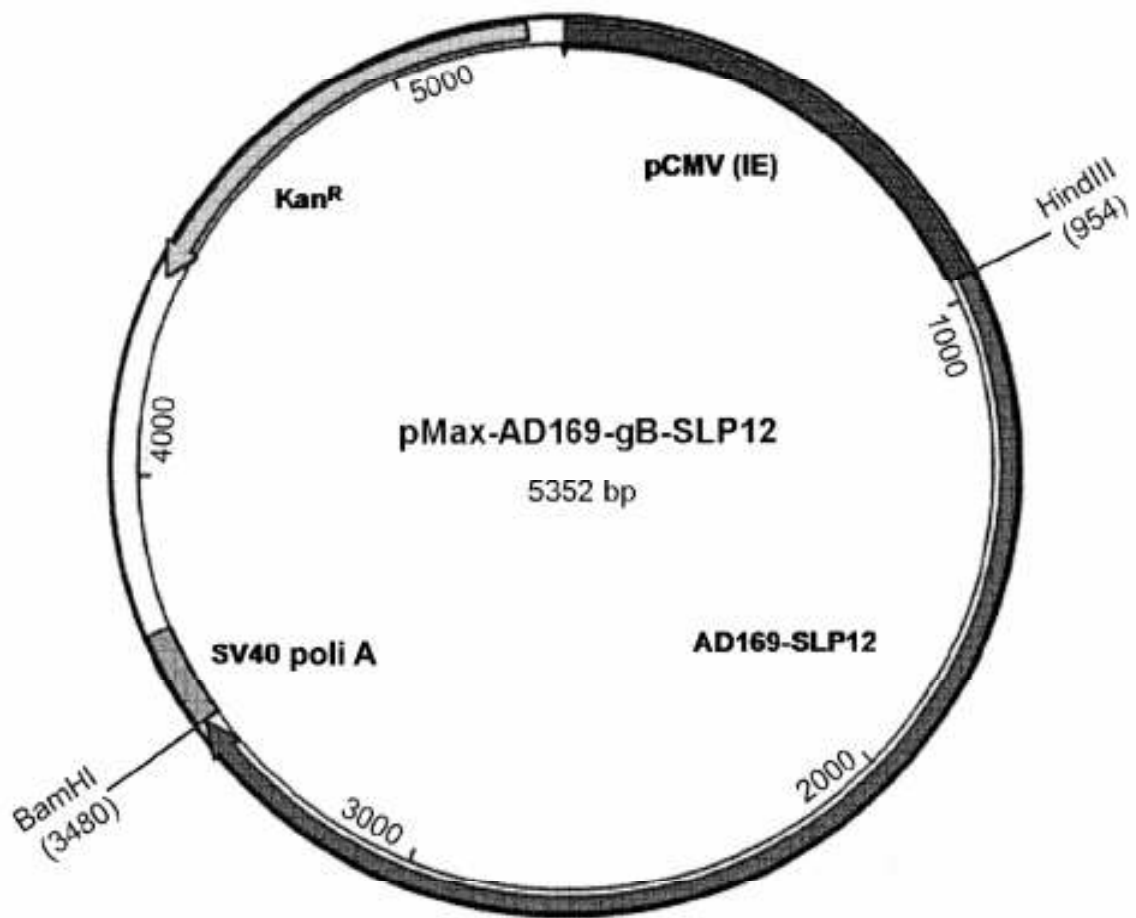


FIG. 3

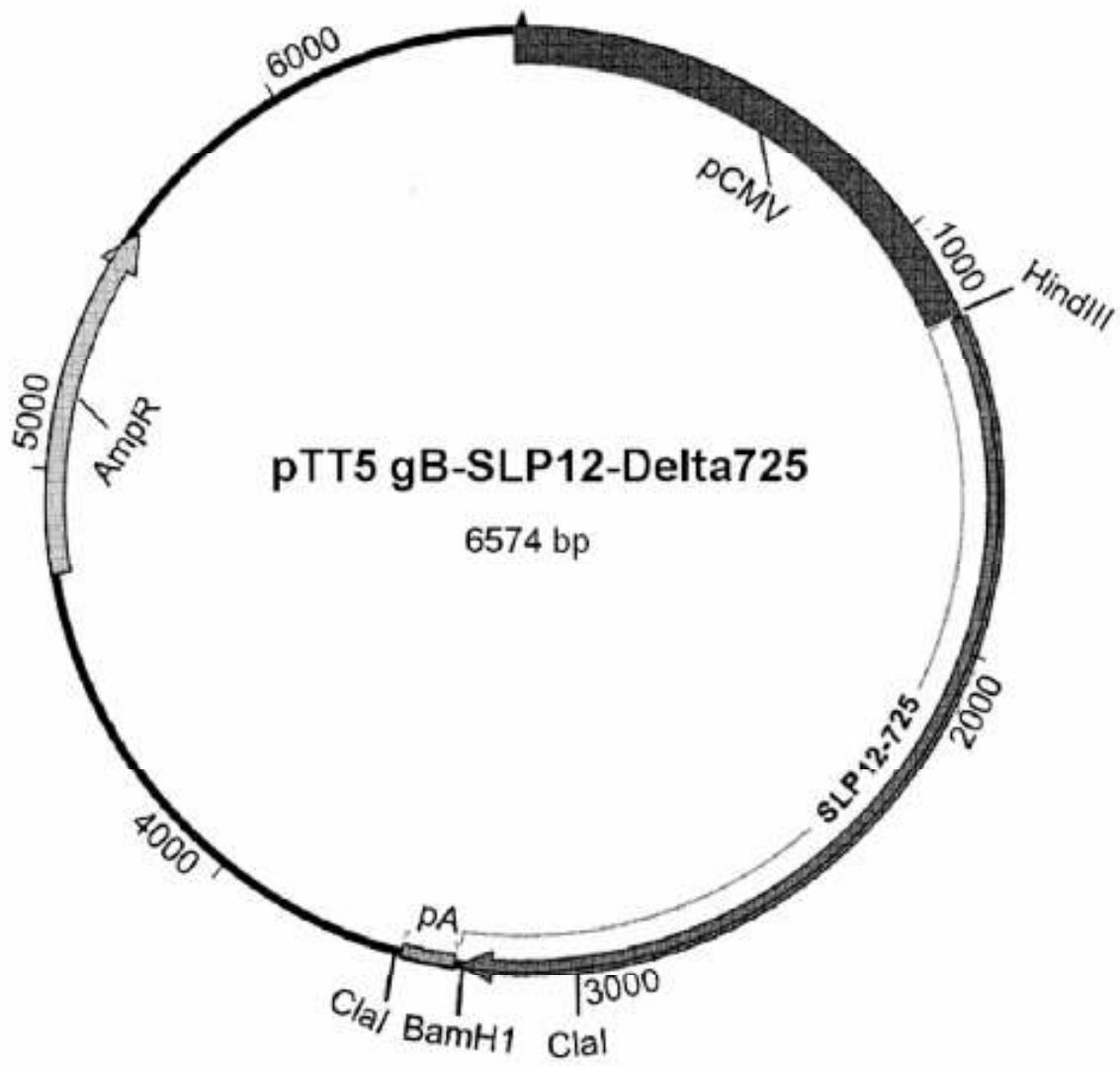


FIG. 4

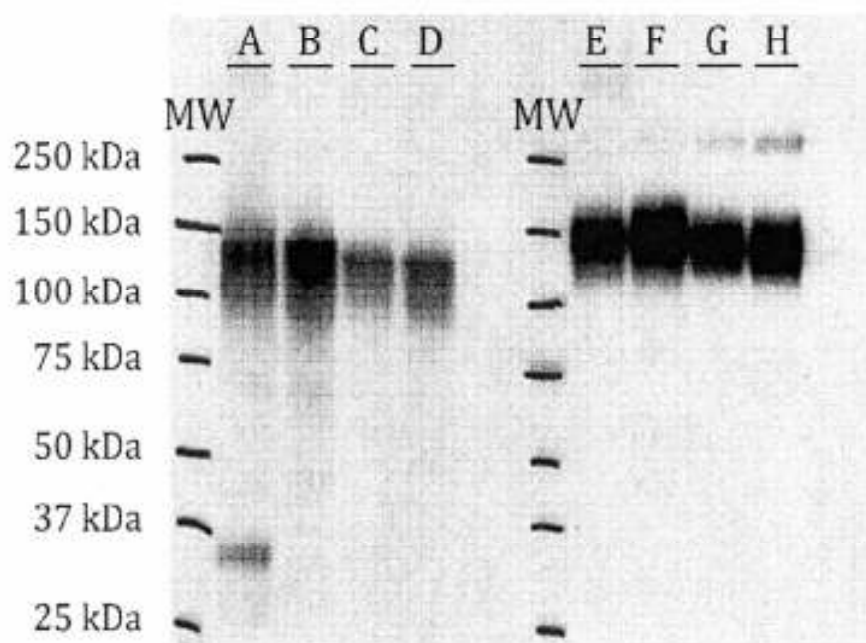


FIG. 5

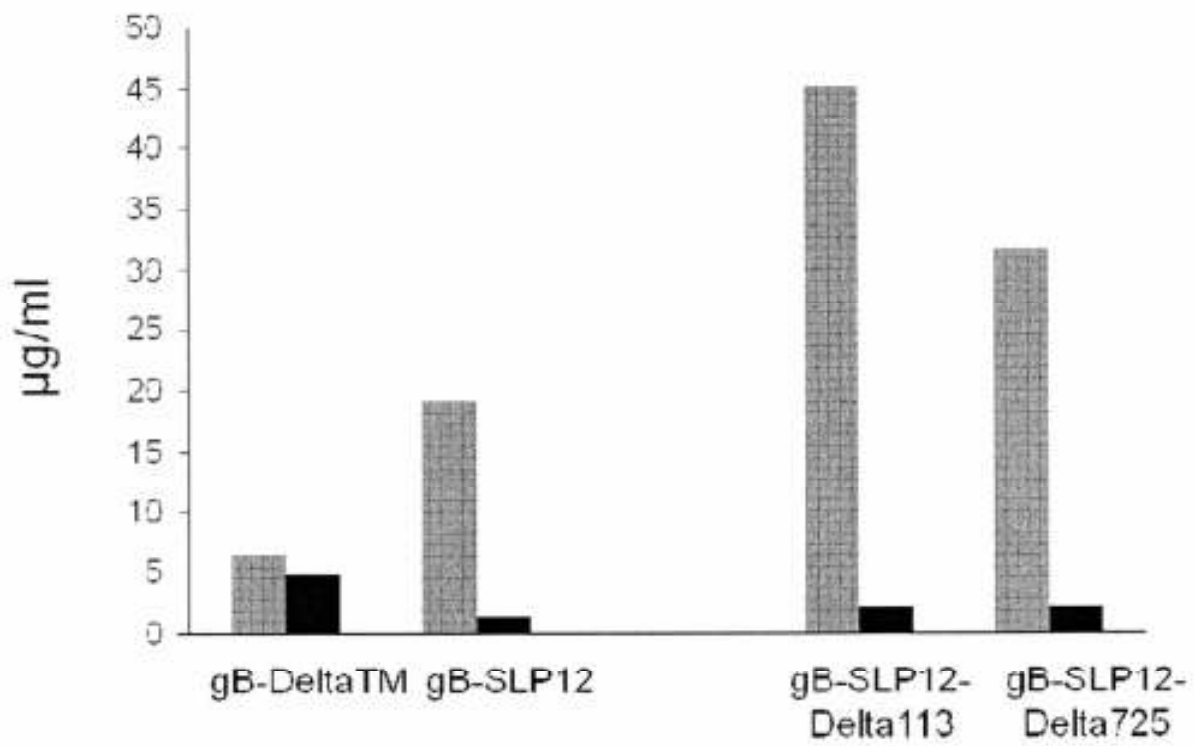


FIG. 6

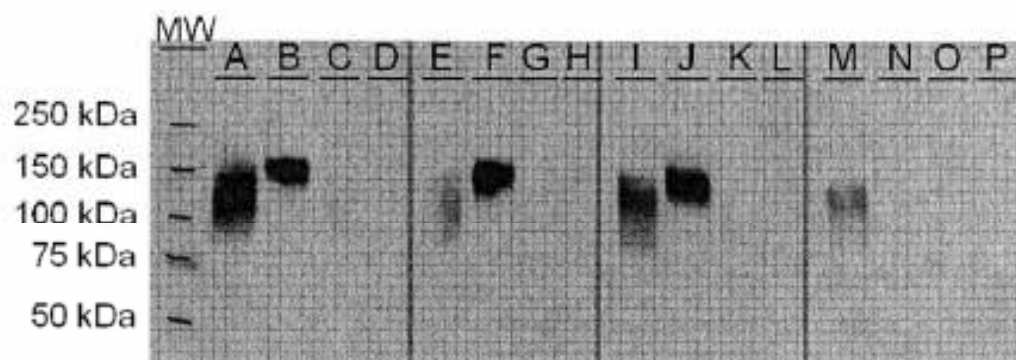


FIG. 7A

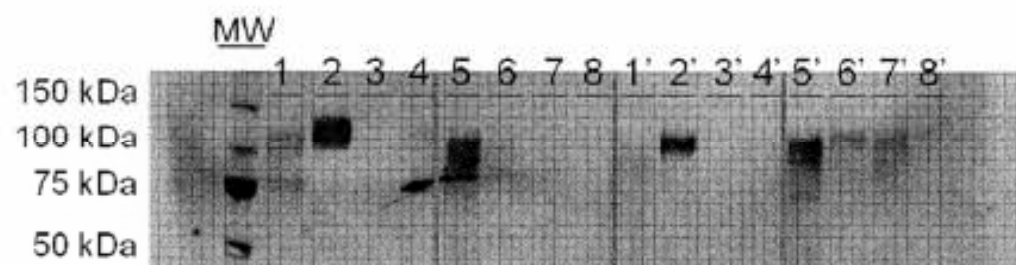


FIG. 7B

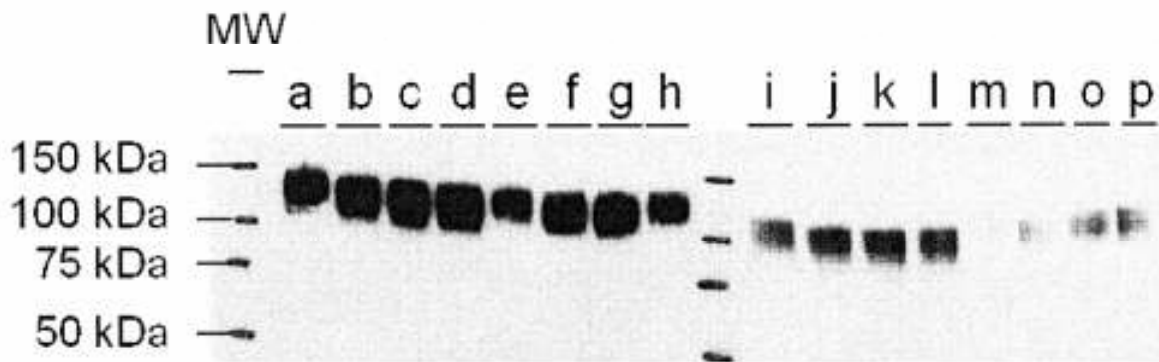


FIG. 8A

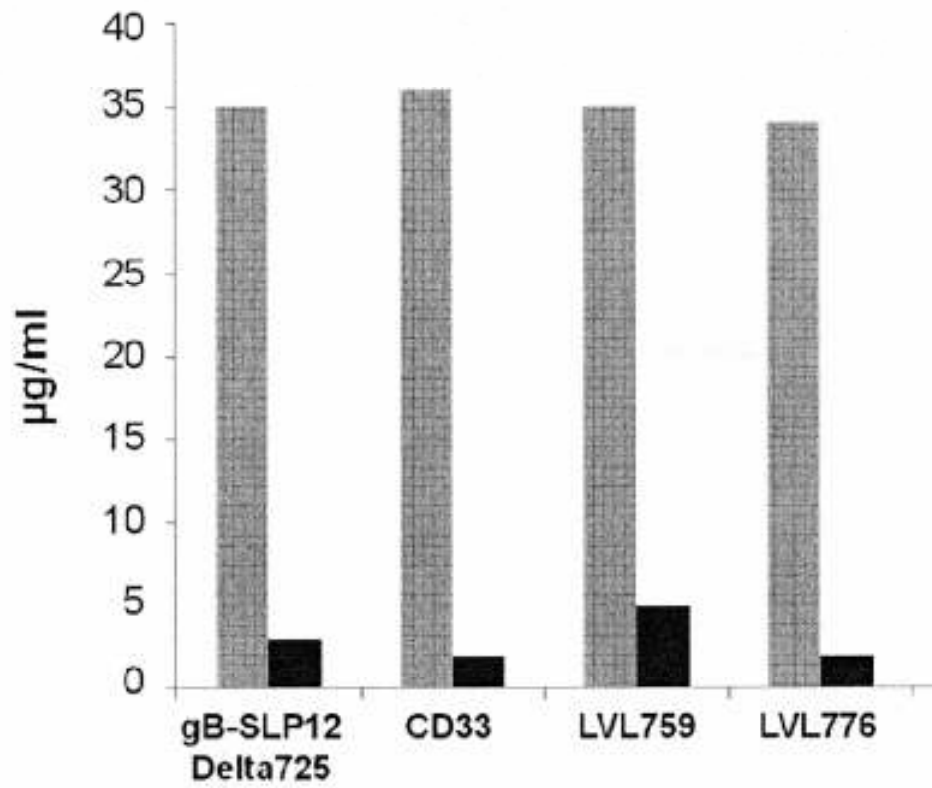


FIG. 8B

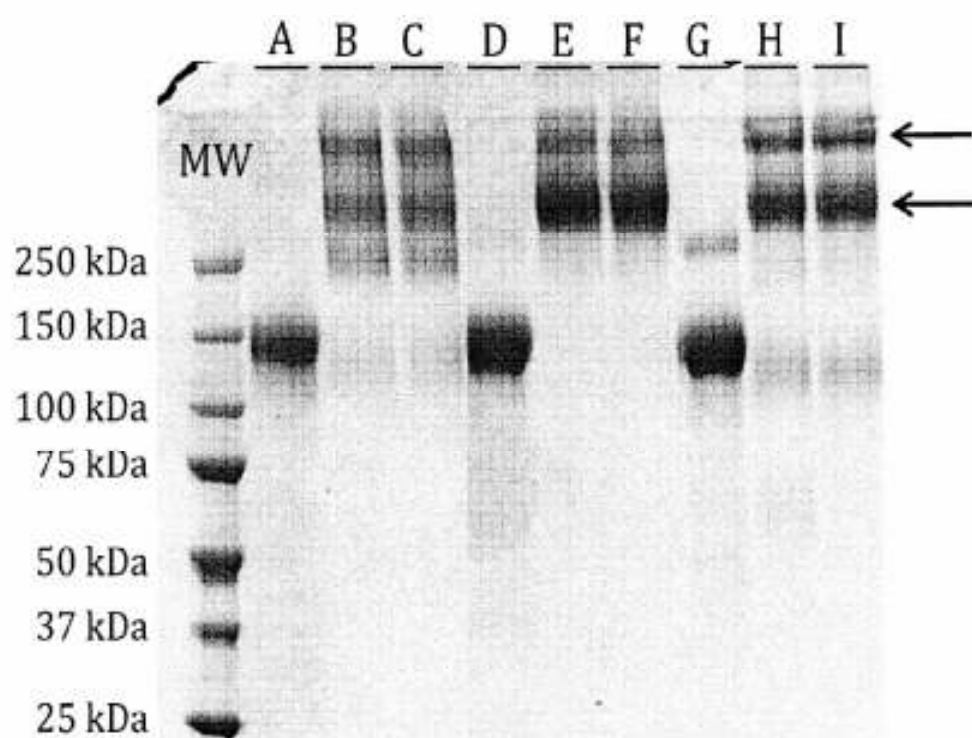
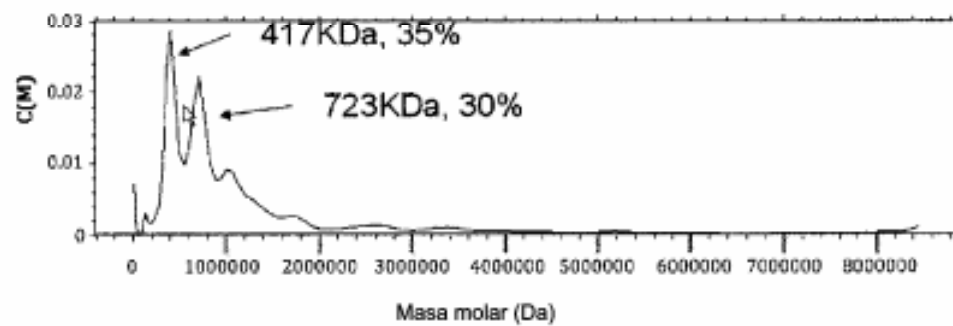
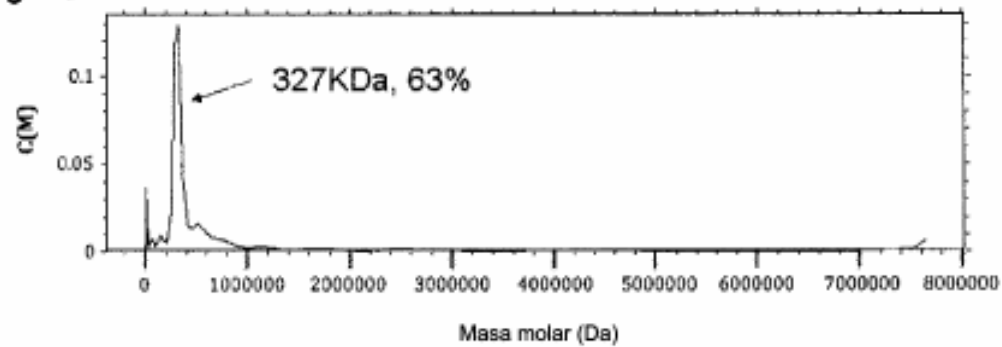
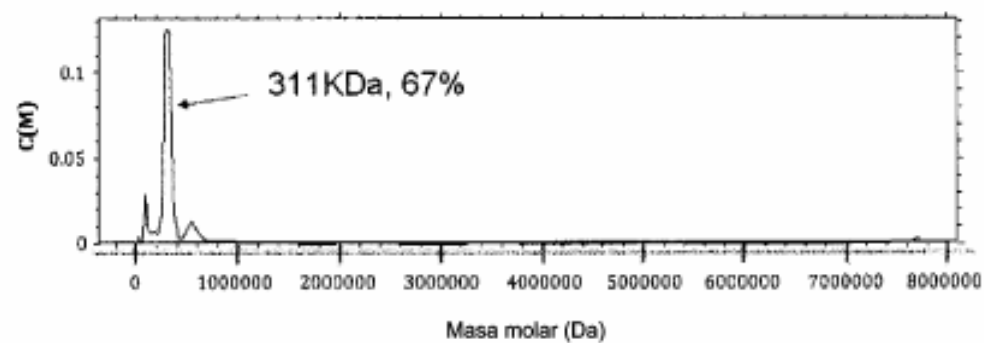


FIG. 9

gB-DeltaTM**gB-SLP12****gB-SLP1-Del2****FIG. 10**

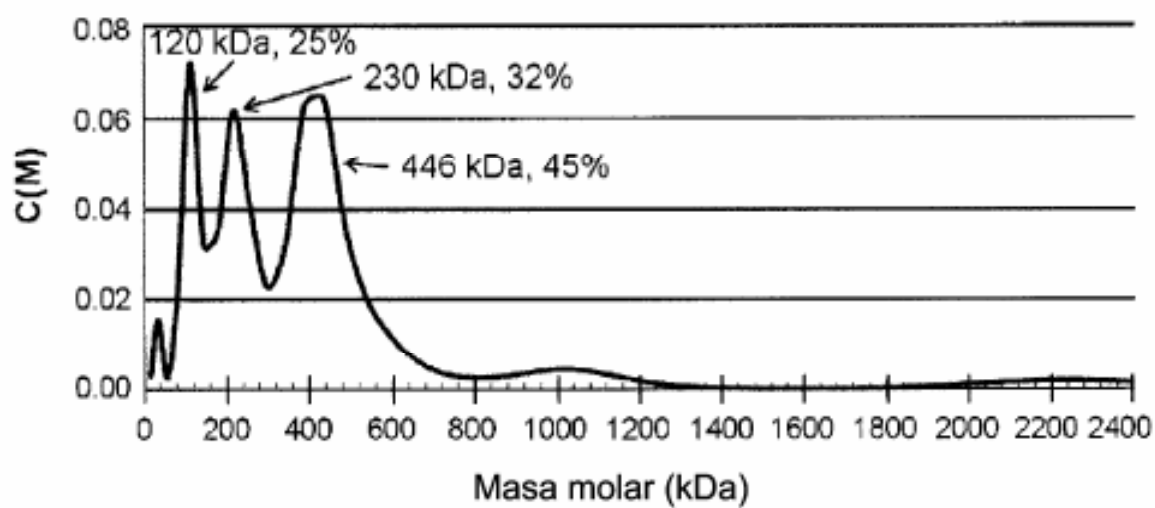
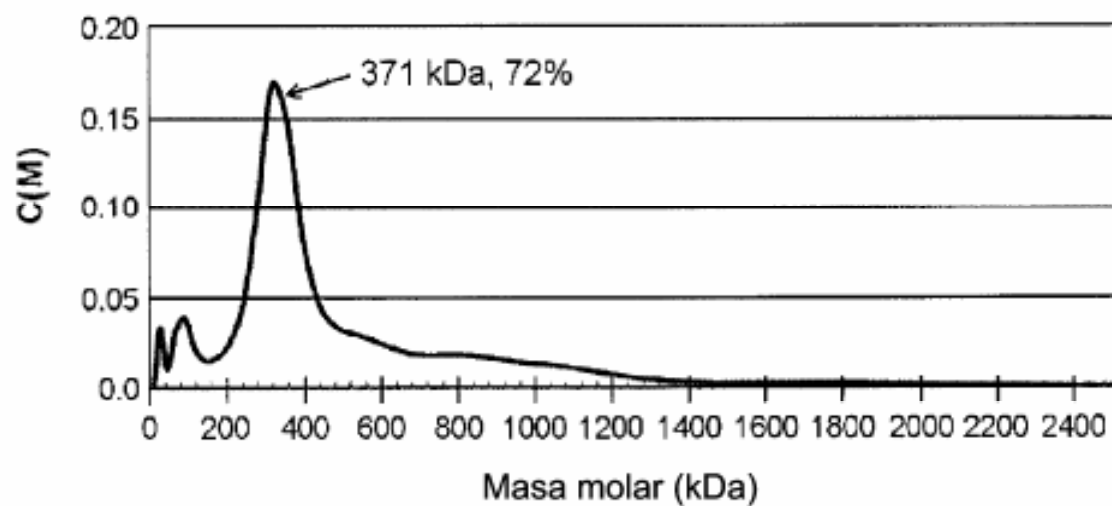
gB-Delta113 - 0.1% Pluronic**gB-Delta113 - Sin Detergente**

FIG. 11A

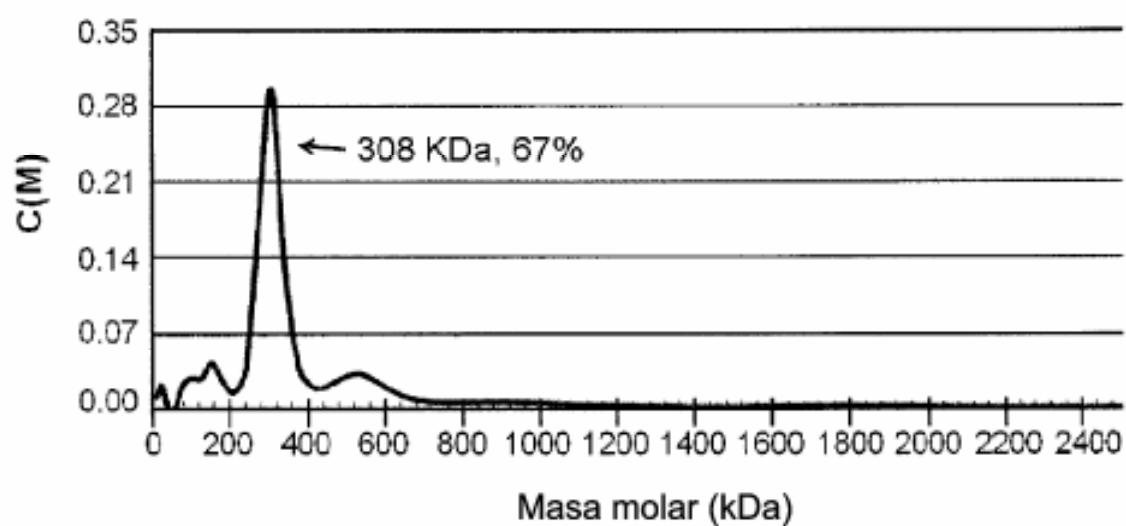
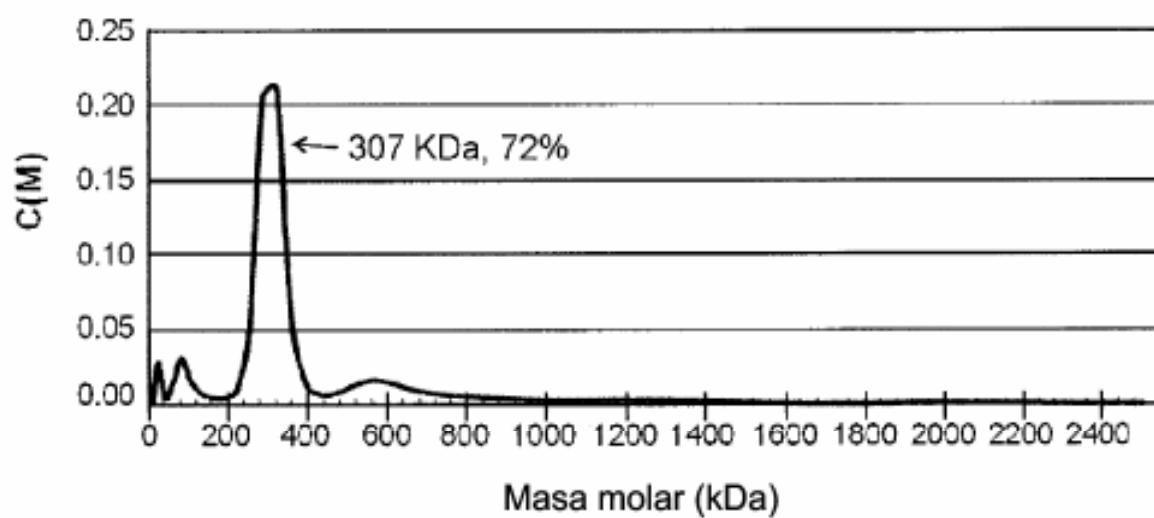
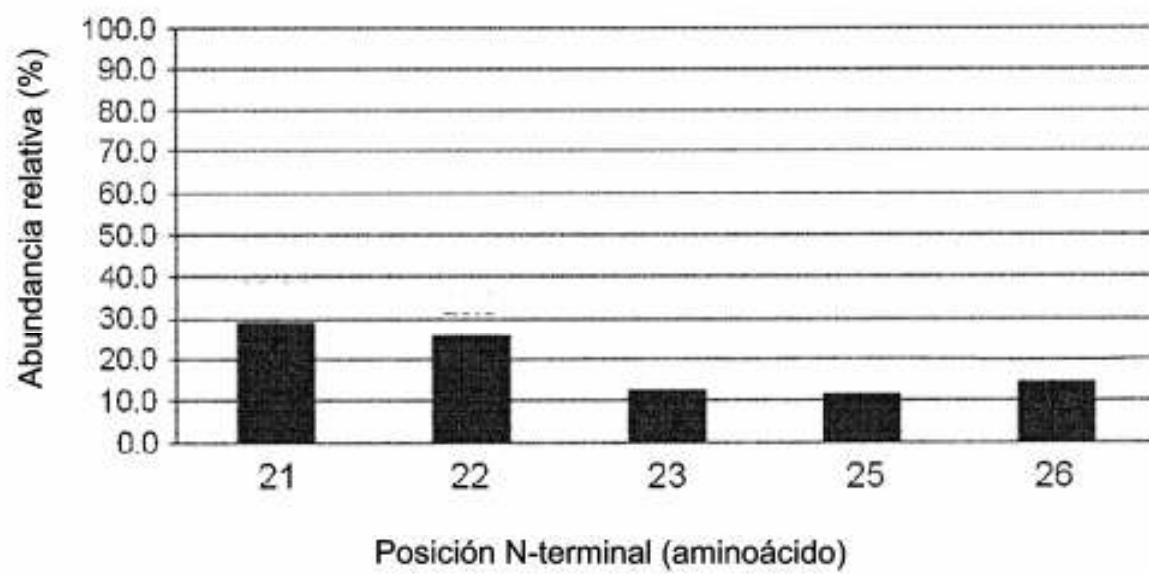
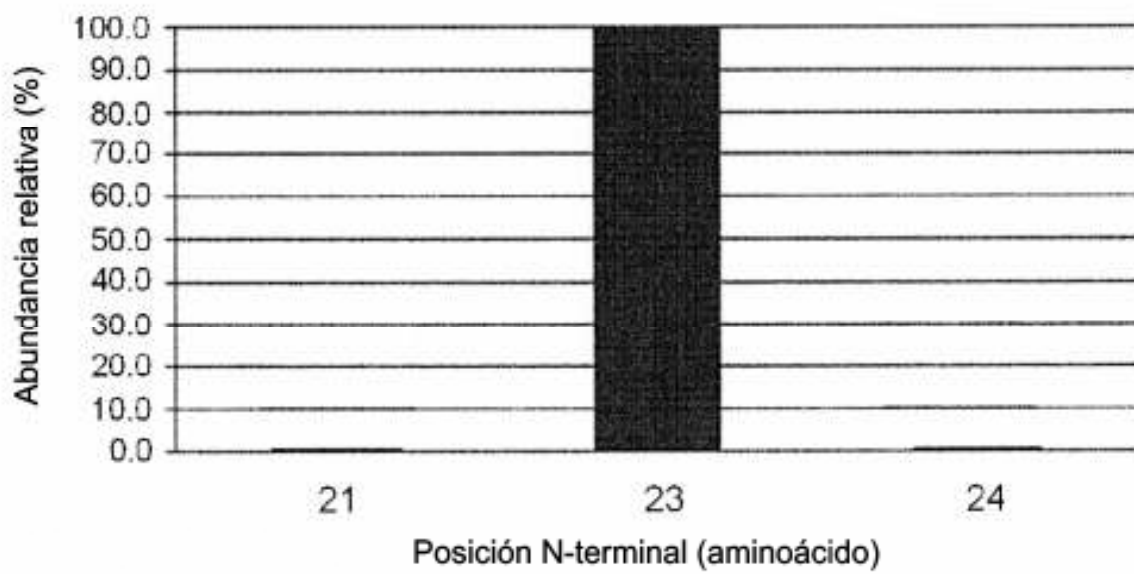
gB-Delta725 - 0.1% Pluronic**gB-Delta725 - Sin Detergente**

FIG. 11B

gB-SLP12-Delta725

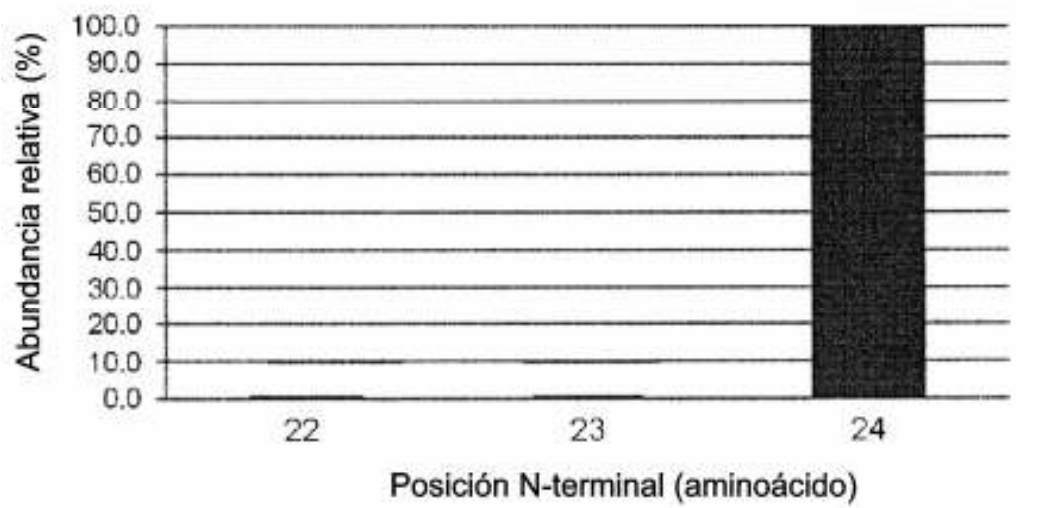
21 23 26
MESRIWCLVV CVNLCIVCLG A A VS S SSTSHATSSTHNGSHTSRTTSAQTR...
22 25

FIG. 12A

gB-SLP12-Delta725-LVL759

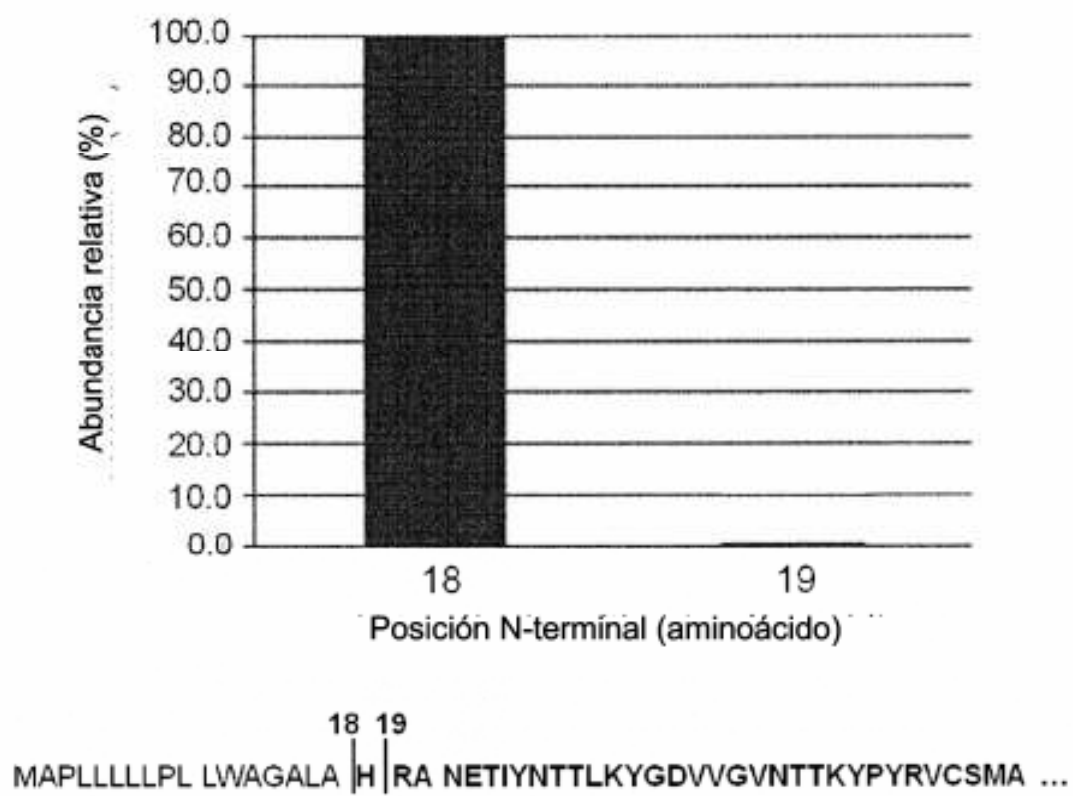
21 23
MESRIWCLVV CVNLCIVCLA |LA|S|HRANETIYNTTLKYGDVVGVNTTKYPY...
24

FIG. 12B

gB-SLP12-Delta725-LVL776

MESRIWCLVW CVNLCIVLLG A ²² ²⁴
 | ²³ |
 L A H R A N E T I Y N T T L K Y G D V V G V N T T K Y P Y ..

FIG. 12C

gB-SLP12-Delta725-CD33**FIG. 12D**

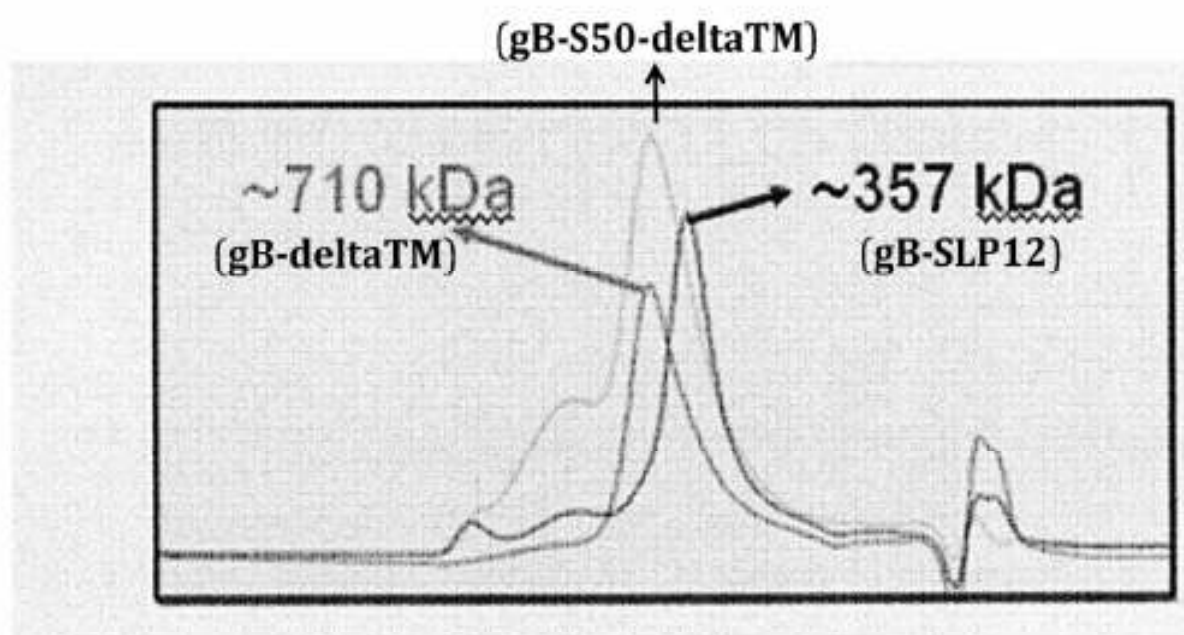
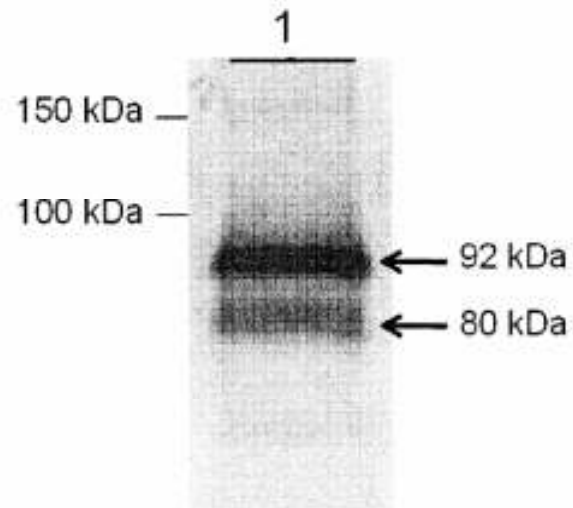
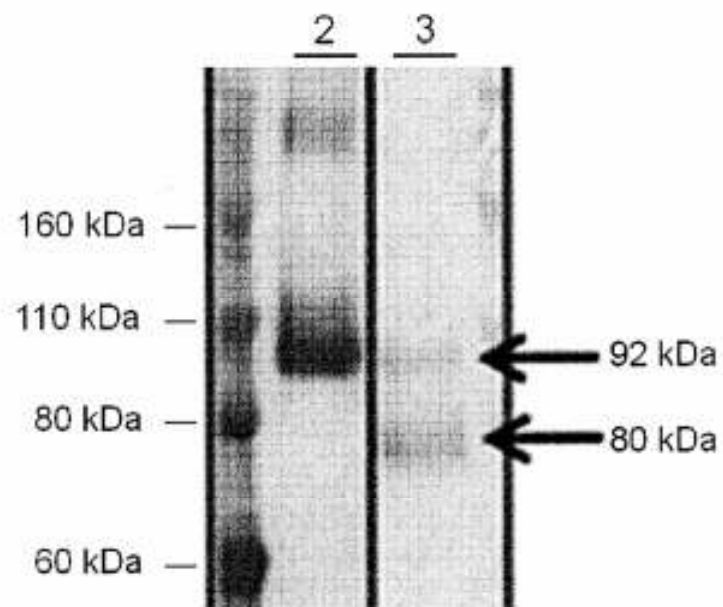
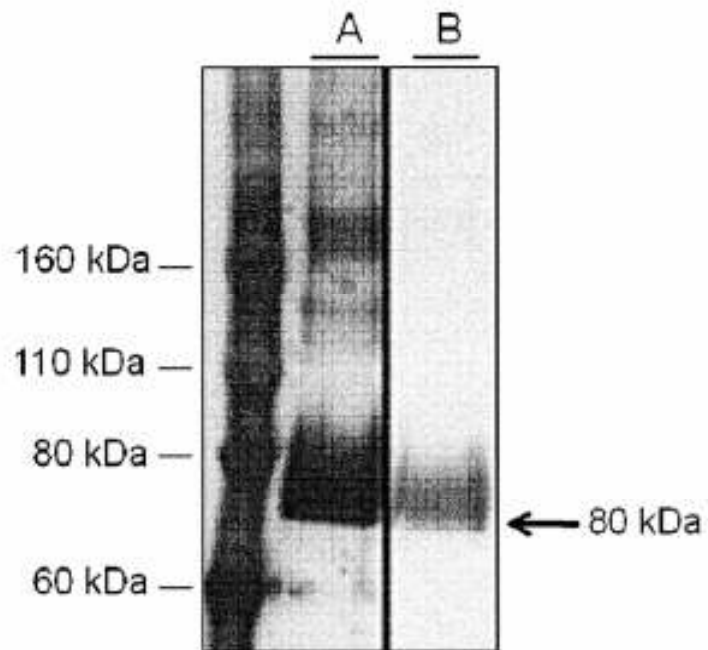
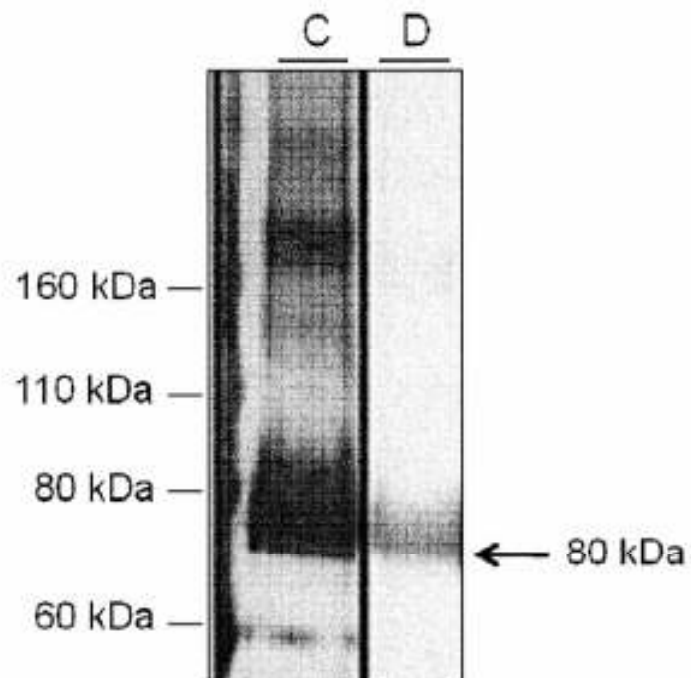


FIG. 13

gB-DeltaTM**FIG. 14A****gB-SLP12****FIG. 14B**

gB-SLP12-Delta113**FIG. 14C****gB-SLP12-Delta725****FIG. 14D**

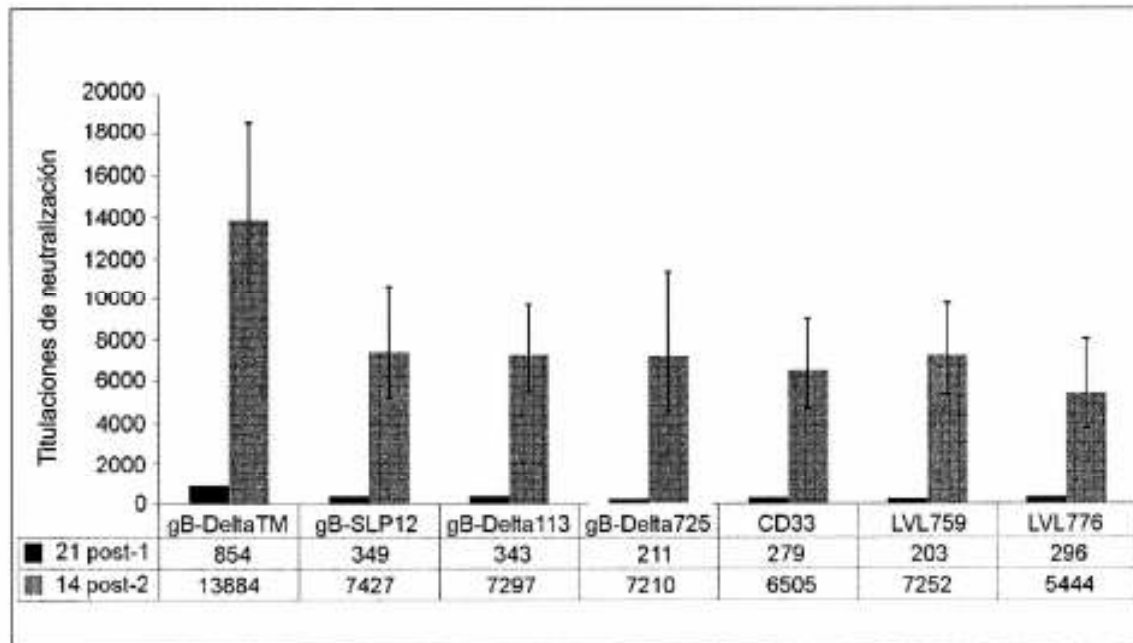


FIG. 15A

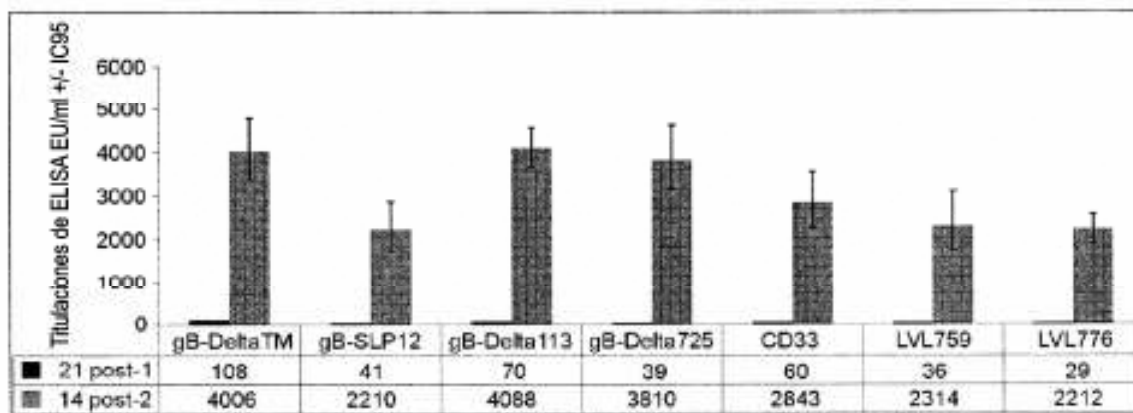


FIG. 15B

SEC. ID NO: 1

```

MESRIWCLV CVNLCIVCLG AAVSSSSSTSH ATSSSTHNGSH TSRTTSAQTR SVYSQHVTS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVNNTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTFKV RYVQKVLTFR RSYAYIYTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KEAQCYSSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTW 240
LYRETCNLNC MLTITTARSK YPYHFFATST GDVVYISPFY NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTCQLTFWE ASERTIRSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEAINKL QQIFNTSYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHRTTRS TSDNNTTHLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEANCVDQR RTLEVFKELS KINPSAILSA IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRD MNVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQLGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLP SLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVDSMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKV VDPLPPYLKG LDDIMSGLGA 720
AGKAVGVAIG AVGGAVASV EGVATFLKNP PGAFTIILVA IAVVIITYLI YTRQRLCTQ 780
PLQNLFPYLV SADGTTVTSG STKDTSLQAP PSYEE SVYNS GRKGPGPPSS DASTAAPPYT 840
NEQAYQMLLA LARLDAEQRA QQNGTDSLQD QTGTQDKGQK PNLLDRLRHR KNGYRHLKDS 900
DEEENV

```

SEC. ID NO: 2

```

MESRIWCLV CVNLCIVCLG AAVSSSSSTSH ATSSSTHNGSH TSRTTSAQTR SVYSQHVTS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVNNTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTFKV RYVQKVLTFR RSYAYIYTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KEAQCYSSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTW 240
LYRETCNLNC MLTITTARSK YPYHFFATST GDVVYISPFY NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTCQLTFWE ASERTIRSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEAINKL QQIFNTSYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHTTQTS TSDNNTTHLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEANCVDQR RTLEVFKELS KINPSAILSA IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRD MNVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQLGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLP SLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVDSMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKR LCTQPLQNLF PYLV SADGTT 720
VTSGSTKDTL LQAPPSYEE VYNSGRKGPG PPSSDASTAA PPYTNEQAYQ MLLALARLDA 780
EQRAQQNGTD SLDGQTGTQD KGQKPNLLDR LRHRKNGYRH LKDSDEEENV

```

FIG. 16

SEC. ID NO: 3

```

MESRIWCLVV CVNLCIVCLG AAVSSSSSTSH ATSSSTHNGSH TSRTTSAQTS SVYSQHVTS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVNNTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTFKV RVYQKVLTFR RSYAGHRTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KFAQCYSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTA 240
FHRETCLNLC MLTITTTARSK YPYHFFATST GDVVIISPFI NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTCQLTFWE ASERTISSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEAINKL QQIFNTSYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHTTQTS TSDNNTTHLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEAWCVDQR RTLEVFKELS KINPSAILSA IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRDMMVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQLGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLPCLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVDSMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKR LCTQPLQNLF PYLVSADGTT 720
VTSGSTKDOTS LQAPPSYEES VYNSGRKGGP PPSSDASTAA PPYTNEQAYQ MLLALARLDA 780
EQRAQQNGTD SLDGQTGTQD KGQKPNLLDR LRHRKNGYRH LKDSDEEENV

```

SEC. ID NO: 4

```

MESRIWCLVV CVNLCIVCLG AAVSSSSSTSH ATSSSTHNGSH TSRTTSAQTS SVYSQHVTS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVNNTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTFKV RVYQKVLTFR RSYAGHRTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KFAQCYSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTA 240
FHRETCLNLC MLTITTTARSK YPYHFFATST GDVVIISPFI NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTCQLTFWE ASERTISSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEAINKL QQIFNTSYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHTTQTS TSDNNTTHLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEAWCVDQR RTLEVFKELS KINPSAILSA IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRDMMVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQLGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLPCLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVDSMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKR LATQPLQNLF PYLVSADGTT 720
VTSGSTKDOTS LQAPPSYEES VYNSGRKGGQ KPNLLDLRLH RKNGYRHLKD SDEEENV

```

SEC. ID NO: 5

```

MESRIWCLVV CVNLCIVCLG AAVSSSSSTSH ATSSSTHNGSH TSRTTSAQTS SVYSQHVTS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVNNTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTFKV RVYQKVLTFR RSYAGHRTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KFAQCYSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTW 240
LYRETCLNLC MLTITTTARSK YPYHFFATST GDVVIISPFI NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTCQLTFWE ASERTISSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEAINKL QQIFNTSYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHTTQTS TSDNNTTHLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEAWCVDQR RTLEVFKELS KINPSAILSA IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRDMMVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQLGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLPCLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVDSMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKR LATQPLQNLF PYLVSADGTT 720
VTSGSTKDOTS LQAPPSYEES VYNSGRKGGQ KPNLLDLRLH RKNGYRHLKD SDEEENV

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 6

```

ATGGAGAGCA GGATCTGGTG CCTGGTGGTG TGCCTGAACC TGTGCATCGT GTGCCTGGGA 60
GCCGCCGTGA GCAGCAGCAG CACCTCCCAC GCCACCTCCA GCACCCACAA CGGCAGCCAC 120
ACCAGCAGGA CCACCTCCGC CCAGACCAGC AGCGTGTACA GCCAGCACGT GACCTCTTCC 180
GAGGCCGTGA GCCACAGGGC CAACGAGACA ATCTACAACA CCACCTGAA GTACGGCGAC 240
GTGGTGGGAG TGAACACCAC CAAGTACCCC TACAGAGTGT GCAGCATGGC CCAGGGCACC 300
GACCTGATCA GATTCGAGCG GAACATCATC TGCACCAGCA TGAAGCCCAT CAACGAGGAC 360
CTGGACGAGG GCATCATGGT GGTGTACAAG AGGAACATCG TGGCCACAC CTTCAAGGTC 420
CGCGTGTACC AGAAGGTGCT GACCTTCAGG CGGAGCTACG CCGGCCACAG GACCACTAC 480
CTGCTGGGCA GCAACACCGA GTACGTGGGC CCACCCATGT GGGAGATCCA CCACATCAAC 540
AAGTTCGCCC AGTGCTACAG CAGCTACAGC CGCGTGATCG GCGGCACCGT GTTCGTGGCC 600
TACCACAGGG ACAGCTACGA GAACAAGAAC ATGCAGCTGA TCCCCGACGA CTACAGCAAC 660
ACCCACAGCA CCAGATACGT GACCGTGAAG GACCACTGGC ACAGCAGGGG CAGCACC GCC 720
TTCCACAGAG AGACATGCAA CCTGAACTGC ATGCTGAACA TCACCACCGC CAGAAGCAAG 780
TACCTTACC ACTTCTTCGC CACCTCTACC GCGCACGTGG TGTACATCAG CCCCTTCTAC 840
AACGGCACCA ACAGGAACGC CAGCTACTTC GGCGAGAACG CCGACAAGTT CTTTCATCTTC 900
CCCAACTACA CCATCGTGTG CCACTTCGGC AGGCCCAACG CTGCCCCCGA GACACACAGA 960
CTGGTGGCCT TTCTGGAGAG GGCCGACAGC GTGATCAGCT GGGACATCCA GGACGAGAAG 1020
AACGTGACCT GCCAGCTGAC CTTCTGGGAG GCCAGCGAGA GGACCATCAG CAGCGAGGCC 1080
GAGGACAGCT ACCACTTCAG CAGCGCCAAG ATGACCGCCA CCTTCCTGAG CAAGAAACAA 1140
GAGGTGAACA TGAGCGACAG CGCCCTGGAC TGCCTGAGGG ACGAGGCCAT CAACAAGCTG 1200
CAGCAGATCT TCAACACCAG CTACAACCAG ACCTACGAGA AGTACGAAA CGTGTCCGTG 1260
TTGAGACAA GCGCGGACT GGTGGTGTTC TGGCAGGGCA TCAAGCAGAA GTCCCTGGTC 1320
GAGCTGGAGA GGCTGGCCAA CAGGTCCAGC CTGAACATCA CCCACACCAC CCAGACCAGC 1380
ACCAGCGACA ACAACACCAC ACACCTGAGC AGCATGGAAG GCGTGCACAA CCTGGTGTAT 1440
GCCAGCTGC AGTTACCTA CGACACCCTG AGGGGCTACA TCAACAGAGC CTTGGCCAG 1500
ATCGCCGAGG CTTGGTGGT GGACCGAGGA AGGACCCCTG AGGTGTTCAA GGAAGTGTCC 1560
AAGATCAACC CCAGCGCCAT CCTGAGCGCC ATCTACAACA AGCCAATCGC CGCCAGATT 1620
ATGGGCGACG TGCTGGGCTT GGCCAGCTGC GTGACCATCA ACCAGACCAG CGTGAAGGTG 1680
CTGCGGGACA TGAACGTGAA GGAAAGCCCA GGCCGCTGCT ACTCCAGGCC CGTGGTGATC 1740
TTCAACTTCG CCAACAGCTC CTACGTGCAG TACGGCCAGC TGGGCGAGGA CAACGAGATC 1800
CTGCTGGGAA ACCACAGGAC CGAGGAATGC CAGCTGCCCA GCCTGAAGAT CTTTATCGCC 1860
GGCAACTCCG CCTACGAGTA CGTGGACTAC CTGTTCAAGA GGATGATCGA CCTGTCCAGC 1920
ATCAGCACCG TGGACAGCAT GATCGCCCTG GATATCGATC CCCTGGAGAA CACCGACTTC 1980
AGGGTGCTGG AGCTGTACTC CCAGAAGGAA CTGAGGTCCA GCAACGTGTT CGACCTGGAG 2040
GAAATCATGA GAGAGTTCAA CAGCTACAAG CAGCGCGTGA AGTACGTGGA GGACAAGAGG 2100
CTGTGCACCC AGCCCCTGCA GAACCTGTTC CCCTACCTGG TGTCCGCCGA CGGCACCACC 2160
GTGACCAGCG GCTCCACCAA GGACACCAGC CTGCAGGCCC CTCCAGCTA CGAGGAAAGC 2220
GTGTACAACA GCGGCAGGAA GGGCCAGGC CCCCCAAGCA GCGACGCCAG CACAGCCGCC 2280
CCACCTACA CCAACGAGCA GGCTACCAG ATGCTGCTGG CCTGGCCCG GCTGGACGCC 2340
GAGCAGAGGG CCCAGCAGAA CGGCACCAGC AGCCTGGACG GCCAGACCGG CACCCAGGAC 2400
AAGGGCCAGA AGCCCAACCT GCTGGACAGG CTGAGGCACA GGAAGAACGG CTACAGGCAC 2460
CTGAAGGACA GCGACGAGGA AGAAAACGTG

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 7

```

ATGGAGAGCA GGATCTGGTG CCTGGTGGTG TGGTGAACC TGTGCATCGT GTGCCTGGGA 60
GCCGCCGTGA GCAGCAGCAG CACCTCCCAC GCCACCTCCA GCACCCACAA CGGCAGCCAC 120
ACCAGCAGGA CCACCTCCGC CCAGACCAGC AGCGTGTACA GCCAGCACGT GACCTCTTCC 180
GAGGCCGTGA GCCACAGGGC CAACGAGACA ATCTACAACA CCACCCTGAA GTACGGCGAC 240
GTGGTGGGAG TGAACACCAC CAAGTACCCC TACAGAGTGT GCAGCATGGC CCAGGGCACC 300
GACCTGATCA GATTCGAGCG GAACATCATC TGCACCAGCA TGAAGCCCAT CAACGAGGAC 360
CTGGACGAGG GCATCATGGT GGTGTACAAG AGGAACATCG TGGCCACAC CTTCAAGGTC 420
CGCGTGTACC AGAAGGTGCT GACCTTCAGG CGGAGCTACG CCGGCCACAG GACCACCTAC 480
CTGCTGGGCA GCAACACCGA GTACGTGGCC CCACCCATGT GGGAGATCCA CCACATCAAC 540
AAGTTCCGCC AGTGCTACAG CAGCTACAGC CGCGTGATCG GCGGCACCGT GTTCGTGGCC 600
TACCACAGGG ACAGCTACGA GAACAAGACC ATGCAGCTGA TCCCCGACGA CTACAGCAAC 660
ACCCACAGCA CCAGATACGT GACCGTGAAG GACCAGTGGC ACAGCAGGGG CAGCACCTGG 720
CTGTACAGAG AGACATGCAA CCTGMACTGC ATGCTGACCA TCACCAACGC CAGAAGCAAG 780
TACCCTTACC ACTTCTTCGC CACCTCTACC GGGGACGTGG TGTACATCAG CCCCTTCTAC 840
AACGGCACCA ACAGGAACGC CAGCTACTTC GCGGAGAACG CCGACAGTT CTTTATCTTC 900
CCCAACTACA CCATCGTGTC CGACTTCGGC AGGCCCAACG CTGCCCCCGA GACACACAGA 960
CTGGTGGCCT TTCTGGAGAG GGCCGACAGC GTGATCAGCT GGGACATCCA GGACGAGAAG 1020
AACGTGACCT GCCAGCTGAC CTTCTGGGAG GCCAGCGAGA GGACCATCAG CAGCGAGGCC 1080
GAGGACAGCT ACCACTTCAG CAGCGCCAAAG ATGACCGCCA CCTTCCTGAG CAAGAAACAA 1140
GAGGTGAACA TGAGCGACAG CGCCCTGGAC TGGTGAAGG ACGAGGCCAT CAACAAGCTG 1200
CAGCAGATCT TCAACACCAG CTACAACCAG ACCTACGAGA AGTACGGAAA CGTGTCCGTG 1260
TTCGAGACAA GCGGCGGACT GGTGGTGTTC TGGCAGGGCA TCAAGCAGAA GTCCCTGGTC 1320
GAGCTGGAGA GGCTGGCCAA CAGGTCCAGC CTGAACATCA CCCACACCAC CCAGACCAGC 1380
ACCAGCGACA ACAACACCAC ACACCTGAGC AGCATGGAAA GCGTGCACAA CCTGGTGTAT 1440
GCCAGCTGC AGTTCACCTA CGACACCCTG AGGGGCTACA TCAACAGAGC CCTGGCCAG 1500
ATCGCCGAGG CTTGGTGCGT GGACCAAGAA AGGACCTGG AGGTGTTCAA GGAAGTGTCC 1560
AAGATCAACC CCAGCGCCAT CCTGAGCGCC ATCTACAACA AGCCAATCGC CGCCAGATTTC 1620
ATGGGCGAGG TGCTGGGCCCT GGCCAGCTGC GTGACCATCA ACCAGACCAG CGTGAAGGTG 1680
CTGCGGGACA TGAACGTGAA GGAAAGCCCA GGCCGCTGCT ACTCCAGGCC CGTGGTGATC 1740
TTCAACTTCG CCAACAGCTC CTACGTGCAG TACGGCCAGC TGGGCGAGGA CAACGAGATC 1800
CTGCTGGGAA ACCACAGGAC CGAGGAATGC CAGCTGCCCA GCCTGAAGA7 CTTTATCGCC 1860
GGCAACTCCG CCTACGAGTA CGTGGACTAC CTGTTCAAGA GGATGATCGA CCTGTCCAGC 1920
ATCAGCACCG TGGACAGCAT GATCGCCCTG GATATCGATC CCCTGGAGAA CACCGACTTC 1980
AGGGTGCTGG AGCTGTACTC CCAGAAGGAA CTGAGGTCCA GCAACGTGT7 CGACCTGGAG 2040
GAAATCATGA GAGAGTTC7A CAGCTACAAG CAGCGCGTGA AGTACGTGGA GGACAAGAGG 2100
CTGGCCACCC AGCCCTTGCA GAACCTGTTC CCCTACCTGG TGTCCGCCGA CGGCACCACC 2160
GTGACCAGCG GCTCCACCAA GGACACCAGC CTGCAGGCCC CTCCAGCTA CGAGGAAAGC 2220
GTGTACAACA GCGGCAGGAA GGGCGGCCAG AAGCCCAACC TGCTGGACAG GCTGAGGCAC 2280
AGGAAGAACG GCTACAGGCA CCTGAAGGAC AGCGACGAGG AAGAAAACGT G

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 8

```

ATGGAGAGCA GGTCTGGTG CCTGGTGGTG TGGTGAACC TGTGCATCGT GTGCCTGGGA 60
GCCGCCGTGA GCAGCAGCAG CACCTCCCAC GCCACCTCCA GCACCCACAA CGGCAGCCAC 120
ACCAGCAGGA CCACCTCCGC CCAGACCAGC AGCGTGTACA GCCAGCACGT GACCTCTTCC 180
GAGGCCGTGA GCCACAGGGC CAACGAGACA ATCTACAACA CCACCTGAA GTACGGCGAC 240
GTGGTGGGAG TGAACACCAC CAAGTACCCC TACAGAGTGT GCAGCATGGC CCAGGGCACC 300
GACCTGATCA GATTGAGCG GAACATCATC TGCACCAGCA TGAAGCCCAT CAACGAGGAC 360
CTGGACGAGG GCATCATGGT GGTGTACAAG AGGAACATCG TGGCCACAC CTTCAAGGTC 420
CGCGTGATAC AGAAGGTGCT GACCTTCAGG CGGAGCTACG CCGGCCACAG GACCACCTAC 480
CTGCTGGGCA GCAACACCGA GTACGTGGCC CCACCCATGT GGGAGATCCA CCACATCAAC 540
AAGTTGCCCC AGTGCTACAG CAGCTACAGC CGCGTGATCG GCGGCACCGT GTTCGTGGCC 600
TACCACAGGG ACAGCTACGA GAACAAGACC ATGCAGCTGA TCCCCGACGA CTACAGCAAC 640
ACCCACAGCA CCAGATACGT GACCGTGAAG GACCAGTGGC ACAGCAGGGG CAGCACCGCC 720
TTCCACAGAG AGACATGCAA CCTGAAC TGC TACCTGACCA TCACCACCGC CAGAAGCAAG 780
TACCCTTACC ACTTCCTCGC CACCTCTACC GGGGACGTGG TGTACATCAG CCCCTTCTAC 840
AACGGCACCA ACAGGAACGC CAGCTACTTC GGCGAGAACG CCGACAAGTT CTTTATCTTC 900
CCCAACTACA CCATCGTGTC CGACTTCGGC AGGCCCAACG CTGCCCCCGA GACACACAGA 960
CTGGTGGCCT TTCTGGAGAG GGCCGACAGC GTGATCAGCT GGGACATCCA GGACGAGAAG 1020
AACGTGACCT GCCAGCTGAC CTTCTGGGAG GCCAGCGAGA GGACCATCAG CAGCGAGGCC 1080
GAGGACAGCT ACCACTTCAG CAGCGCCAAG ATGACCGCCA CCTTCCTGAG CAAGAAACAA 1140
GAGGTGAACA TGAGCGACAG CGCCCTGGAC TGGGTGAGGG ACGAGGCCAT CAACAAGCTG 1200
CAGCAGATCT TCAACACCAG CTACAACCAG ACCTACGAGA AGTACGAAA CGTGTCCTG 1260
TTCGAGACAA GCGGCGGACT GGTGGTGTTC TGGCAGGGCA TCAAGCAGAA GTCCCTGGTC 1320
GAGCTGGAGA GGCTGGCCAA CAGGTCCAGC CTGAACATCA CCCACACCAC CCAGACCAGC 1380
ACCAGCGACA ACAACACCAC ACACCTGAGC AGCATGGAAA GCGTGACAA CCTGGTGTAT 1440
GCCCAGCTGC AGTTCACCTA CGACACCTG AGGGGCTACA TCAACAGAGC CCTGGCCAG 1500
ATCGCCGAGG CTTGGTGCGT GGACCAGAGA AGGACCTGG AGGTGTTCAA GGAAGTGTCC 1560
AAGATCAACC CCAGCGCCAT CCTGAGCGCC ATCTACAACA AGCCAATCGC CGCCAGATTC 1620
ATGGGCGACG TGCTGGGCCT GGCCAGCTGC GTGACCATCA ACCAGACCAG CGTGAAGGTG 1680
CTGCGGGACA TGAACGTGAA GGAAAGCCCA GGCCGCTGCT ACTCCAGGCC CGTGGTGATC 1740
TTCAACTTCG CCAACAGCTC CTACGTGCAG TACGGCCAGC TGGCCGAGGA CAACGAGATC 1800
CTGCTGGGAA ACCACAGGAC CGAGGAATGC CAGCTGCCCC GCCTGAAGAT CTTTATCGCC 1860
GGCAACTCCG CCTACGAGTA CGTGGACTAC CTGTTCAAGA GGATGATCGA CCTGTCCAGC 1920
ATCAGCACCG TGGACAGCAT GATCGCCCTG GATATCGATC CCCTGGAGAA CACCGACTTC 1980
AGGGTGCTGG AGCTGTACTC CCAGAAGGAA CTGAGGTCCA GCAACGTGTT CGACCTGGAG 2040
GAAATCATGA GAGAGTTCAA CAGCTACAAG CAGCGCGTGA AGTACGTGGA GGACAAGAGG 2100
CTGGCCACCC AGCCCTGCA GAACCTGTTT CCTACCTGG TGTCCGCCGA CGGCACCACC 2160
GTGACCAGCG GCTCCACCAA GGACACCAGC CTGCAGGCC CTCCAGCTA CGAGGAAAGC 2220
GTGTACAACA GCGGCAGGAA GGGCGGCCAG AAGCCCAACC TGCTGGACAG GCTGAGGCAC 2280
AGGAAGAACG GCTACAGGCA CCTGAAGGAC AGCGACGAGG AAGAAAACGT G

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 9

```

ATGGAGAGCA GGATCTGGTG CCTGGTGGTG TGGGTGAACC TGTGCATCGT GTGCCTGGGA 60
GCCGCCGTGA GCAGCAGCAG CACCTCCCAC GCCACCTCCA GCACCCACAA CGGCAGCCAC 120
ACCAGCAGGA CCACCTCCGC CCAGACCAGA AGCGTGTACA GCCAGCACGT GACCTCTTCC 180
GAGGCCGTGA GCCACAGGGC CAACGAGACA ATCTACAACA CCACCCTGAA GTACGGCGAC 240
GTGGTGGGAG TGAACACCAC CAAGTACCCC TACAGAGTGT GCAGCATGGC CCAGGGCACC 300
GACCTGATCA GATTCGAGCG GAACATCATC TGCACCAGCA TGAAGCCCAT CAACGAGGAC 360
CTGGACGAGG GCATCATGGT GGTGTACAAG AGGAACATCG TGGCCACAC CTTCAAGGTC 420
CGCGTGTACC AGAAGGTGCT GACCTTCAGG CGGAGCTACG CCGGCCACAG GACCACCTAC 480
CTGTGGGCA GCAACACCGA GTACGTGGCC CCACCCATGT GGGAGATCCA CCACATCAAC 540
AAGTTCGCCC AGTGCTACAG CAGCTACAGC CGCGTGATCG GCGGCACCGT GTTCGTGGCC 600
TACCACAGGG ACAGCTACGA GAACAAGACC ATGCAGCTGA TCCCGACGA CTACAGCAAC 660
ACCCACAGCA CCAGATACGT GACCGTGAAG GACCAAGTGG ACAGCAGGGG CAGCACCGCC 720
TTCCACAGAG AGACATGCAA CCTGAACTGC ATGCTGACCA TCACCACCGC CAGAAGCAAG 780
TACCTTTAOC ACTTCTTCGC CACCTCTAOC GGGGACGTGG TGTACATCAG CCCCTTCTAC 840
AACGGCACCA ACAGGAACGC CAGCTACTTC GGCAGGAACG CCGACAAGTT CTTTATCTTC 900
CCCAACTACA CCATCGTGTG CGACTTCGGC AGGCCCAACG CTGCCCCCGA GACACACAGA 960
CTGGTGGCCT TTCTGGAGAG GGCCGACAGC GTGATCAGCT GGGACATCCA GGACGAGAAG 1020
AACGTGACCT GCCAGCTGAC CTTCTGGGAG GCCAGCGAGA GGACCATCAG AAGCGAGGCC 1080
GAGGACAGCT ACCACTTCAG CAGCGCCAAG ATGACCGCCA CCTTCCTGAG CAAGAAACAA 1140
GAGGTGAACA TGAGCGACAG CGCCCTGGAC TGCCTGAGGG ACGAGGCCAT CAACAAGCTG 1200
CAGCAGATCT TCAACACCAG CTACAACCAG ACCTACGAGA AGTACGAAA CGTGTCCGTG 1260
TTCGAGACAA GCGGCGGACT GGTGGTGTTC TGGCAGGGCA TCAAGCAGAA GTCCCTGGTC 1320
GAGCTGGAGA GGCTGGCCAA CAGGTCCAGC CTGAACATCA CCCACACCAC CCAGACCAGC 1380
ACCAGCGACA ACAACACCAC ACACCTGAGC AGCATGGAAA GCGTGCACAA CCTGGTGTAT 1440
GCCAGCTGC AGTTCACCTA CGACACCTTG AGGGGCTACA TCAACAGAGC CCTGGCCAG 1500
ATCGCCGAGG CTTGGTGCCT GGACCAGAGA AGGACCTGG AGGTGTTCAA GGAACGTGTC 1560
AAGATCAACC CAGCGCCAT CCTGAGCGCC ATCTACAACA AGCCAATCGC CGCCAGATTC 1620
ATGGGCGACG TGCTGGGCCT GGCCAGCTGC CTGACCATCA ACCAGACCAG CGTGAAGGTG 1680
CTGCGGGACA TGAACGTGAA GGAAAGCCCA GGCCGCTGCT ACTCCAGGCC CGTGGTGATC 1740
TTCAACTTCG CCAACAGCTC CTACGTGCAG TACGGCCAGC TGGGCGAGGA CAACGAGATC 1800
CTGCTGGGAA ACCACAGGAC CGAGGAATGC CAGCTGCCCA GCCTGAAGAT CTTTATCGCC 1860
GGCAACTCCG CCTACGAGTA CGTGGACTAC CTGTTCAAGA GGATGATCGA CCTGTCCAGC 1920
ATCAGCACCG TGGACAGCAT GATCGCCCTG GATATCGATC CCCTGGAGAA CACCGACTTC 1980
AGGGTGCTGG AGCTGTACTC CCAGAAAGGAA CTGAGGTCCA GCAACGTGTT CGACCTGGAG 2040
GAAATCATGA GAGAGTTCAA CAGCTACAAG CAGCGCGTGA AGTACGTGGA GGACAAGGTG 2100
GTGGACCCCC TGCCCCCCTA CCTGAAGGGC CTGGACGACC TGATGAGCGG ACTCGGGGCT 2160
GCTGGAAGG CC

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 10

```

MESRIWCLVV CVNLCIVCLG AAVSSSSTSH ATSTHNGSH TSRTTSAQTR SVYSQHVTSS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVNNTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTPKV RVYQKVLTFR RSYAGHRTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KFAQCYSSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTA 240
FHRETCNLNC MLTITTARSK YPYHFFATST GDVVYISPFY NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTQQLTFWE ASERTIRSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEAINKL QQIFNTSYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHTTQTS TSDNNTTHLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEAWCVDQR RTLEVEKELS KINPSAILS A IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRD MNVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQ LGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLPSLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVD SMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKV VDPLPPYLKG LDDLMSG LGA 720
AGKA

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 11

```

ATGGAGAGCA GGATCTGGTG CCTGGTGGTG TGGTGAACC TGTGCATCGT GTGCCTGGGA 60
GCCGCCGTGA GCAGCAGCAG CACCTCCCAC GCCACCTCCA GCACCCACAA CGGCAGCCAC 120
ACCAGCAGGA CCACCTCCGC CCAGACCAGA AGCGTGTACA GCCAGCACGT GACCTCTTCC 180
GAGGCCSTGA GCCACAGGGC CAACGAGACA ATCTACAACA CCACCCTGAA GTACGGCGAC 240
GTGGTGGGAG TGAACACCAC CAAGTACCCC TACAGAGTGT GCAGCATGGC CCAGGGCACC 300
GACCTGATCA GATTGAGCG GAACATCATC TGCACCAGCA TGAAGCCCAT CAACGAGGAC 360
CTGGACGAGG GCATCATGGT GGTGTACAAG AGGAACATCG TGGCCACAC CTTCAAGGTC 420
CGCGTGTACC AGAAGGTGCT GACCTTCAGG CGGAGCTACG CCGGCCACAG GACCACCTAC 480
CTGCTGGGCA GCAACACCGA GTACGTGGCC CCACCCATGT GGGAGATCCA CCACATCAAC 540
AAGTTGCCCC AGTGCTACAG CAGCTACAGC CGCGTATCG CGGCACCGT GTTCGTGGCC 600
TACCACAGGG ACAGCTACGA GAACAAGACC ATGCAGCTGA TCCCCGACGA CTACAGCAAC 660
ACCCACAGCA CCAGATACGT GACCGTGAAG GACCACTGGC ACAGCAGGGG CAGCACCGCC 720
TTCCACAGAG AGACATGCAA CCTGAACTGC ATGCTGACCA TCACCACCGC CAGAAGCAAG 780
TACCTTACC ACTTCTTCGC CACCTCTACC GGGGACGTGG TGTACATCAG CCCCTTCTAC 840
AACGGCACCA ACAGGAACGC CAGCTACTTC GGGGAGAACG CCGACAAGTT CTTTATCTTC 900
CCCAACTACA CCATCGTGTG CCACTTCGGC AGGCCCCAAG CTGCCCCCGA GACACACAGA 960
CTGGTGGCCT TTCTGGAGAG GGCCGACAGC GTGATCAGCT GGGACATCCA GGACGAGAAG 1020
AACGTGACCT GCCAGCTGAC CTTCTGGGAG GCCAGCGAGA GGACCATCAG AAGCGAGGCC 1080
GAGGACAGCT ACCACTTCAG CAGCGCCAAG ATGACCGCCA CCTTCTGAG CAAGAAACAA 1140
GAGGTGAACA TGAGCGACAG CGCCCTGGAC TGGTGAAGG ACGAGGCCAT CAACAAGCTG 1200
CAGCAGATCT TCAACACCAG CTACAACCAG ACCTACGAGA AGTACGAAA CGTGTCCGTG 1260
TTCGAGACAA GCGGCGGACT GGTGGTGTTC TGGCAGGGCA TCAAGCAGAA GTCCCTGGTC 1320
GAGCTGGAGA GGCTGGCCAA CAGGTCCAGC CTGAACATCA CCCACACCAC CCAGACCAGC 1380
ACCAGCGACA ACAACACCAC ACACCTGAGC AGCATGGAAA GCGTGCACAA CCTGGTGTAT 1440
GCCCAGCTGC AGTTCACCTA CGACACCCCTG AGGGGCTACA TCAACAGAGC CCTGGCCCAG 1500
ATCGCCGAGG CTTGGTGGCT GGACCAGAGA AGGACCCTGG AGGTGTTCAA GGAAGTGTCC 1560
AAGATCAACC CCAGCGCCAT CCTGAGCGCC ATCTACAACA AGCCAATCGC CGCCAGATTC 1620
ATGGGCGAGC TGCTGGGCCT GGCCAGCTGC GTGACCATCA ACCAGACCAG CGTGAAGGTG 1680
CTGCCGGACA TGAACGTGAA GGAAAGCCCA GGCCGCTGCT ACTCCAGGCC CGTGGTGATC 1740
TTCAACTTCG CCAACAGCTC CTACGTGCAG TACGGCCAGC TGGGCGAGGA CAACGAGATC 1800
CTGCTGGGAA ACCACAGGAC CGAGGAATGC CAGCTGCCCA GCCTGAAGAT CTTTATCGCC 1860
GGCAACTCCG CCTACGAGTA CGTGGACTAC CTGTTCAAGA GGATGATCGA CCTGTCCAGC 1920
ATCAGCACCG TGGACAGCAT GATCGCCCTG GATATCGATC CCCTGGAGAA CACCGACTTC 1980
AGGGTGCTGG AGCTGTACTC CCAGAAGGAA CTGAGGTCCA GCAACGTGTT CGACCTGGAG 2040
GAAATCATGA GAGAGTTCAA CAGCTACAAG CAGCGCGTGA AGTACGTGGA GGACAAGAGG 2100
CTGGCCACCC AGCCCCTGCA GAACCTGTTC CCTACCTGG TGTCCGCCGA C

```

FIG. 16 (Cont.)

SEC. ID NO: 12

```

MESRIWCLV CVNLICIVCLG AAVSSSSTSH ATSSSTHNGSH TSRTTSAQTR SVYSQHVTS 60
EAVSHRANET IYNTTLKYGD VVGVTTKYP YRVCSMAQGT DLIRFERNII CTSMKPINED 120
LDEGIMVVYK RNIVAHTFKV RVYQKVLTFR RSYAGHRTTY LLGSNTEYVA PPMWEIHHIN 180
KFAQCYSSYS RVIGGTVFVA YHRDSYENKT MQLIPDDYSN THSTRYVTVK DQWHSRGSTA 240
FHRETCLNLC MLTITTARSK YPYHEFFATST GDVYVISPFI NGTNRNASYF GENADKFFIF 300
PNYTIVSDFG RPNAAPETHR LVAFLERADS VISWDIQDEK NVTCQLTFWE ASERTIRSEA 360
EDSYHFSSAK MTATFLSKKQ EVNMSDSALD CVRDEATINKL QQIFN7SYNQ TYEKYGNVSV 420
FETSGGLVVF WQGIKQKSLV ELERLANRSS LNITHTTQTS TSDNN7THLS SMESVHNLVY 480
AQLQFTYDTL RGYINRALAQ IAEAWCVDQR RTLEVFKELS KINPSAILS A IYNKPIAARF 540
MGDVLGLASC VTINQTSVKV LRDMNVKESP GRCYSRPVVI FNFANSSYVQ YGQLGEDNEI 600
LLGNHRTEEC QLPCLKIFIA GNSAYEYVDY LFKRMIDLSS ISTVDSMIAL DIDPLENTDF 660
RVLELYSQKE LRSSNVFDLE EIMREFNSYK QRVKYVEDKR LATQPLQNLF PYLVSAD

```

SEC. ID NO: 13

```

ATGGAATCCC GGATCTGGTG CCTGGTGGTG TGGTGAACC TGTGCATCGT GTGCCTGGCC 60
CTGGCCAGCC ACCGGGCCAA CGAGACAATC TACAACACCA CCCTGAAGTA CGGCGACGTG 120
GTGGGAGTGA ACACCACCAA GTACCCCTAC AGAGTGTGCT CCATGGCCCA GGGCACCAG 180
CTGATCAGAT TCGAGCGGAA CATCATCTGC ACCAGCATGA AGCCCATCAA CGAGGACCTG 240
GACGAGGGCA TCATGGTGGT GTACAAGAGG AACATCGTGG CCCACACCTT CAAGGTCCGC 300
GTGTACCAGA AGGTGCTGAC CTTAGGCGG AGCTACGCCG GCCACAGGAC CACCTACCTG 360
CTGGGCAGCA ACACCGAGTA CGTGGCCCCA CCCATGTGGG AGATCCACCA CATCAACAAG 420
TTCGCCCAGT GCTACAGCAG CTACAGCCGC GTGATCGGCG GCACCGTGT CGTGGCCTAC 480
CACAGGGACA GCTACGAGAA CAAGACCATG CAGCTGATCC CCGACGACTA CAGCAACACC 540
CACAGACACA GATAGTGAC CGTGAAGGAC CAGTGGCACA GCAGGGGCGAG CACCGCCTTC 600
CACAGAGAGA CATGCAACCT GAAGTGCATG CTGACCATCA CCACCGCCAG AAGCAAGTAC 660
CCTTACCCT TCTTCGCCAC CTCTACCGGG GACGTGGTGT ACATCAGCCC CTTCTACAAC 720
GGCACCAACA GGAACGCCAG CTACTTCGGC GAGAACGCCG ACAAGTTCTT CATCTTCCCC 780
AACTACACCA TCGTGTCCGA CTTCCGCGAG CCCAACGCTG CCCCCGAGAC ACACAGACTG 840
GTGGCCTTTC TGGAGAGGGC CGACAGCGTG ATCAGCTGGG ACATCCAGGA CGAGAAGAAC 900
GTGACCTGCC AGCTGACCTT CTGGGAGGCC AGCGAGAGGA CCATCAGAAG CGAGGCCGAG 960
GACAGCTACC ACTTCAGCAG CGCCAGATG ACCGCCACCT TCCTGAGCAA GAAACAAGAG 1020
GTGAACATGA GCGACAGCGC CTTGGACTGC GTGAGGGACG AGGCCATCRA CAAGCTGCAG 1080
CAGATCTTCA ACACCAGCTA CAACCAGACC TACGAGAAGT ACGGAAACGT GTCCGTGTTT 1140
GAGACAAGCG GCGGACTGGT GGTGTTCTGG CAGGGCATCA AGCAGAAAGT CCTGGTCGAG 1200
CTGGAGAGGC TGGCCAACAG GTCCAGCCTG AACATCACCC ACACCACCCA GACCAGCACC 1260
AGCGACACCA ACACCACACA CCTGAGCAGC ATGGAAGCG TGCACAACCT GGTGTATGCC 1320
CAGCTGCAGT TCACCTACGA CACCCTGAGG GGCTACATCA ACAGAGCCCT GGCCAGATC 1380
GCCGAGGCTT GGTGCGTGA CCAGAGAAGG ACCCTGGAGG TGTTCAGGA ACTGTCCAAG 1440
ATCAACCCCC GCGCCATCCT GAGCGCCATC TACAACAAGC CAATCGCCGC CAGATTCATG 1500
GGCGACGTGC TGGGCCCTGGC CAGCTGCGTG ACCATCAACC AGACCAGCGT GAAGGTGCTG 1560
CGGGACATGA ACCTGAAGCA AAGCCCAGGC CGCTGCTACT CCAGGCCCGT GGTGATCTTC 1620
AACTTCGCCA ACAGCTCCTA CGTGCACTAC GGCCAGCTGG GCGAGGACAA CGAGATCCTG 1680
CTGGGAAACC ACAGGACCGA GGAATGCCAG CTGCCAGCC TGAAGATCTT TATCGCCGGC 1740
AACTCCGCTT ACGAGTACGT GGAATACCTT TTCAAGAGGA TGATCGACCT GTCCAGCATC 1800
AGCACCGTGG ACAGCATGAT CGCCCTGGAT ATCGATCCCC TGGAGAACAC CGACTTCAGG 1860
GTGCTGGAGC TGTACTCCCA GAAGGAAGTG AGGTCCAGCA ACGTGTTCGA CCTGGAGGAA 1920
ATCATGACAG AGTTCAACAG CTACAAGCAG CCGGTGAAGT ACGTCCAGGA CAAGGTGGTG 1980
GACCCCTGC CCCCCTACCT GAAGGGCCTG GACGACCTGA TGAGCGGACT CGGGCTGCT 2040

```

FIG. 16 (Cont.)

GGAAAGGCC

SEC. ID NO: 14

MESRIWCLV CVNLCIVCLA LASHRANETI YNTTLKYGDV VGVNTTKYPY RVCSMAQGTG 60
 LIRFERNIIC TSMKPINEDL DEGIMVVYKR NIVAHTFKVR VYQKVLTFRR SYAGHRTTYL 120
 LGSNTEYVAP PMWEIHHINK FAQCYSSYSR VIGGTVFVAY HRDSYENKTM QLIPDDYSNT 180
 HSTRYVTVKD QWHSRGSTAF HRETCNLNCM LTITTARSKY PYHFFATSTG DVVYISPFFYN 240
 GTNRNASYFG ENADKFFIFP NYTIVSDFGR PNAAPETHRL VAFLEADSV ISWDIQDEKN 300
 VTCQLTFWEA SERTIRSEAE DSYHFSSAKM TATFLSKKQE VNMSDSALDC VRDEAINKLQ 360
 QIENTSYNQT YEKYGNVSVF ETSGGLVVFVW QGIKQKSLVE LERLANRSSL NITHTTQTST 420
 SDNNTTHLSS MESVHNLVYA QLQFTYDTLR GYINRALAQI AEAWCVDQRR TLEVFKELSK 480
 INPSAILSAI YNKPLAAREM GDVLGLASCV TINQTSVKVL RDMNVKESPG RCYSRPVVIF 540
 NFANSSYVQY GQLGEDNEIL LGNHRTEBCQ LPSLKIFIAF NSAYEYVDYL FKRMLDLSSI 600
 STVDSMIALD IDPLENTDFR VLELYSQKEL RSSNVFDLEE IMREFNSYKQ RVKYVEDKV 660
 DPLPPYLKGL DDLMSGLGAA GKA

SEC. ID NO: 15

ATGGAATCCC GGATCTGGTG CCTGGTGGTG TGGCTGAACC TGTGCATCGT GCTCCTGGGA 60
 GCCCTGGCCC ACCGGGCCAA CGAGACAATC TACAACACCA CCCTGAAGTA CGGCGACGTG 120
 GTGGGAGTGA ACACCACCAA GTACCCCTAC AGAGTGTGCT CCATGGCCCA GGGCACCAGC 180
 CTGATCAGAT TCGAGCGGAA CATCATCTGC ACCAGCATGA AGCCCATCAA CGAGGACCTG 240
 GACGAGGGCA TCATGGTGGT GTACAAGAGG AACATCGTGG CCCACACCTT CAAGGTCCGC 300
 GTGTACCAGA AGGTGCTGAC CTTACGGCGG AGCTACGCGG GCCACAGGAC CACCTACCTG 360
 CTGGGCAGCA ACACCGAGTA CGTGGCCCCA CCCATGTGGG AGATCCACCA CATCAACAAG 420
 TTCGCCAGT GCTACAGCAG CTACAGCCGC GTGATCGGCG GCACCGTGT TGTGGCCTAC 480
 CACAGGGACA GCTACGAGAA CAAGACCATG CAGCTGATCC CCGACGACTA CAGCAACACC 540
 CACAGCACCA GATACGTGAC CGTGAAGGAC CAGTGGCACA GCAGGGGCG CACCGCCTTC 600
 CACAGAGAGA CATGCAACCT GAACTGCATG CTGACCATCA CCACCGCCAG AAGCAAGTAC 660
 CCTTACCACT TCTTCGCCAC CTCTACCGGG GACGTGGTGT ACATCAGCCC CTTCTACAA 720
 GGCACCAACA GGAACGCCAG CTACTTCGGC GAGAACGCCG ACAAGTTCTT CATCTTCCCC 780
 AACTACACCA TCGTGTCCGA CTTCCGGCAGG CCCAACGCTG CCCCCGAGAC ACACAGACTG 840
 GTGGCCTTTC TGGAGAGGGC CGACAGCGTG ATCAGCTGGG ACATCCAGGA CGAGAAGAAC 900
 GTGACCTGCC AGCTGACCTT CTGGGAGGCC AGCGAGAGGA CCATCAGAAG CGAGGCCGAG 960
 GACAGCTACC ACTTCAGCAG CGCCAAGATG ACCGCCACCT TCCTGAGCAA GAAACAAGAG 1020
 GTGAACATGA GCGACAGCGC CCTGGACTGC GTGAGGGACG AGGCCATCAA CAAGCTGCAG 1080
 CAGATCTTCA ACACCAGCTA CAACCAGACC TACGAGAAGT ACGGAAACGT GTCCGTGTTC 1140
 GAGACAAGCG GCGGACTGGT GGTGTTCTGG CAGGGCATCA AGCAGAAGTC CCTGGTCGAG 1200
 CTGGAGAGGC TGGCCAACAG GTCCAGCCTG AACATCACCC ACACCACCCA GACCAGCACC 1260
 AGCGACAACA ACACCACACA CCTGAGCAGC ATGGAAAGCG TGCACAACCT GGTGTATGCC 1320
 CAGCTGCAGT TCACCTACGA CACCTGAGG GGCTACATCA ACAGAGCCCT GGCCAGATC 1380
 GCCGAGGCTT GGTGCGTGGA CCAGAGAAGG ACCCTGGAGG TGTTCAGGA ACTGTCCAAG 1440
 ATCAACCCCA GCGCCATCCT GAGCGCCATC TACAACAAGC CAATCGCCGC CAGATTCATG 1500
 GGCGACGTGC TGGGCCCTGGC CAGCTGCGTG ACCATCAACC AGACCAGCGT GAAGGTGCTG 1560
 CGGGACATGA ACGTGAAGGA AAGCCCAGGC CGCTGCTACT CCAGGCCCGT GGTGATCTTC 1620
 AACTTCGCCA ACAGCTCCTA CGTGCACTAC GGCCAGCTGG CCGAGGACAA CGAGATCCTG 1680
 CTGGGAAACC ACAGGACCGA GGAATGCCAG CTGCCAGGCC TGAAGATCTT TATCGCCGGC 1740

FIG. 16 (Cont.)

AACTCCGCCT ACCAGTACGT GGACTACCTG TTCAAGAGGA TGATCGACCT GTCCAGCATC 1800
 AGCACCGTGG ACAGCATGAT CGCCCTGGAT ATCGATCCCC TGGAGAACAC CGACTTCAGG 1860
 GTGCTGGAGC TGTACTCCCA GAAGGAAGT AGGTCCAGCA ACGTGTTCGA CCTGGAGGAA 1920
 ATCATGAGAG AGTTCAACAG CTACAAGCAG CGCGTGAAGT ACGTGGAGGA CAAGGTGGTG 1980
 GACCCCTGCG CCCCTACCT GAAGGGCCTG GACGACCTGA TGAGCGGACT CGGGGCTGCT 2040
 GGAAAGGCC

SEC. ID NO: 16

MESRIWCLVV CVNLCIVLLG ALAHRANETI YNTTLKYGDV VGVNTTKYPY RVCSMAQGTG 60
 LIRFERNIIC TSMKPINEDL DEGIMVVYKR NIVAHTFKVR VYQKVLTFRR SYAGHRTTYL 120
 LGSNTEYVAP PMWEIHHINK FAQCYSSYSR VIGGTVFVAY HRDSYENKTM QLIPDDYSNT 180
 HSTRYVTVKD QWHSRGSTAF HRETCNLNCM LTITTARSKY PYHFFATSTG DVVYISPFYN 240
 GTNRNASYFG ENADKFFIFP NYTIVSDFGR PNAAPETHRL VAFLEADSV ISWDIQDEKN 300
 VTCOLTFWEA SERTIRSEAE DSYHFSSAKM TATFLSKKOE VNMSDSALDC VRDEAINKLO 360
 QIFNTSYNQT YEKYGNVSVF ETSGGLVVFVW QGIKQKSLVE LERLANRSSL NITHTTQTST 420
 SDNNTTHLSS MESVHNLVYA QLQFTYDTLR GYINRALAQI AEAWCVDQRR TLEVFKELSK 480
 INPSAILSAI YNKPIAAREM GDVLGLASCV TINQTSVKVL RDMNVKESPG RCYSRPVVIF 540
 NFANSSYVQY GQLGEDNEIL LGNHRTEECQ LPSLKIFIAG NSAYEYVDYL FKRMLDLSSI 600
 STVDSMIALD IDPLENTDFR VLELYSQKEL RSSNVFDLEE IMREFNSYKQ RVKYVEDKV 660
 DPLPPYLKGL DDLMSGLGAA GKA

SEC. ID NO: 17

ATGGCCCCC TGCTGCTTCT GCTGCCCCCTG CTTTGGGCAG GGGCCCTGGC CCACCGGGCC 60
 AACGAGACAA TCTACAACAC CACCCCTGAAG TACGGCGACG TGGTGGGAGT GAACACCACC 120
 AAGTACCCCT ACAGAGTGTG CTCCATGGCC CAGGGCACCG ACCTGATCAG ATTCGAGCGG 180
 AACATCATCT GCACCAGCAT GAAGCCCATC AACGAGGACC TGGACGAGGG CATCATGGTG 240
 GTGTACAGA GGAACATCGT GGCCACACACC TTCAAGGTCC GCGTGTACCA GAAGGTGCTG 300
 ACCTTCAGGC GGAGCTACGC CGGCCACAGG ACCACCTACC TGCTGGGCAG CAACACCAG 360
 TACGTGGCCC CACCCATGTG GGAGATCCAC CACATCAACA AGTTCGCCCCA GTGCTACAGC 420
 AGCTACAGCC GCGTGATCGG CGGCACCGTG TTCGTGGCCT ACCACAGGGA CAGCTACGAG 480
 AACAAAGACCA TGCAGCTGAT CCCCCACGAC TACAGCAACA CCCACAGCAC CAGATACGTG 540
 ACCGTGAAGG ACCAGTGGCA CAGCAGGGGC AGCACCGCCT TCCACAGAGA GACATGCAAC 600
 CTGAAGTGCA TGCTGACCAT CACCACCGCC AGAAGCAAGT ACCCTTACCA CTTCTTCGCC 660
 ACCTCTACCG GGGACGTGGT GTACATCAGC CCCTTCTACA ACGGCACCAA CAGGAACGCC 720
 AGCTACTTCG GCGAGAACGC CGACAAGTTC TTCATCTTCC CCAACTACAC CATCGTGTCC 780
 GACTTCGGCA GGCCCAACGC TGCCCCCGAG ACACACAGAC TGGTGGCCTT TCTGGAGAGG 840
 GCCGACAGCG TGATCAGCTG GGACATCCAG GACGAGAAGA ACGTGACCTG CCAGCTGACC 900
 TTCTGGGAGG CCAGCGAGAG GACCATCAGG AGCGAGGCCG AGGACAGCTA CCACTTCAGC 960
 AGCGCCAAGA TGACCGCCAC CTTCCTGAGC AAGAAACAAG AGGTGAACAT GAGCGACAGC 1020
 GCCCTGGACT GCGTGAGGGA CGAGGCCATC AACAAAGCTGC AGCAGATCTT CAACACCAGC 1080
 TACAACCAGA CCTACGAGAA GTACGGAAAC GTGTCCGTGT TCGAGACAAG CGGCGGACTG 1140
 GTGGTGTCTT GGCAGGGCAT CAAGCAGAAG TCCCTGGTCG AGCTGGAGAG GCTGGCCAAC 1200
 AGGTCCAGCC TGAACATCAC CCACACCACC CAGACCAGCA CCAGCGACAA CAACACCACA 1260
 CACCTGAGCA CCATGGAAAG CGTGACAAAC CTGGTGTATG CCCAGCTGCA GTTCACCTAC 1320
 GACACCCTGA GGGGCTACAT CAACAGAGCC CTGGCCCGAGA TCGCCGAGGC TTGGTGCGTG 1380
 GACCAGAGAA GGACCCTGGA GGTGTTCAAG GAACTGTCCA AGATCAACCC CAGCGCCATC 1440
 CTGAGCGCCA TCTACAACAA GCCAATCGCC GCCAGATTCA TGGGCGACGT GCTGGGCCTG 1500
 GCCAGCTGCG TGACCATCAA CCAGACCAGC GTGAAGGTGC TGCGGGACAT GAACGTGAAG 1560

FIG. 16 (Cont.)

GAAAGCCCAG GCGGCTGCTA CTCCAGGCCG GTGGTGATCT TCAACTTCGC CAACAGCTCC 1620
TACGTGCAGT ACGGCCAGCT GGGCGAGGAC AACGAGATCC TGCTGGGAAA CCACAGGACC 1680
GAGGAATGCC AGCTGCCCAG CCTGAAGATC TTTATCGCCG GCAACTCCGC CTACGAGTAC 1740
GTGGACTACC TGTTCAGAG GATGATCGAC CTGTCCAGCA TCAGCACCCT GGACAGCATG 1800
ATCGCCCTGG ATATCGATCC CCTGGAGAAC ACCGACTTCA GGGTGCTGGA GCTGTACTCC 1860
CAGAAGGAAC TGAGGTCCAG CAACGTGTTT GACCTGGAGG AAATCATGAG AGAGTTCAAC 1920
AGCTACAAGC AGCGCGTGAA GTACGTGGAG GACAAGGTGG TGGACCCCTT GGGCCCTTAC 1980
CTGAAGGGCC TGGACGACCT GATGAGCGGA CTCGGGGCTG CTGGAAAGGC C

SEC. ID NO: 18

MAPLLLLLPL LWAGALAHRA NETIYNTTLK YGDVVGVTNT KYPYRVCSMA QGTDLIRFER 60
NIICTSMKPI NEDLDEGIMV VYKRNIWAHT FKVRVYQKVL TFRRSYAGHR TTYLLGSNTE 120
YVAPPMWEIH HINKFAQCYS SYSRVIGGTV FVAYHRDSYE NKTMLIPDD YSNTHSTRYV 180
TVKDQWHSRG STAFHRETCN LNCMLTITTA RSKYPYHFFA TSTGDIVVYIS PFYNGTNRNA 240
SYFGENADKF FIFPNYTIIVS DFGRPNAAPE THRLVAFLEA ADSVISWDIQ DEKNVTCQLT 300
FWEASERTIR SEAESDYHFS SAKMTATFLS KKQEVNMSDS ALDCVRDEAI NKLOQIFNTS 360
YNQTYEKYGN VSVFETSGGL VVPWQGIKQK SLVELERLAN RSSLNITHTT QTSTSDNNTT 420
HLSSMESVHN LVYAQLQFTY DTLRGYINRA LAQIAEAWCV DQRTLEVFK ELKINPSAI 480
LSAIYNKPIA ARFMGDVLGL ASCVTINQTS VKVLKDMNVK ESPGRCYSRP VVIFNFANSS 540
YVQYQQLGED NEILLGNHRT EECQLPSLKI FIAGNSAYEY VDYLFRKID LSSISTVDSM 600
IALDIDPLEN TDFRVLELYS QKELRSSNVF DLEEMREFN SYKQVVKYVE DKVVDPLPPY 660
LKGIDDIMSG LGAAGKA

SEC. ID NO: 19

SHRANETI YNTTLKYGDV VGVNTTKYPY RVCSMAQGTD
LIRFERNIIC TSMKPINEDL DEGIMVYKVR NIVAHTFKVR VYQKVLTFRR SYAGHRTTYL
LGSNTEYVAP PMWEIHHINK FAQCYSSYSR VIGGTVFBAY HRDSYENKTM QLIPDDYSNT
HSTRYVTVDK QWHSRGSTAF HRETCNLNLCM LTITTARSKY PYHFFATSTG DVVYISPFYN
GTNRNASYFG ENADKFFIFP NYTIVSDFGR PNAAPETHRL VAFLEADSV ISWDIQDEKN
VTCQLTFWEA SERTIRSEAE DSYHFSSAKM TATFLSKKQE VNMSDSALDC VRDEAINKLQ
QIFNTSYNQY YEKYGNVSVF ETSGGLVVFVW QGIKQKSLVE LERLANRSSL NITHTTQTST
SDNNTTHLSS MESVHNLVYA QLQFTYDTLR GYINRALAQI AEAWCVDQRR TLEVFKELSK
INPSAILSAL YNKPIAARFM GDVLGLASCV TINQTSVKVL RDMNVKESPG RCYSRPVVIF
NFANSSYVQY QQLGEDNEIL LGNHRTEECQ LPSLKIFIAG NSAYEYVDYL FRKIDLSSI
STVDSMIALD IDPLENTDFR VLELYSQKEL RSSNVFDLEE IMREFNSYKQ RVKYVEDKVV
DPLPPYLKGL DDIMSGLGAA GKA

SEC. ID NO: 20

SHRANETI YNTTLKYGDV VGVNTTKYPY RVCSMAQGTD
LIRFERNIIC TSMKPINEDL DEGIMVYKVR NIVAHTFKVR VYQKVLTFRR SYAGHRTTYL
LGSNTEYVAP PMWEIHHINK FAQCYSSYSR VIGGTVFBAY HRDSYENKTM QLIPDDYSNT
HSTRYVTVDK QWHSRGSTAF HRETCNLNLCM LTITTARSKY PYHFFATSTG DVVYISPFYN
GTNRNASYFG ENADKFFIFP NYTIVSDFGR PNAAPETHRL VAFLEADSV ISWDIQDEKN
VTCQLTFWEA SERTIRSEAE DSYHFSSAKM TATFLSKKQE VNMSDSALDC VRDEAINKLQ

FIG. 16 (Cont.)

QIFNTSYNQT YEKYGNVSVF ETSGGLVFW QGIKQKSLVE LERLANRSSL NITHTTQTST
SDNNTTHLSS MESVHNLVYA QLQFTYDTLR GYINRALAQI AEAWCVDQRR TLEVFKELSK
INPSAILSAI YNKPIAARFM GDVLGLASCV TINQTSVKVL RDMNVKESPG RCYSRPVVIF
NFANSSYVQY GQLGEDNEIL LGNHRTEECQ LPSLKIFIAG NSAYEYVDYL FKRMLDSSI
STVDSMIALD IDPLENTDFR VLELYSQKEL RSSNVFDLEE IMREFNSYKQ RVKYVEDKVV
DPLPPYLKGL DDLMISGLGAA GKA

SEC. ID NO: 21

HRA NETIYNTTLK YGDVVGVTNT KYPYRVCSMA QGTDLIRFER
NIICTSMKPI NEDLDEGIMV VYKRNIVAHT FKVRVYQKVL TFRRSYAGHR TTYLLGSNTE
YVAPPMWEIH HINKFAQCYS SYSRVIGGTV FVAYHRDSYE NKTMQLIPDD YSNTHSTRYV
TVKDQWHSRG STAFHRETCN LNCMLTITTA RSKYPYHFFA TSTGDVVYIS PFYNGTNRNA
SYFGENADKF FIFPNYTIVS DFGRPNAAPE THRLVAFLEA ADSVISWDIQ DEKNVTCQLT
FWEASERTIR SEAEDSYHFS SAKMTATFLS KKQEVNMSDS ALDCVRDEAI NKLQQIFNTS
YNQTYEYKGN VSVFETSGGL VVFWQGIKQK SLVELERLAN RSSLNITHTT QTSTSDNNTT
HLSSMESVHN LVYAQLQFTY DTLRGYINRA LAQIAEAWCV DQRRTLEVFK ELSKINPSAI
LSAIYNKPIA ARFMGDVLGL ASCVTINQTS VKVL RDMNVK ESPGRCYSRP VVIFNFANSS
YVQY GQLGED NEILLGNHRT EECQLPSLKI FIAGNSAYEY VDYL FKRMLD LSSISTVDSM
IALDIDPLEN TDFRVLELYS QKELRSSNVF DLEEIMREFN SYKQRVKYVE DKVVDPLPPY
LKGLDDLMISG LGAAGKA

FIG. 16 (Cont.)

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Blais, Normand
Baudoux, Guy
5 Marchand, Martine

<120> Antígeno Novedoso

10 <130> VB63857

<160> 38

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
15

<210> 1
<211> 906
<212> PRT
<213> AD169 Citomegalovirus
20

<220>
<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 1
25 Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile

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

Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr
 210 215 220
 Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 5 Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr
 245 250 255
 Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp
 260 265 270
 Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser
 10 275 280 285
 Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr
 290 295 300
 Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg
 305 310 315 320
 15 Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile
 325 330 335
 Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser
 340 345 350
 Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser
 20 355 360 365
 Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met
 370 375 380
 Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu
 385 390 395 400
 25 Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly

		405		410		415										
	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
				420					425					430		
	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
5			435					440					445			
	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	His	Arg	Thr	Arg	Arg	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn
			450					455					460			
	Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr
	465					470					475				480	
10	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg
				485							490			495		
	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg	Thr
				500							505			510		
	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu
15			515					520					525			
	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Lys	Pro	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Met	Gly	Asp	Val
			530					535					540			
	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Val	Lys	Val
	545					550					555				560	
20	Leu	Arg	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Glu	Ser	Pro	Gly	Arg	Cys	Tyr	Ser	Arg
				565							570			575		
	Pro	Val	Val	Ile	Phe	Asn	Phe	Ala	Asn	Ser	Ser	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly
				580							585			590		
	Gln	Leu	Gly	Glu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Asn	His	Arg	Thr	Glu
25			595					600					605			

Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala
 610 615 620
 Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser
 625 630 635 640
 5 Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu
 645 650 655
 Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
 660 665 670
 Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
 10 675 680 685
 Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu
 690 695 700
 Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala
 705 710 715 720
 15 Ala Gly Lys Ala Val Gly Val Ala Ile Gly Ala Val Gly Gly Ala Val
 725 730 735
 Ala Ser Val Val Glu Gly Val Ala Thr Phe Leu Lys Asn Pro Phe Gly
 740 745 750
 Ala Phe Thr Ile Ile Leu Val Ala Ile Ala Val Val Ile Ile Thr Tyr
 20 755 760 765
 Leu Ile Tyr Thr Arg Gln Arg Arg Leu Cys Thr Gln Pro Leu Gln Asn
 770 775 780
 Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr Val Thr Ser Gly
 785 790 795 800
 25 Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser Tyr Glu Glu Ser

		805		810		815	
	Val	Tyr	Asn	Ser	Gly	Arg	Lys
					Gly	Pro	Gly
					Pro	Pro	Pro
					Ser	Ser	Asp
					Ala		
		820		825		830	
	Ser	Thr	Ala	Ala	Pro	Pro	Tyr
					Thr	Asn	Glu
					Gln	Ala	Tyr
					Gln	Met	Leu
5		835		840		845	
	Leu	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Asp
					Ala	Glu	Gln
					Arg	Ala	Gln
					Gln	Gln	Asn
					Gly		
		850		855		860	
	Thr	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Gln
					Thr	Gly	Thr
					Gln	Asp	Lys
					Gly	Gln	Lys
	865			870		875	
							880
10	Pro	Asn	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu
					Arg	His	Arg
					Lys	Asn	Gly
					Tyr	Arg	His
		885		890		895	
	Leu	Lys	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu
					Glu	Asn	Val
		900		905			
15	<210>	2					
	<211>	830					
	<212>	PRT					
	<213>	Secuencia Artificial					
20	<220>						
	<223>	AD169 Citomegalovirus					
	<400>	2					
	Met	Glu	Ser	Arg	Ile	Trp	Cys
					Leu	Val	Val
					Cys	Val	Asn
					Leu	Cys	Ile
25	1			5		10	
							15

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

	210		215		220														
	Arg	Tyr	Val	Thr	Val	Lys	Asp	Gln	Trp	His	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr	Trp			
	225					230					235					240			
	Leu	Tyr	Arg	Glu	Thr	Cys	Asn	Leu	Asn	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Thr	Thr			
5					245					250						255			
	Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Pro	Tyr	His	Phe	Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp			
					260					265						270			
	Val	Val	Tyr	Ile	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser			
					275					280						285			
10	Tyr	Phe	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp	Lys	Phe	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr			
					290					295						300			
	Ile	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg			
	305					310					315					320			
	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile			
15					325					330						335			
	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser			
					340					345						350			
	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Ser	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser			
					355					360						365			
20	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met			
					370					375						380			
	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu			
	385					390					395					400			
	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly			
25					405					410						415			

	610		615		620											
	Tyr	Glu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Phe	Lys	Arg	Met	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser
	625					630					635				640	
	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Met	Ile	Ala	Leu	Asp	Ile	Asp	Pro	Leu	Glu
5					645						650				655	
	Asn	Thr	Asp	Phe	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ser	Gln	Lys	Glu	Leu	Arg
					660						665				670	
	Ser	Ser	Asn	Val	Phe	Asp	Leu	Glu	Glu	Ile	Met	Arg	Glu	Phe	Asn	Ser
					675						680				685	
10	Tyr	Lys	Gln	Arg	Val	Lys	Tyr	Val	Glu	Asp	Lys	Arg	Leu	Cys	Thr	Gln
					690						695				700	
	Pro	Leu	Gln	Asn	Leu	Phe	Pro	Tyr	Leu	Val	Ser	Ala	Asp	Gly	Thr	Thr
					705						710				715	
	Val	Thr	Ser	Gly	Ser	Thr	Lys	Asp	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser
15					725						730				735	
	Tyr	Glu	Glu	Ser	Val	Tyr	Asn	Ser	Gly	Arg	Lys	Gly	Pro	Gly	Pro	Pro
					740						745				750	
	Ser	Ser	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Ala	Pro	Pro	Tyr	Thr	Asn	Glu	Gln	Ala
					755						760				765	
20	Tyr	Gln	Met	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Asp	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala
					770						775				780	
	Gln	Gln	Asn	Gly	Thr	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Gln	Thr	Gly	Thr	Gln	Asp
					785						790				795	
	Lys	Gly	Gln	Lys	Pro	Asn	Leu	Leu	Asp	Arg	Leu	Arg	His	Arg	Lys	Asn
25					805						810				815	

Gly Tyr Arg His Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val

820

825

830

<210> 3

5 <211> 830

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 3

Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile

1

5

10

15

15 Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr

20

25

30

Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln

35

40

45

Thr Ser Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser

20

50

55

60

His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp

65

70

75

80

Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met

85

90

95

25 Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr

	100	105	110
	Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val		
	115	120	125
	Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln		
5	130	135	140
	Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Gly His Arg Thr Thr Tyr		
	145	150	155
	Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile		
	165	170	175
10	His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val		
	180	185	190
	Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn		
	195	200	205
	Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr		
15	210	215	220
	Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Ala		
	225	230	235
	Phe His Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr		
	245	250	255
20	Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp		
	260	265	270
	Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser		
	275	280	285
	Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr		
25	290	295	300

Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg
 305 310 315 320
 Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile
 325 330 335
 5 Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser
 340 345 350
 Glu Arg Thr Ile Ser Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser
 355 360 365
 Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met
 10 370 375 380
 Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu
 385 390 395 400
 Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly
 405 410 415
 15 Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln
 420 425 430
 Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg
 435 440 445
 Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Thr Thr Gln Thr Ser Thr Ser Asp Asn
 20 450 455 460
 Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr
 465 470 475 480
 Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg
 485 490 495
 25 Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr

	500	505	510
	Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu		
	515	520	525
	Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val		
5	530	535	540
	Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val		
	545	550	555
	Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg		
	565	570	575
10	Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly		
	580	585	590
	Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu		
	595	600	605
	Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala		
15	610	615	620
	Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser		
	625	630	635
	Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu		
	645	650	655
20	Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg		
	660	665	670
	Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser		
	675	680	685
	Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Arg Leu Cys Thr Gln		
25	690	695	700

Pro Leu Gln Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr
 705 710 715 720
 Val Thr Ser Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser
 725 730 735
 5 Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Pro Gly Pro Pro
 740 745 750
 Ser Ser Asp Ala Ser Thr Ala Ala Pro Pro Tyr Thr Asn Glu Gln Ala
 755 760 765
 Tyr Gln Met Leu Leu Ala Leu Ala Arg Leu Asp Ala Glu Gln Arg Ala
 10 770 775 780
 Gln Gln Asn Gly Thr Asp Ser Leu Asp Gly Gln Thr Gly Thr Gln Asp
 785 790 795 800
 Lys Gly Gln Lys Pro Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn
 805 810 815
 15 Gly Tyr Arg His Leu Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
 820 825 830

<210> 4

<211> 777

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 4

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

Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn
 195 200 205
 Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr
 210 215 220
 5 Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Ala
 225 230 235 240
 Phe His Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr
 245 250 255
 Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp
 10 260 265 270
 Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser
 275 280 285
 Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr
 290 295 300
 15 Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg
 305 310 315 320
 Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile
 325 330 335
 Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser
 20 340 345 350
 Glu Arg Thr Ile Ser Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser
 355 360 365
 Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met
 370 375 380
 25 Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu

	385		390		395		400									
	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly
			405							410						415
	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
5			420							425						430
	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
			435							440						445
	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	His	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn
			450							455						460
10	Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr
			465													480
	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg
					485						490					495
	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg	Thr
15			500							505						510
	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu
			515							520						525
	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Lys	Pro	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Met	Gly	Asp	Val
			530							535						540
20	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Val	Lys	Val
			545													560
	Leu	Arg	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Glu	Ser	Pro	Gly	Arg	Cys	Tyr	Ser	Arg
					565						570					575
	Pro	Val	Val	Ile	Phe	Asn	Phe	Ala	Asn	Ser	Ser	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly
25			580								585					590

Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu
 595 600 605
 Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala
 610 615 620
 5 Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser
 625 630 635 640
 Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu
 645 650 655
 Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
 10 660 665 670
 Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
 675 680 685
 Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Arg Leu Ala Thr Gln
 690 695 700
 15 Pro Leu Gln Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr
 705 710 715 720
 Val Thr Ser Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser
 725 730 735
 Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Gly Gln Lys Pro
 20 740 745 750
 Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His Leu
 755 760 765
 Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val
 770 775

<210> 5

<211> 777

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 5

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

Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln
 130 135 140
 Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Gly His Arg Thr Thr Tyr
 145 150 155 160
 5 Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile
 165 170 175
 His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val
 180 185 190
 Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn
 10 195 200 205
 Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr
 210 215 220
 Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Trp
 225 230 235 240
 15 Leu Tyr Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr
 245 250 255
 Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp
 260 265 270
 Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser
 20 275 280 285
 Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr
 290 295 300
 Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg
 305 310 315 320
 25 Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile

		325		330		335													
		Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser		
					340					345					350				
		Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Ser	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser		
5					355					360					365				
		Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met		
					370					375					380				
		Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu		
		385						390					395				400		
10		Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly		
						405					410					415			
		Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln		
						420					425					430			
		Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg		
15					435					440						445			
		Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	His	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn		
					450					455						460			
		Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr		
		465						470					475				480		
20		Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg		
						485					490					495			
		Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg	Thr		
						500					505					510			
		Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu		
25					515					520						525			

Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val
 530 535 540
 Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val
 545 550 555 560
 5 Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg
 565 570 575
 Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly
 580 585 590
 Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu
 10 595 600 605
 Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala
 610 615 620
 Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser
 625 630 635 640
 15 Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu
 645 650 655
 Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
 660 665 670
 Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
 20 675 680 685
 Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Arg Leu Ala Thr Gln
 690 695 700
 Pro Leu Gln Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp Gly Thr Thr
 705 710 715 720
 25 Val Thr Ser Gly Ser Thr Lys Asp Thr Ser Leu Gln Ala Pro Pro Ser

24

725

730

735

Tyr Glu Glu Ser Val Tyr Asn Ser Gly Arg Lys Gly Gly Gln Lys Pro

740

745

750

Asn Leu Leu Asp Arg Leu Arg His Arg Lys Asn Gly Tyr Arg His Leu

5

755

760

765

Lys Asp Ser Asp Glu Glu Glu Asn Val

770

775

<210> 6

10 <211> 2490

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 6

atggagagca ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctggga 60
gccgccgtga gcagcagcag cacctccac gccacctcca gcaccacaa cggcagccac 120
20 accagcagga ccacctccgc ccagaccagc agcgtgtaca gccagcacgt gacctcttcc 180
gaggccgtga gccacagggc caacgagaca atctacaaca ccaccctgaa gtacggcgac 240
gtggtgggag tgaacaccac caagtacccc tacagagtgt gcagcatggc ccagggcacc 300
gacctgatca gattcgagcg gaacatcatc tgcaccagca tgaagcccat caacaggagc 360
ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag aggaacatcg tggccacac cttcaaggtc 420
25 cgcgtgtacc agaaggtgct gaccttcagg cggagctacg ccggccacag gaccacctac 480

ctgctgggca gcaacaccga gtacgtggcc ccacccatgt gggagatcca ccacatcaac 540
 aagttcgccc agtgctacag cagctacagc cgcgtgatcg gcggcaccgt gttcgtggcc 600
 taccacaggg acagctacga gaacaagacc atgcagctga tccccgacga ctacagcaac 660
 acccacagca ccagatacgt gaccgtgaag gaccagtggc acagcagggg cagcaccgcc 720
 5 ttccacagag agacatgcaa cctgaactgc atgctgacca tcaccaccgc cagaagcaag 780
 tacccttacc acttcttcgc cacctctacc ggggacgtgg tgtacatcag ccccttctac 840
 aacggcacca acaggaacgc cagctacttc ggcgagaacg ccgacaagtt cttcatcttc 900
 cccaactaca ccatcgtgtc cgacttcggc aggcccaacg ctgccccga gacacacaga 960
 ctggtggcct ttctggagag ggccgacagc gtgatcagct gggacatcca ggacgagaag 1020
 10 aacgtgacct gccagctgac cttctgggag gccagcgaga ggaccatcag cagcgaggcc 1080
 gaggacagct accacttcag cagcgccaag atgaccgcca ccttcctgag caagaaacaa 1140
 gaggtgaaca tgagcgacag cgccctggac tgcgtgaggg acgaggccat caacaagctg 1200
 cagcagatct tcaacaccag ctacaaccag acctacgaga agtacggaaa cgtgtccgtg 1260
 ttcgagacaa gcggcggact ggtggtgttc tggcagggca tcaagcagaa gtccctggtc 1320
 15 gagctggaga ggctggccaa caggtccagc ctgaacatca cccacaccac ccagaccagc 1380
 accagcgaca acaacaccac acacctgagc agcatggaaa gcgtgcacaa cctggtgtat 1440
 gccagctgc agttcaccta cgacaccctg aggggctaca tcaacagagc cctggcccag 1500
 atcgccgagg cttggtgcgt ggaccagaga aggaccctgg aggtgttcaa ggaactgtcc 1560
 aagatcaacc ccagcgccat cctgagcgcc atctacaaca agccaatcgc cgccagattc 1620
 20 atgggcgacg tgctgggcct ggccagctgc gtgaccatca accagaccag cgtgaagggtg 1680
 ctgcgggaca tgaacgtgaa ggaaagccca ggccgctgct actccaggcc cgtggtgatc 1740
 ttcaacttcg ccaacagctc ctacgtgcag tacggccagc tgggcgagga caacgagatc 1800
 ctgctgggaa accacaggac cgaggaatgc cagctgcca gcctgaagat ctttatcgcc 1860
 ggcaactccg cctacgagta cgtggactac ctgttcaaga ggatgatcga cctgtccagc 1920
 25 atcagcaccg tggacagcat gatcgccctg gatatcgatc ccctggagaa caccgacttc 1980

aggggtgctgg agctgtactc ccagaaggaa ctgaggtcca gcaacgtgtt cgacctggag 2040
 gaaatcatga gagagttcaa cagctacaag cagcgcgtga agtacgtgga ggacaagagg 2100
 ctgtgcaccc agcccctgca gaacctgttc ccctacctgg tgtccgccga cggcaccacc 2160
 gtgaccagcg gctccaccaa ggacaccagc ctgcaggccc ctcccagcta cgaggaaagc 2220
 5 gtgtacaaca gcggcaggaa gggcccaggc cccccaagca gcgacgccag cacagccgcc 2280
 ccaccctaca ccaacgagca ggccctaccag atgctgctgg ccctggcccc gctggacgcc 2340
 gagcagaggg cccagcagaa cggcaccgac agcctggacg gccagaccgg caccaggac 2400
 aagggccaga agcccaacct gctggacagg ctgaggcaca ggaagaacgg ctacaggcac 2460
 ctgaaggaca gcgacgagga agaaaacgtg 2490

10

<210> 7

<211> 2331

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 7

20 atggagagca ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctggga 60
 gccgccgtga gcagcagcag cacctcccac gccacctcca gcaccacaa cggcagccac 120
 accagcagga ccacctccgc ccagaccagc agcgtgtaca gccagcacgt gacctcttcc 180
 gaggccgtga gccacagggc caacgagaca atctacaaca ccaccctgaa gtacggcgac 240
 gtggtgggag tgaacaccac caagtacccc tacagagtgt gcagcatggc ccagggcacc 300
 25 gacctgatca gattcgagcg gaacatcatc tgcaccagca tgaagcccat caacaggagc 360

ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag aggaacatcg tggcccacac cttcaaggtc 420
 cgcggtgtacc agaaggtgct gaccttcagg cggagctacg ccggccacag gaccacctac 480
 ctgctgggca gcaacaccga gtacgtggcc ccacccatgt gggagatcca ccacatcaac 540
 aagttcgccc agtgctacag cagctacagc cgcgatgatcg gcggcaccgt gttcgtggcc 600
 5 taccacaggg acagctacga gaacaagacc atgcagctga tccccgacga ctacagcaac 660
 acccacagca ccagatacgt gaccgtgaag gaccagtggc acagcagggg cagcacctgg 720
 ctgtacagag agacatgcaa cctgaactgc atgctgacca tcaccaccgc cagaagcaag 780
 tacccttacc acttcttcgc cacctctacc ggggacgtgg tgtacatcag ccccttctac 840
 aacggcacca acaggaacgc cagctacttc ggcgagaacg ccgacaagtt cttcatcttc 900
 10 cccaactaca ccatcgtgtc cgacttcggc aggcccaacg ctgccccga gacacacaga 960
 ctggtggcct ttctggagag ggccgacagc gtgatcagct gggacatcca ggacgagaag 1020
 aacgtgacct gccagctgac cttctgggag gccagcgaga ggaccatcag cagcgaggcc 1080
 gaggacagct accacttcag cagcgccaag atgaccgcca ccttcctgag caagaaacaa 1140
 gaggtgaaca tgagcgacag cgccctggac tgcgtgaggg acgaggccat caacaagctg 1200
 15 cagcagatct tcaacaccag ctacaaccag acctacgaga agtacggaaa cgtgtccgtg 1260
 ttcgagacaa gcggcggact ggtggtgttc tggcagggca tcaagcagaa gtccctggtc 1320
 gagctggaga ggctggccaa caggtccagc ctgaacatca cccacaccac ccagaccagc 1380
 accagcgaca acaacaccac acacctgagc agcatggaaa gcgtgcacaa cctggtgtat 1440
 gccagctgc agttcaccta cgacaccctg aggggctaca tcaacagagc cctggcccag 1500
 20 atcgccgagg cttggtgcgt ggaccagaga aggaccctgg aggtgttcaa ggaactgtcc 1560
 aagatcaacc ccagcgccat cctgagcgcc atctacaaca agccaatcgc cgccagattc 1620
 atgggcgacg tgctgggcct ggccagctgc gtgaccatca accagaccag cgtgaaggctg 1680
 ctgcgggaca tgaacgtgaa ggaaagccca ggccgctgct actccaggcc cgtggtgatc 1740
 ttcaacttcg ccaacagctc ctacgtgcag tacggccagc tgggcgagga caacgagatc 1800
 25 ctgctgggaa accacaggac cgaggaatgc cagctgcca gcctgaagat ctttatcgcc 1860

ggcaactccg cctacgagta cgtggactac ctgttcaaga ggatgatcga cctgtccagc 1920
 atcagcaccg tggacagcat gatcgccctg gatatcgatc ccctggagaa caccgacttc 1980
 aggggtgctgg agctgtactc ccagaaggaa ctgaggtcca gcaacgtgtt cgacctggag 2040
 gaaatcatga gagagttcaa cagctacaag cagcgctga agtacgtgga ggacaagagg 2100
 5 ctggccaccc agcccctgca gaacctgttc ccctacctgg tgtccgccga cggcaccacc 2160
 gtgaccagcg gctccaccaa ggacaccagc ctgcaggccc ctcccagcta cgaggaaagc 2220
 gtgtacaaca gcggcaggaa gggcgggccag aagcccaacc tgctggacag gctgaggcac 2280
 aggaagaacg gctacaggca cctgaaggac agcgacgagg aagaaaacgt g 2331

10 <210> 8

<211> 2331

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 8

atggagagca ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctggga 60
 20 gccgccgtga gcagcagcag cacctcccac gccacctcca gcacccacaa cggcagccac 120
 accagcagga ccacctccgc ccagaccagc agcgtgtaca gccagcacgt gacctcttcc 180
 gaggccgtga gccacagggc caacgagaca atctacaaca ccaccctgaa gtacggcgac 240
 gtggtgggag tgaacaccac caagtacccc tacagagtgt gcagcatggc ccagggcacc 300
 gacctgatca gattcgagcg gaacatcatc tgcaccagca tgaagcccat caacgaggac 360
 25 ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag aggaacatcg tggcccacac cttcaaggtc 420

cgcggtgtacc agaaggtgct gaccttcagg cggagctacg ccggccacag gaccacctac 480
 ctgctgggca gcaacaccga gtacgtggcc ccacccatgt gggagatcca ccacatcaac 540
 aagttcgccc agtgctacag cagctacagc cgcgatgatcg gcggcaccgt gttcgtggcc 600
 taccacaggg acagctacga gaacaagacc atgcagctga tccccgacga ctacagcaac 660
 5 acccacagca ccagatacgt gaccgtgaag gaccagtggc acagcagggg cagcaccgcc 720
 ttccacagag agacatgcaa cctgaactgc atgctgacca tcaccaccgc cagaagcaag 780
 tacccttacc acttcttcgc cacctctacc ggggacgtgg tgtacatcag ccccttctac 840
 aacggcacca acaggaacgc cagctacttc ggcgagaacg ccgacaagtt cttcatcttc 900
 cccaactaca ccatcgtgtc cgacttcggc aggcccaacg ctgccccga gacacacaga 960
 10 ctggtggcct ttctggagag ggccgacagc gtgatcagct gggacatcca ggacgagaag 1020
 aacgtgacct gccagctgac cttctgggag gccagcgaga ggaccatcag cagcgaggcc 1080
 gaggacagct accacttcag cagcgccaag atgaccgcca ccttcctgag caagaaacaa 1140
 gaggtgaaca tgagcgacag cgccctggac tgcgtgaggg acgaggccat caacaagctg 1200
 cagcagatct tcaacaccag ctacaaccag acctacgaga agtacggaaa cgtgtccgtg 1260
 15 ttcgagacaa gcggcggact ggtggtgttc tggcagggca tcaagcagaa gtccctgggtc 1320
 gagctggaga ggctggccaa caggtccagc ctgaacatca cccacaccac ccagaccagc 1380
 accagcgaca acaacaccac acacctgagc agcatggaaa gcgtgcacaa cctggtgtat 1440
 gccagctgc agttcaccta cgacaccctg aggggctaca tcaacagagc cctggcccag 1500
 atcgccgagg cttggtgcgt ggaccagaga aggaccctgg aggtgttcaa ggaactgtcc 1560
 20 aagatcaacc ccagcgccat cctgagcgcc atctacaaca agccaatcgc cgccagattc 1620
 atgggcgacg tgctgggcct ggccagctgc gtgaccatca accagaccag cgtgaagggtg 1680
 ctgcgggaca tgaacgtgaa ggaaagccca ggccgctgct actccaggcc cgtggtgatc 1740
 ttcaacttcg ccaacagctc ctacgtgcag tacggccagc tgggcgagga caacgagatc 1800
 ctgctgggaa accacaggac cgaggaatgc cagctgcca gcctgaagat ctttatcgcc 1860
 25 ggcaactccg cctacagta cgtggactac ctgttcaaga ggatgatcga cctgtccagc 1920

atcagcaccg tggacagcat gatcgccctg gatatcgatc ccctggagaa caccgacttc 1980
 aggggtgctgg agctgtactc ccagaaggaa ctgaggtcca gcaacgtgtt cgacctggag 2040
 gaaatcatga gagagttcaa cagctacaag cagcgctga agtacgtgga ggacaagagg 2100
 ctggccaccc agcccctgca gaacctgttc ccctacctgg tgtccgccga cggcaccacc 2160
 5 gtgaccagcg gctccaccaa ggacaccagc ctgcaggccc ctcccagcta cgaggaaagc 2220
 gtgtacaaca gcggcaggaa gggcgggccag aagcccaacc tgctggacag gctgaggcac 2280
 aggaagaacg gctacaggca cctgaaggac agcgacgagg aagaaaacgt g 2331

<210> 9

10 <211> 2172

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 9

atggagagca ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctggga 60
 gccgccgtga gcagcagcag cacctccac gccacctcca gcaccacaa cggcagccac 120
 20 accagcagga ccacctccgc ccagaccaga agcgtgtaca gccagcacgt gacctcttcc 180
 gaggccgtga gccacagggc caacgagaca atctacaaca ccaccctgaa gtacggcgac 240
 gtggtgggag tgaacaccac caagtacccc tacagagtgt gcagcatggc ccagggcacc 300
 gacctgatca gattcgagcg gaacatcatc tgcaccagca tgaagcccat caacgaggac 360
 ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag aggaacatcg tggccacac cttcaaggtc 420
 25 cgcggtgtacc agaaggtgct gaccttcagg cggagctacg ccggccacag gaccacctac 480

ctgctgggca gcaacaccga gtacgtggcc ccacccatgt gggagatcca ccacatcaac 540
 aagttcgccc agtgctacag cagctacagc cgcgtgatcg gcggcaccgt gttcgtggcc 600
 taccacaggg acagctacga gaacaagacc atgcagctga tccccgacga ctacagcaac 660
 acccacagca ccagatacgt gaccgtgaag gaccagtggc acagcagggg cagcaccgcc 720
 5 ttccacagag agacatgcaa cctgaactgc atgctgacca tcaccaccgc cagaagcaag 780
 tacccttacc acttcttcgc cacctctacc ggggacgtgg tgtacatcag ccccttctac 840
 aacggcacca acaggaacgc cagctacttc ggcgagaacg ccgacaagtt cttcatcttc 900
 cccaactaca ccatcgtgtc cgacttcggc aggcccaacg ctgccccga gacacacaga 960
 ctggtggcct ttctggagag ggccgacagc gtgatcagct gggacatcca ggacgagaag 1020
 10 aacgtgacct gccagctgac cttctgggag gccagcgaga ggaccatcag aagcgaggcc 1080
 gaggacagct accacttcag cagcgccaag atgaccgcca ccttcctgag caagaaacaa 1140
 gaggtgaaca tgagcgacag cgccctggac tgcgtgaggg acgaggccat caacaagctg 1200
 cagcagatct tcaacaccag ctacaaccag acctacgaga agtacggaaa cgtgtccgtg 1260
 ttcgagacaa gcggcggact ggtggtgttc tggcagggca tcaagcagaa gtccctggtc 1320
 15 gagctggaga ggctggccaa caggtccagc ctgaacatca cccacaccac ccagaccagc 1380
 accagcgaca acaacaccac acacctgagc agcatggaaa gcgtgcacaa cctggtgtat 1440
 gccagctgc agttcaccta cgacaccctg aggggctaca tcaacagagc cctggcccag 1500
 atcgccgagg cttggtgcgt ggaccagaga aggaccctgg aggtgttcaa ggaactgtcc 1560
 aagatcaacc ccagcgccat cctgagcgcc atctacaaca agccaatcgc cgccagattc 1620
 20 atgggcgacg tgctgggcct ggccagctgc gtgaccatca accagaccag cgtgaagggtg 1680
 ctgcgggaca tgaacgtgaa ggaaagccca ggccgctgct actccaggcc cgtggtgatc 1740
 ttcaacttcg ccaacagctc ctacgtgcag tacggccagc tgggcgagga caacgagatc 1800
 ctgctgggaa accacaggac cgaggaatgc cagctgcca gcctgaagat ctttatcgcc 1860
 ggcaactccg cctacgagta cgtggactac ctgttcaaga ggatgatcga cctgtccagc 1920
 25 atcagcaccg tggacagcat gatcgccctg gatatcgatc ccctggagaa caccgacttc 1980

aggggtgctgg agctgtactc ccagaaggaa ctgaggtcca gcaacgtgtt cgacctggag 2040
 gaaatcatga gagagttcaa cagctacaag cagcgcgtga agtacgtgga ggacaagggtg 2100
 gtggaccccc tgcccccta cctgaagggc ctggacgacc tgatgagcgg actcggggct 2160
 gctggaaagg cc 2172

5

<210> 10

<211> 724

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 10

15 Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile

1

5

10

15

Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr

20

25

30

Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln

20

35

40

45

Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser

50

55

60

His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp

65

70

75

80

25 Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met

Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr
 290 295 300
 Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg
 305 310 315 320
 5 Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp Ile
 325 330 335
 Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala Ser
 340 345 350
 Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser Ser
 10 355 360 365
 Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn Met
 370 375 380
 Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu
 385 390 395 400
 15 Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly
 405 410 415
 Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp Gln
 420 425 430
 Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg
 20 435 440 445
 Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Thr Thr Gln Thr Ser Thr Ser Asp Asn
 450 455 460
 Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val Tyr
 465 470 475 480
 25 Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg

[illegible]

Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu

690

695

700

Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala

705

710

715

720

5 Ala Gly Lys Ala

<210> 11

<211> 2151

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

15 <400> 11

atggagagca ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctggga 60

gccgcctgta gcagcagcag cacctccac gccacctcca gacccacaa cggcagccac 120

accagcagga ccacctccgc ccagaccaga agcgtgtaca gccagcacgt gacctcttcc 180

gaggccgtga gccacagggc caacgagaca atctacaaca ccaccctgaa gtacggcgac 240

20 gtggtgggag tgaacaccac caagtacccc tacagagtgt gcagcatggc ccagggcacc 300

gacctgatca gattcgagcg gaacatcatc tgcaccagca tgaagcccat caacgaggac 360

ctggacgagg gcatcatggt ggtgtacaag aggaacatcg tggccacac cttcaaggtc 420

cgcgtgtacc agaaggtgct gaccttcagg cggagctacg ccggccacag gaccacctac 480

ctgctgggca gcaacaccga gtacgtggcc ccacccatgt gggagatcca ccacatcaac 540

25 aagttcgccc agtgctacag cagctacagc cgcgtgatcg gcggcaccgt gttcgtggcc 600

taccacaggg acagctacga gaacaagacc atgcagctga tccccgacga ctacagcaac 660
 acccacagca ccagatacgt gaccgtgaag gaccagtggc acagcagggg cagcaccgcc 720
 ttccacagag agacatgcaa cctgaactgc atgctgacca tcaccaccgc cagaagcaag 780
 tacccttacc acttcttcgc cacctctacc ggggacgtgg tgtacatcag ccccttctac 840
 5 aacggcacca acaggaacgc cagctacttc ggcgagaacg ccgacaagtt cttcatcttc 900
 cccaactaca ccatcgtgtc cgacttcggc aggcccaacg ctgccccga gacacacaga 960
 ctggtggcct ttctggagag ggccgacagc gtgatcagct gggacatcca ggacgagaag 1020
 aacgtgacct gccagctgac cttctgggag gccagcgaga ggaccatcag aagcgaggcc 1080
 gaggacagct accacttcag cagcgccaag atgaccgcca ccttcctgag caagaaacaa 1140
 10 gaggtgaaca tgagcgacag cgccctggac tgcgtgaggg acgaggccat caacaagctg 1200
 cagcagatct tcaacaccag ctacaaccag acctacgaga agtacggaaa cgtgtccgtg 1260
 ttcgagacaa gcggcggact ggtggtgttc tggcagggca tcaagcagaa gtccctggtc 1320
 gagctggaga ggctggccaa caggtccagc ctgaacatca cccacaccac ccagaccagc 1380
 accagcgaca acaacaccac acacctgagc agcatggaaa gcgtgcacaa cctggtgtat 1440
 15 gcccagctgc agttcaccta cgacaccctg aggggctaca tcaacagagc cctggcccag 1500
 atcgccgagg cttggtgcgt ggaccagaga aggaccctgg aggtgttcaa ggaactgtcc 1560
 aagatcaacc ccagcgccat cctgagcgcc atctacaaca agccaatcgc cgccagattc 1620
 atgggcgacg tgctgggcct ggccagctgc gtgaccatca accagaccag cgtgaagggtg 1680
 ctgcgggaca tgaacgtgaa ggaaagccca ggccgtgct actccaggcc cgtggtgatc 1740
 20 ttcaacttcg ccaacagctc ctacgtgcag tacggccagc tgggcgagga caacgagatc 1800
 ctgctgggaa accacaggac cgaggaatgc cagctgcca gcctgaagat ctttatcgcc 1860
 ggcaactccg cctacagta cgtggactac ctgttcaaga ggatgatcga cctgtccagc 1920
 atcagcaccg tggacagcat gatcgccctg gatatcgatc ccctggagaa caccgacttc 1980
 aggggtgctg agctgtactc ccagaaggaa ctgaggtcca gcaacgtgtt cgacctggag 2040
 25 gaaatcatga gagagttcaa cagctacaag cagcgctga agtacgtgga ggacaagagg 2100

ctggccaccc agcccctgca gaacctgttc ccctacctgg tgtccgccga c

2151

<210> 12

<211> 717

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

10

<400> 12

Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile

1 5 10 15

Val Cys Leu Gly Ala Ala Val Ser Ser Ser Ser Thr Ser His Ala Thr

15 20 25 30

Ser Ser Thr His Asn Gly Ser His Thr Ser Arg Thr Thr Ser Ala Gln

35 40 45

Thr Arg Ser Val Tyr Ser Gln His Val Thr Ser Ser Glu Ala Val Ser

50 55 60

20 His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp

65 70 75 80

Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met

85 90 95

Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr

25 100 105 110

Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val Val
 115 120 125
 Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr Gln
 130 135 140
 5 Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Gly His Arg Thr Thr Tyr
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu Ile
 165 170 175
 His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg Val
 10 180 185 190
 Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu Asn
 195 200 205
 Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser Thr
 210 215 220
 15 Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr Ala
 225 230 235 240
 Phe His Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr Thr
 245 250 255
 Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly Asp
 20 260 265 270
 Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala Ser
 275 280 285
 Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr Thr
 290 295 300
 25 Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His Arg

	305		310		315		320									
	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile
			325				330							335		
	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser
5			340				345					350				
	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Ser	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser
			355				360					365				
	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met
			370				375					380				
10	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu
			385				390					395				400
	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly
					405					410					415	
	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
15			420				425					430				
	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
			435				440					445				
	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	His	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn
			450				455					460				
20	Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr
			465				470					475				480
	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg
					485					490					495	
	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg	Thr
25			500				505					510				

Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu
 515 520 525
 Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp Val
 530 535 540
 5 Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys Val
 545 550 555 560
 Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg
 565 570 575
 Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly
 10 580 585 590
 Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr Glu
 595 600 605
 Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala
 610 615 620
 15 Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser
 625 630 635 640
 Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu
 645 650 655
 Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
 20 660 665 670
 Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
 675 680 685
 Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Arg Leu Ala Thr Gln
 690 695 700
 25 Pro Leu Gln Asn Leu Phe Pro Tyr Leu Val Ser Ala Asp

705 710 715

<210> 13

<211> 2049

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

10

<400> 13

atggaatccc ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtgcctggcc 60
 ctggccagcc accgggccaac cgagacaatc tacaacacca ccctgaagta cggcgacgtg 120
 gtgggagtgac acaccaccaa gtaccacctac agagtgtgct ccatggccca gggcaccgac 180
 15 ctgatcagat tcgagcggaa catcatctgc accagcatga agcccatcaa cgaggacctg 240
 gacgagggca tcatggtggt gtacaagagg aacatcgtgg cccacacctt caaggtccgc 300
 gtgtaccaga aggtgctgac cttcaggcgg agctacgccg gccacaggac cacctacctg 360
 ctgggcagca acaccgagta cgtggcccca cccatgtggg agatccacca catcaacaag 420
 ttgccccagt gctacagcag ctacagccgc gtgatcggcg gcaccgtgtt cgtggcctac 480
 20 cacagggaca gctacgagaa caagaccatg cagctgatcc ccgacgacta cagcaacacc 540
 cacagcacca gatacgtgac cgtgaaggac cagtggcaca gcaggggcag caccgccttc 600
 cacagagaga catgcaacct gaactgcatg ctgaccatca ccaccgccag aagcaagtac 660
 ccttaccact tcttcgccac ctctaccggg gacgtggtgt acatcagccc cttctacaac 720
 ggcaccaaca ggaacgccag ctacttcggc gagaacgccg acaagttctt catcttcccc 780
 25 aactacacca tcgtgtccga cttcggcagg cccaacgctg ccccccagac acacagactg 840

```

gtggcctttc tggagagggc cgacagcgtg atcagctggg acatccagga cgagaagaac 900
gtgacctgcc agctgacctt ctgggaggcc agcgagagga ccatcagaag cgaggccgag 960
gacagctacc acttcagcag cgccaagatg accgccacct tcctgagcaa gaaacaagag 1020
gtgaacatga gcgacagcgc cctggactgc gtgaggagc aggccatcaa caagctgcag 1080
5  cagatcttca acaccagcta caaccagacc tacgagaagt acggaaacgt gtccgtgttc 1140
gagacaagcg gcggactggt ggtgttcttg cagggcatca agcagaagtc cctggtcgag 1200
ctggagagggc tggccaacag gtccagcctg aacatcacc acaccacca gaccagcacc 1260
agcgacaaca acaccacaca cctgagcagc atggaaagcg tgcacaacct ggtgtatgcc 1320
cagctgcagt tcacctacga caccctgagg ggctacatca acagagccct ggcccagatc 1380
10 gccgaggctt ggtgctgga ccagagaagg accctggagg tgttcaagga actgtccaag 1440
atcaacccca gcgccatcct gagcgccatc tacaacaagc caatcgccgc cagattcatg 1500
ggcgacgtgc tgggcctggc cagctgcgtg accatcaacc agaccagcgt gaaggctgctg 1560
cgggacatga acgtgaagga aagcccaggc cgctgctact ccaggcccgt ggtgatcttc 1620
aacttcgcca acagctccta cgtgcagtac ggccagctgg gcgaggacaa cgagatcctg 1680
15 ctgggaaacc acaggaccga ggaatgccag ctgcccagcc tgaagatctt tatcgccggc 1740
aactccgcct acgagtacgt ggactacctg ttcaagagga tgatcgacct gtccagcatc 1800
agcacctgg acagcatgat cgccctggat atcgatcccc tggagaacac cgacttcagg 1860
gtgctggagc tgtactccca gaaggaaact aggtccagca acgtgttcga cctggaggaa 1920
atcatgagag agttcaacag ctacaagcag cgcgtgaagt acgtggagga caagtggtg 1980
20 gacccctgc cccctacct gaagggcctg gacgacctga tgagcggact cggggctgct 2040
ggaaaggcc 2049

```

<210> 14

<211> 683

25 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

5

<400> 14

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

	145		150		155		160
	His	Arg	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asn
				Lys	Thr	Met	Gln
						Leu	Ile
						Pro	Asp
						Asp	
			165		170		175
	Tyr	Ser	Asn	Thr	His	Ser	Thr
				Arg	Tyr	Val	Thr
						Val	Lys
						Asp	Gln
						Trp	
5			180		185		190
	His	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr	Ala
				Phe	His	Arg	Glu
						Thr	Cys
						Asn	Leu
						Asn	
			195		200		205
	Cys	Met	Leu	Thr	Ile	Thr	Thr
				Ala	Arg	Ser	Lys
						Tyr	Pro
						Tyr	His
						Phe	
			210		215		220
10	Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp
				Val	Val	Tyr	Ile
						Ser	Pro
						Phe	Tyr
						Asn	
			225		230		235
							240
	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser
				Tyr	Phe	Gly	Glu
						Asn	Ala
						Asp	Lys
						Phe	
			245		250		255
	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr
				Ile	Val	Ser	Asp
						Phe	Gly
						Arg	Pro
						Asn	
15			260		265		270
	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg
				Leu	Val	Ala	Phe
						Leu	Glu
						Arg	Ala
						Asp	
			275		280		285
	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile
				Gln	Asp	Glu	Lys
						Asn	Val
						Thr	Cys
						Gln	
			290		295		300
20	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser
				Glu	Arg	Thr	Ile
						Arg	Ser
						Glu	Ala
						Glu	
			305		310		315
							320
	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser
				Ala	Lys	Met	Thr
						Ala	Thr
						Phe	Leu
						Ser	
			325		330		335
	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met
				Ser	Asp	Ser	Ala
						Leu	Asp
						Cys	Val
						Arg	
25			340		345		350

Asp Glu Ala Ile Asn Lys Leu Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn
 355 360 365
 Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr Gly Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly
 370 375 380
 5 Gly Leu Val Val Phe Trp Gln Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu
 385 390 395 400
 Leu Glu Arg Leu Ala Asn Arg Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Thr Thr
 405 410 415
 Gln Thr Ser Thr Ser Asp Asn Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu
 10 420 425 430
 Ser Val His Asn Leu Val Tyr Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr
 435 440 445
 Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp
 450 455 460
 15 Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys
 465 470 475 480
 Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala
 485 490 495
 Ala Arg Phe Met Gly Asp Val Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile
 20 500 505 510
 Asn Gln Thr Ser Val Lys Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser
 515 520 525
 Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn
 530 535 540
 25 Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu

545 550 555 560
 Leu Gly Asn His Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile
 565 570 575
 Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys
 5 580 585 590
 Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala
 595 600 605
 Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu
 610 615 620
 10 Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu
 625 630 635 640
 Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu
 645 650 655
 Asp Lys Val Val Asp Pro Leu Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp
 15 660 665 670
 Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala Ala Gly Lys Ala
 675 680

<210> 15
 20 <211> 2049
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 15

atggaatccc ggatctggtg cctggtggtg tgcgtgaacc tgtgcatcgt gtcctctggga 60
 gccctggccc accgggcca cagagacaatc tacaacacca ccctgaagta cggcgacgtg 120
 gtgggagtga acaccaccaa gtacccttac agagtgtgct ccatggcca gggcaccgac 180
 5 ctgatcagat tcgagcggaa catcatctgc accagcatga agcccatcaa cgaggacctg 240
 gacgagggca tcatggtggt gtacaagagg aacatcgtgg ccacacctt caaggtccgc 300
 gtgtaccaga aggtgctgac cttcaggcgg agctacgccg gccacaggac cacctacctg 360
 ctgggcagca acaccgagta cgtggcccca cccatgtggg agatccacca catcaacaag 420
 ttcgcccagt gctacagcag ctacagccgc gtgatcgccg gcaccgtgtt cgtggcctac 480
 10 cacagggaca gctacgagaa caagaccatg cagctgatcc ccgacgacta cagcaacacc 540
 cacagcacca gatacgtgac cgtgaaggac cagtggcaca gcaggggcag caccgccttc 600
 cacagagaga catgcaacct gaactgcatg ctgaccatca ccaccgccag aagcaagtac 660
 ccttaccact tcttcgccac ctctaccggg gacgtggtgt acatcagccc cttctacaac 720
 ggcaccaaca ggaacgccag ctacttcggc gagaacgccg acaagttctt catcttcccc 780
 15 aactacacca tcgtgtccga cttcggcagg cccaacgctg ccccgagac acacagactg 840
 gtggcctttc tggagagggc cgacagcgtg atcagctggg acatccagga cgagaagaac 900
 gtgacctgcc agtgacctt ctgggaggcc agcgagagga ccatcagaag cgaggccgag 960
 gacagctacc acttcagcag cgccaagatg accgccacct tcctgagcaa gaaacaagag 1020
 gtgaacatga gcgacagcgc cctggactgc gtgagggacg aggccatcaa caagctgcag 1080
 20 cagatcttca acaccagcta caaccagacc tacgagaagt acggaaacgt gtccgtgttc 1140
 gagacaagcg gcggactggt ggtgttcttg cagggcatac agcagaagtc cctggctcgag 1200
 ctggagaggc tggccaacag gtccagcctg aacatcacc acaccacca gaccagcacc 1260
 agcgacaaca acaccacaca cctgagcagc atggaaagcg tgcacaacct ggtgtatgcc 1320
 cagctgcagt tcacctacga caccctgagg ggctacatca acagagccct ggcccagatc 1380
 25 gccgaggctt ggtgctgga ccagagaagg accctggagg tgttcaagga actgtccaag 1440

```

atcaacccca gcgccatcct gagcgccatc tacaacaagc caatcgccgc cagattcatg 1500
ggcgacgtgc tgggcctggc cagctgcgtg accatcaacc agaccagcgt gaaggtgctg 1560
cgggacatga acgtgaagga aagcccaggc cgctgctact ccaggcccggt ggtgatcttc 1620
aacttcgcca acagctccta cgtgcagtac ggccagctgg gcgaggacaa cgagatcctg 1680
5 ctgggaaacc acaggaccga ggaatgccag ctgcccagcc tgaagatctt tatcgccggc 1740
aactccgcct acgagtacgt ggactacctg ttcaagagga tgatcgacct gtccagcatc 1800
agcaccgtgg acagcatgat cgccctggat atcgatcccc tggagaacac cgacttcagg 1860
gtgctggagc tgtactccca gaaggaactg aggtccagca acgtgttcga cctggaggaa 1920
atcatgagag agttcaacag ctacaagcag cgctgaagt acgtggagga caaggtggtg 1980
10 gacccccctgc cccctacct gaagggcctg gacgacctga tgagcggact cggggctgct 2040
ggaaaggcc 2049

```

<210> 16

<211> 683

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

20

<400> 16

Met Glu Ser Arg Ile Trp Cys Leu Val Val Cys Val Asn Leu Cys Ile

1

5

10

15

Val Leu Leu Gly Ala Leu Ala His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn

25

20

25

30

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

	225		230		235		240
	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Phe
			245		250		255
	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr
5			260		265		270
	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg
			275		280		285
	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile
			290		295		300
10	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser
			305		310		315
	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser
			325		330		335
	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met
15			340		345		350
	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu
			355		360		365
	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly
			370		375		380
20	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
			385		390		395
	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
			405		410		415
	Gln	Thr	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn
25			420		425		430

Ser Val His Asn Leu Val Tyr Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr
 435 440 445
 Leu Arg Gly Tyr Ile Asn Arg Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp
 450 455 460
 5 Cys Val Asp Gln Arg Arg Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys
 465 470 475 480
 Ile Asn Pro Ser Ala Ile Leu Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala
 485 490 495
 Ala Arg Phe Met Gly Asp Val Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile
 10 500 505 510
 Asn Gln Thr Ser Val Lys Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser
 515 520 525
 Pro Gly Arg Cys Tyr Ser Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn
 530 535 540
 15 Ser Ser Tyr Val Gln Tyr Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu
 545 550 555 560
 Leu Gly Asn His Arg Thr Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile
 565 570 575
 Phe Ile Ala Gly Asn Ser Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys
 20 580 585 590
 Arg Met Ile Asp Leu Ser Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala
 595 600 605
 Leu Asp Ile Asp Pro Leu Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu
 610 615 620
 25 Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu

aacaagacca tgcagctgat ccccgacgac tacagcaaca cccacagcac cagatacgtg 540
accgtgaagg accagtggca cagcaggggc agcaccgcct tccacagaga gacatgcaac 600
ctgaactgca tgctgaccat caccaccgcc agaagcaagt acccttacca cttcttcgcc 660
acctctaccg gggacgtggt gtacatcagc cccttctaca acggcaccaa caggaacgcc 720
5 agctacttcg gcgagaacgc cgacaagttc ttcattcttc ccaactacac catcgtgtcc 780
gacttcggca ggcccaacgc tgcccccag acacacagac tgggtggcctt tctggagagg 840
gccgacagcg tgatcagctg ggacatccag gacgagaaga acgtgacctg ccagctgacc 900
ttctgggagg ccagcgagag gaccatcaga agcgaggccg aggacagcta ccacttcagc 960
agcgccaaga tgaccgccac ctctctgagc aagaaacaag aggtgaacat gagcgacagc 1020
10 gccctggact gcgtgaggga cgaggccatc aacaagctgc agcagatctt caacaccagc 1080
tacaaccaga cctacgagaa gtacggaaac gtgtccgtgt tcgagacaag cggcggactg 1140
gtggtgttct ggcagggcat caagcagaag tccttggtcg agctggagag gctggccaac 1200
aggtccagcc tgaacatcac ccacaccacc cagaccagca ccagcgacaa caacaccaca 1260
cacctgagca gcatggaaag cgtgcacaac ctggtgtatg cccagctgca gttcacctac 1320
15 gacaccctga ggggctacat caacagagcc ctggcccaga tcgccgaggc ttggtgcgtg 1380
gaccagagaa ggaccctgga ggtgttcaag gaactgtcca agatcaaccc cagcgccatc 1440
ctgagcgcca tctacaacia gccaatcgcc gccagattca tgggcgacgt gctgggcctg 1500
gccagctgcg tgaccatcaa ccagaccagc gtgaagggtg tgcgggacat gaacgtgaag 1560
gaaagcccag gccgctgcta ctccaggccc gtggtgatct tcaacttcgc caacagctcc 1620
20 tacgtgcagt acggccagct gggcgaggac aacgagatcc tgctgggaaa ccacaggacc 1680
gaggaatgcc agctgccag cctgaagatc tttatcgccg gcaactccgc ctacgagtac 1740
gtggactacc tgttcaagag gatgatcgac ctgtccagca tcagcacctg ggacagcatg 1800
atcgccctgg atatcgatcc cctggagaac accgacttca gggtgctgga gctgtactcc 1860
cagaaggaac tgaggtccag caacgtgttc gacctggagg aatcatgag agagttcaac 1920
25 agctacaagc agcgctgaa gtacgtggag gacaagggtg tggaccccct gccccctac 1980

ctgaagggcc tggacgacct gatgagcgga ctcggggctg ctggaaaggc c

2031

<210> 18

<211> 677

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

10

<400> 18

Met Ala Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu

1 5 10 15

Ala His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly

15 20 25 30

Asp Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser

35 40 45

Met Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys

50 55 60

20 Thr Ser Met Lys Pro Ile Asn Glu Asp Leu Asp Glu Gly Ile Met Val

65 70 75 80

Val Tyr Lys Arg Asn Ile Val Ala His Thr Phe Lys Val Arg Val Tyr

85 90 95

Gln Lys Val Leu Thr Phe Arg Arg Ser Tyr Ala Gly His Arg Thr Thr

25 100 105 110

Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Thr Glu Tyr Val Ala Pro Pro Met Trp Glu
 115 120 125
 Ile His His Ile Asn Lys Phe Ala Gln Cys Tyr Ser Ser Tyr Ser Arg
 130 135 140
 5 Val Ile Gly Gly Thr Val Phe Val Ala Tyr His Arg Asp Ser Tyr Glu
 145 150 155 160
 Asn Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser
 165 170 175
 Thr Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr
 10 180 185 190
 Ala Phe His Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr
 195 200 205
 Thr Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly
 210 215 220
 15 Asp Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala
 225 230 235 240
 Ser Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr
 245 250 255
 Thr Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His
 20 260 265 270
 Arg Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp
 275 280 285
 Ile Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala
 290 295 300
 25 Ser Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser

	305		310		315		320
	Ser	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr
	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu
	Val	Asn					
			325		330		335
	Met	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp
	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile
	Asn	Lys					
5			340		345		350
	Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr
	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu
	Lys	Tyr					
			355		360		365
	Gly	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu
	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val
	Phe	Trp					
			370		375		380
10	Gln	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser
	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu
	Ala	Asn					
			385		390		395
	Arg	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr
	His	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr
	Ser	Asp					
			405		410		415
	Asn	Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser
	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His
	Asn	Leu	Val				
15			420		425		430
	Tyr	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr
	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr
	Ile	Asn					
			435		440		445
	Arg	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala
	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln
	Arg						
			450		455		460
20	Thr	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu
	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser
	Ala	Ile					
			465		470		475
	Leu	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Lys
	Pro	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Met
	Gly	Asp					
			485		490		495
	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Cys
	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser
	Val	Lys					
25			500		505		510

Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser
 515 520 525
 Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr
 530 535 540
 5 Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr
 545 550 555 560
 Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser
 565 570 575
 Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser
 10 580 585 590
 Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu
 595 600 605
 Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu
 610 615 620
 15 Arg Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn
 625 630 635 640
 Ser Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro
 645 650 655
 Leu Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly
 20 660 665 670
 Ala Ala Gly Lys Ala
 675

<210> 19

25 <211> 661

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 19

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

Asn Lys Thr Met Gln Leu Ile Pro Asp Asp Tyr Ser Asn Thr His Ser
 145 150 155 160
 Thr Arg Tyr Val Thr Val Lys Asp Gln Trp His Ser Arg Gly Ser Thr
 165 170 175
 5 Ala Phe His Arg Glu Thr Cys Asn Leu Asn Cys Met Leu Thr Ile Thr
 180 185 190
 Thr Ala Arg Ser Lys Tyr Pro Tyr His Phe Phe Ala Thr Ser Thr Gly
 195 200 205
 Asp Val Val Tyr Ile Ser Pro Phe Tyr Asn Gly Thr Asn Arg Asn Ala
 10 210 215 220
 Ser Tyr Phe Gly Glu Asn Ala Asp Lys Phe Phe Ile Phe Pro Asn Tyr
 225 230 235 240
 Thr Ile Val Ser Asp Phe Gly Arg Pro Asn Ala Ala Pro Glu Thr His
 245 250 255
 15 Arg Leu Val Ala Phe Leu Glu Arg Ala Asp Ser Val Ile Ser Trp Asp
 260 265 270
 Ile Gln Asp Glu Lys Asn Val Thr Cys Gln Leu Thr Phe Trp Glu Ala
 275 280 285
 Ser Glu Arg Thr Ile Arg Ser Glu Ala Glu Asp Ser Tyr His Phe Ser
 20 290 295 300
 Ser Ala Lys Met Thr Ala Thr Phe Leu Ser Lys Lys Gln Glu Val Asn
 305 310 315 320
 Met Ser Asp Ser Ala Leu Asp Cys Val Arg Asp Glu Ala Ile Asn Lys
 325 330 335
 25 Leu Gln Gln Ile Phe Asn Thr Ser Tyr Asn Gln Thr Tyr Glu Lys Tyr

	340	345	350
	Gly Asn Val Ser Val Phe Glu Thr Ser Gly Gly Leu Val Val Phe Trp		
	355	360	365
	Gln Gly Ile Lys Gln Lys Ser Leu Val Glu Leu Glu Arg Leu Ala Asn		
5	370	375	380
	Arg Ser Ser Leu Asn Ile Thr His Thr Thr Gln Thr Ser Thr Ser Asp		
	385	390	395
	Asn Asn Thr Thr His Leu Ser Ser Met Glu Ser Val His Asn Leu Val		
	405	410	415
10	Tyr Ala Gln Leu Gln Phe Thr Tyr Asp Thr Leu Arg Gly Tyr Ile Asn		
	420	425	430
	Arg Ala Leu Ala Gln Ile Ala Glu Ala Trp Cys Val Asp Gln Arg Arg		
	435	440	445
	Thr Leu Glu Val Phe Lys Glu Leu Ser Lys Ile Asn Pro Ser Ala Ile		
15	450	455	460
	Leu Ser Ala Ile Tyr Asn Lys Pro Ile Ala Ala Arg Phe Met Gly Asp		
	465	470	475
	Val Leu Gly Leu Ala Ser Cys Val Thr Ile Asn Gln Thr Ser Val Lys		
	485	490	495
20	Val Leu Arg Asp Met Asn Val Lys Glu Ser Pro Gly Arg Cys Tyr Ser		
	500	505	510
	Arg Pro Val Val Ile Phe Asn Phe Ala Asn Ser Ser Tyr Val Gln Tyr		
	515	520	525
	Gly Gln Leu Gly Glu Asp Asn Glu Ile Leu Leu Gly Asn His Arg Thr		
25	530	535	540

Glu Glu Cys Gln Leu Pro Ser Leu Lys Ile Phe Ile Ala Gly Asn Ser
 545 550 555 560
 Ala Tyr Glu Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Lys Arg Met Ile Asp Leu Ser
 565 570 575
 5 Ser Ile Ser Thr Val Asp Ser Met Ile Ala Leu Asp Ile Asp Pro Leu
 580 585 590
 Glu Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu
 595 600 605
 Arg Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn
 10 610 615 620
 Ser Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro
 625 630 635 640
 Leu Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly
 645 650 655
 15 Ala Ala Gly Lys Ala
 660

<210> 20

<211> 660

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 20

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

	Ala	Arg	Ser	Lys	Tyr	Pro	Tyr	His	Phe	Phe	Ala	Thr	Ser	Thr	Gly	Asp
	195				200				205							
	Val	Val	Tyr	Ile	Ser	Pro	Phe	Tyr	Asn	Gly	Thr	Asn	Arg	Asn	Ala	Ser
	210				215				220							
5	Tyr	Phe	Gly	Glu	Asn	Ala	Asp	Lys	Phe	Phe	Ile	Phe	Pro	Asn	Tyr	Thr
	225				230				235				240			
	Ile	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg
	245				250				255							
	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile
10	260				265				270							
	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser
	275				280				285							
	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Ser	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser
	290				295				300							
15	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met
	305				310				315				320			
	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu
	325				330				335							
	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly
20	340				345				350							
	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
	355				360				365							
	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
	370				375				380							
25	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	His	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn

	385		390		395		400									
	Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr
			405				410				415					
	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg
5			420				425				430					
	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg	Thr
			435				440				445					
	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu
		450				455				460						
10	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Lys	Pro	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Met	Gly	Asp	Val
	465				470				475			480				
	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Val	Lys	Val
			485				490				495					
	Leu	Arg	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Glu	Ser	Pro	Gly	Arg	Cys	Tyr	Ser	Arg
15			500				505				510					
	Pro	Val	Val	Ile	Phe	Asn	Phe	Ala	Asn	Ser	Ser	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly
			515				520				525					
	Gln	Leu	Gly	Glu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Asn	His	Arg	Thr	Glu
		530				535					540					
20	Glu	Cys	Gln	Leu	Pro	Ser	Leu	Lys	Ile	Phe	Ile	Ala	Gly	Asn	Ser	Ala
	545				550				555			560				
	Tyr	Glu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Phe	Lys	Arg	Met	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser
			565				570				575					
	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Met	Ile	Ala	Leu	Asp	Ile	Asp	Pro	Leu	Glu
25			580				585				590					

Asn Thr Asp Phe Arg Val Leu Glu Leu Tyr Ser Gln Lys Glu Leu Arg
 595 600 605
 Ser Ser Asn Val Phe Asp Leu Glu Glu Ile Met Arg Glu Phe Asn Ser
 610 615 620
 5 Tyr Lys Gln Arg Val Lys Tyr Val Glu Asp Lys Val Val Asp Pro Leu
 625 630 635 640
 Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala
 645 650 655
 Ala Gly Lys Ala
 10 660

 <210> 21
 <211> 660
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> AD169 Citomegalovirus

 20 <400> 21

 His Arg Ala Asn Glu Thr Ile Tyr Asn Thr Thr Leu Lys Tyr Gly Asp
 1 5 10 15
 Val Val Gly Val Asn Thr Thr Lys Tyr Pro Tyr Arg Val Cys Ser Met
 20 25 30
 25 Ala Gln Gly Thr Asp Leu Ile Arg Phe Glu Arg Asn Ile Ile Cys Thr

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

	Ile	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ala	Pro	Glu	Thr	His	Arg
						245				250					255	
	Leu	Val	Ala	Phe	Leu	Glu	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Ile	Ser	Trp	Asp	Ile
					260				265					270		
5	Gln	Asp	Glu	Lys	Asn	Val	Thr	Cys	Gln	Leu	Thr	Phe	Trp	Glu	Ala	Ser
				275				280						285		
	Glu	Arg	Thr	Ile	Arg	Ser	Glu	Ala	Glu	Asp	Ser	Tyr	His	Phe	Ser	Ser
			290				295					300				
	Ala	Lys	Met	Thr	Ala	Thr	Phe	Leu	Ser	Lys	Lys	Gln	Glu	Val	Asn	Met
10	305					310				315					320	
	Ser	Asp	Ser	Ala	Leu	Asp	Cys	Val	Arg	Asp	Glu	Ala	Ile	Asn	Lys	Leu
					325				330					335		
	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Thr	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Gly
				340				345					350			
15	Asn	Val	Ser	Val	Phe	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln
			355					360					365			
	Gly	Ile	Lys	Gln	Lys	Ser	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Arg	Leu	Ala	Asn	Arg
		370				375						380				
	Ser	Ser	Leu	Asn	Ile	Thr	His	Thr	Thr	Gln	Thr	Ser	Thr	Ser	Asp	Asn
20	385				390					395					400	
	Asn	Thr	Thr	His	Leu	Ser	Ser	Met	Glu	Ser	Val	His	Asn	Leu	Val	Tyr
				405				410					415			
	Ala	Gln	Leu	Gln	Phe	Thr	Tyr	Asp	Thr	Leu	Arg	Gly	Tyr	Ile	Asn	Arg
				420				425				430				
25	Ala	Leu	Ala	Gln	Ile	Ala	Glu	Ala	Trp	Cys	Val	Asp	Gln	Arg	Arg	Thr

	435		440		445											
	Leu	Glu	Val	Phe	Lys	Glu	Leu	Ser	Lys	Ile	Asn	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu
	450		455		460											
	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Lys	Pro	Ile	Ala	Ala	Arg	Phe	Met	Gly	Asp	Val
5	465		470		475		480									
	Leu	Gly	Leu	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ile	Asn	Gln	Thr	Ser	Val	Lys	Val
			485		490		495									
	Leu	Arg	Asp	Met	Asn	Val	Lys	Glu	Ser	Pro	Gly	Arg	Cys	Tyr	Ser	Arg
			500		505		510									
10	Pro	Val	Val	Ile	Phe	Asn	Phe	Ala	Asn	Ser	Ser	Tyr	Val	Gln	Tyr	Gly
			515		520		525									
	Gln	Leu	Gly	Glu	Asp	Asn	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Asn	His	Arg	Thr	Glu
			530		535		540									
	Glu	Cys	Gln	Leu	Pro	Ser	Leu	Lys	Ile	Phe	Ile	Ala	Gly	Asn	Ser	Ala
15	545		550		555		560									
	Tyr	Glu	Tyr	Val	Asp	Tyr	Leu	Phe	Lys	Arg	Met	Ile	Asp	Leu	Ser	Ser
			565		570		575									
	Ile	Ser	Thr	Val	Asp	Ser	Met	Ile	Ala	Leu	Asp	Ile	Asp	Pro	Leu	Glu
			580		585		590									
20	Asn	Thr	Asp	Phe	Arg	Val	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ser	Gln	Lys	Glu	Leu	Arg
			595		600		605									
	Ser	Ser	Asn	Val	Phe	Asp	Leu	Glu	Glu	Ile	Met	Arg	Glu	Phe	Asn	Ser
			610		615		620									
	Tyr	Lys	Gln	Arg	Val	Lys	Tyr	Val	Glu	Asp	Lys	Val	Val	Asp	Pro	Leu
25	625		630		635		640									

Pro Pro Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Asp Leu Met Ser Gly Leu Gly Ala

645

650

655

Ala Gly Lys Ala

660

5

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 22

15 gaaagcgggc agtgagcgga aggc

24

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

25 <400> 23

	tgtcctccac gtacttcacg cgctgc	26
	<210> 24	
	<211> 26	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> AD169 Citomegalovirus	
10		
	<400> 24	
	cccgaacgac cgagcgcagc gagtca	26
	<210> 25	
15	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> AD169 Citomegalovirus	
	<400> 25	
	ccagctggcg aaaggggat gtgc	24
25	<210> 26	

<211> 228

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 26

atcgatcccc tggagaacac cgacttcagg gtgctggagc tgtactcca gaaggaactg 60
 10 aggtccagca acgtgttcga cctggaggaa atcatgagag agttcaacag ctacaagcag 120
 cgcgtgaagt acgtggagga caaggtggtg gaccccctgc cccctacct gaagggcctg 180
 gacgacctga tgagcggact cggggctgct ggaaaggcct gaggatcc 228

<210> 27

15 <211> 91

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 27

aatcaaaagc ttactagtgc cgccaccatg gccccctgc tgcttctgct gccctgctt 60
 tgggcagggg ccctggccca ccggggcaac g 91

<210> 28

<211> 38

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 28

10 gtaataggat ccggtacctc atcaggcctt tccagcag

38

<210> 29

<211> 42

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

20 <400> 29

aatcaaaagc ttactagtgc cgccaccatg gccccctgc tg

42

<210> 30

<211> 59

25 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

5

<400> 30

gacttatagg atcctcatca gtggtggtga tgatggtggc cgccggcctt tccagcagc 59

<210> 31

10 <211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 31

gtgcatcgtg tgcctgggat ccgaggccgt gagccacagg 40

20 <210> 32

<211> 40

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 32

cctgtggctc acggcctcgg atcccaggca cacgatgcac

40

5

<210> 33

<211> 55

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 33

15 gtgaacctgt gcatcgtgtg cctggccctg gccagccacc gggccaacga gacaa

55

<210> 34

<211> 55

<212> DNA

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

25 <400> 34

ttgtctcggtt ggcccgggtgg ctggccaggg ccaggcacac gatgcacagg ttcac 55

<210> 35

<211> 55

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

10

<400> 35

cctgtgcatc gtgtgcctgg gagccctggc cagccaccgg gccaacgaga caatc 55

<210> 36

15 <211> 55

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> AD169 Citomegalovirus

<400> 36

gattgtctcg ttggcccgggt ggctggccag ggctcccagg cacacgatgc acagg 55

25 <210> 37

<211> 68

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> AD169 Citomegalovirus

<400> 37

tggtgtgcgt gaacctgtgc atcgtgctcc tgggagccct ggcccaccgg gccaacgaga 60

10 caatctac

68

<210> 38

<211> 68

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> AD169 Citomegalovirus

20 <400> 38

gtagattgtc tcgttgccc ggtgggcccag ggctcccagg agcacgatgc acaggttcac 60

gcacacca

68

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está 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 LLORED A RICAURTE

T.P. No. 53.215

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

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

260567
Anita Escobar
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESAMPERA
LAS FUNCIONES INDICADAS

2004 SET 10 A 10:47

MECS
Jefe de Legaciones
Honorable





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 autentica. 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, **JAMES KERR MILLIGAN**, 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 **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.

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

Certified/Attesté

5. at London/à Londres 6. the/le 01 OCT 1961
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 G 749037

9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

W Glass

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 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, 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, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

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

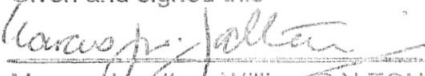
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial 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.



(43) International Publication Date
19 April 2012 (19.04.2012)

(10) International Publication Number
WO 2012/049317 A3

(51) International Patent Classification:

A61K 39/245 (2006.01) C07K 14/045 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2011/068040

(22) International Filing Date:

14 October 2011 (14.10.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/393,413 15 October 2010 (15.10.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.** [BE/BE]; rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BAUDOUX, Guy, Jean, Marie, Fernand, Pierre** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **BLAIS, Normand** [CA/CA]; ID Biomedical Corporation of Quebec, 525 Cartier Boulevard West, Laval, Québec H7V 3S8 (CA). **MARCHAND, Martine** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals S.A., rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(74) Agents: **VAN DEN HAZEL, Hendrik, Bart** et al.; Glaxo-SmithKline, Global Patents CN925.1, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,

HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))
- of inventorship (Rule 4.17(iv))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) Date of publication of the international search report:

21 June 2012

(54) Title: CYTOMEGALOVIRUS GB ANTIGEN

(57) Abstract: The invention relates to a cytomegalovirus (CMV) gB polypeptide comprising at least a portion of a gB protein extracellular domain comprising a fusion loop 1 (FL1) domain and a fusion loop 2 (FL2) domain, wherein at least one of the FL1 and FL2 domains comprises at least one amino acid deletion or substitution.



WO 2012/049317 A3

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference OAF/VB63857	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2011/068040	International filing date (<i>day/month/year</i>) 14/10/2011	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 15/10/2010
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

- ☐ the text is approved as submitted by the applicant
- ☒ the text has been established by this Authority to read as follows:

CYTOMEGALOVIRUS GB ANTIGEN

5. With regard to the **abstract**,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
- ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____
- ☐ as suggested by the applicant
- ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
- ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/068040

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. (means)

☐

 on paper
 - ☒

 in electronic form
 - b. (time)

☒

 in the international application as filed
 - ☐

 together with the international application in electronic form
 - ☐

 subsequently to this Authority for the purpose of search
2.

☐

 In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2011/068040

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 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:
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 No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

see additional sheet

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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.:
1-28, 31, 32, 39(completely); 30, 33-38, 40-49(partially)
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 and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/068040

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K39/245 C07K14/045
 ADD.

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)
 A61K

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)

EPO-Internal, EMBL, BIOSIS, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SINGH J ET AL: "CHARACTERIZATION OF A PANEL OF INSERTION MUTANTS IN HUMAN CYTOMEGALOVIRUS GLYCOPROTEIN B", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 3, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 1383-1392, XP001118928, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.74.3.1383-1392.2000 the whole document	1-28,30, 31,33-49
A	WO 2009/037359 A1 (SANOFI PASTEUR [FR]; U A B RES FOUNDATION [US]) 26 March 2009 (2009-03-26) cited in the application page 6, line 17 - line 28 page 9, line 10 - page 11, line 15 ----- -/-	1-28,30, 31,33-49



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 referring 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.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 2012

Date of mailing of the international search report

10/04/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Montero Lopez, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2011/068040

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 96/04382 A2 (CHIRON CORP [US]) 15 February 1996 (1996-02-15) page 29, line 22 - page 35, line 10; figure 10	1-28,30, 31,33-49
A	M. BACKOVIC ET AL: "Hydrophobic Residues That Form Putative Fusion Loops of Epstein-Barr Virus Glycoprotein B Are Critical for Fusion Activity", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 81, no. 17, 1 September 2007 (2007-09-01), pages 9596-9600, XP55015633, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.00758-07 abstract the whole document	1-28,30, 31,33-49
A	SPECKNER ANDREA ET AL: "The antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B contains an intramolecular disulphide bond", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 81, no. 11, November 2000 (2000-11), pages 2659-2663, XP002672059, ISSN: 0022-1317 page 2659, right-hand column, paragraph 3 - page 2661, left-hand column, paragraph 1; figure 1	32
A	SCHEFFCZIK<A> H ET AL: "Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 506, no. 2, 5 October 2001 (2001-10-05), pages 113-116, XP004308710, ISSN: 0014-5793, DOI: 10.1016/S0014-5793(01)02891-5 page 114, right-hand column, paragraph 3 - page 115, right-hand column, last paragraph	32
A	BRITT WILLIAM J ET AL: "Antigenic domain 1 is required for oligomerization of human cytomegalovirus glycoprotein B", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 79, no. 7, April 2005 (2005-04), pages 4066-4079, XP055022639, ISSN: 0022-538X page 4067, left-hand column, paragraph 2 page 4068, left-hand column, paragraph 2 - page 4070, right-hand column, paragraph 1; figures 3, 4; table 1	32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/068040

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009037359	A1	26-03-2009	AT 549031 T 15-03-2012
		CA 2699756 A1	26-03-2009
		EP 2203184 A1	07-07-2010
		US 2009104227 A1	23-04-2009
		WO 2009037359 A1	26-03-2009

WO 9604382	A2	15-02-1996	AT 383426 T 15-01-2008
		AU 3103195 A	04-03-1996
		CA 2196097 A1	15-02-1996
		DE 69535680 T2	11-12-2008
		EP 0802979 A1	29-10-1997
		WO 9604382 A2	15-02-1996

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-28, 31, 32, 39(completely); 30, 33-38, 40-49(partially)

CMV gB polypeptide comprising at least a portion of a gB protein extracellular domain comprising a fusion loop 1 domain and a fusion loop 2 domain, wherein at least one of the fusion loop domains comprises at least one amino acid deletion or substitution

2. claims: 29(completely); 30, 33-38, 40-49(partially)

CMV gB polypeptide comprising a deletion of at least 40% of the leader sequence

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 25-04-13			
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/245			
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
(72) Inventor(es): BAUDOUX, Guy Jen, Marie, Fernand, Pierre; BLAIS, Normand y MARCHAND, Martine.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/393,413	(32) Fecha 15-10-10	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 15-05-13		(87) Publicación internacional:	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-10-11 No. de solicitud: PCT/EP2011/068040		Fecha: 19-04-12 No. Publicación: WO 2012/049317 A3	
(54) Título: ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS.			
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- La invención se refiere a un polipéptido gB de citomegalovirus (CMV) que comprende al menos una porción de un dominio extracelular de proteína gB que comprende un dominio de bucle de fusión 1 (FL1) y un dominio de bucle de fusión 2 (FL2), en donde al menos uno de los dominios FL1 y FL2 comprende al menos una eliminación o sustitución de aminoácido. Sector: Industria farmacéutica, y particularmente un polipéptido gB de Citomegalovirus y preparaciones farmacéuticas que lo contienen.			

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____			
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 25-04-13			
(51) Clasificación Internacional: A61K 39/245			
(71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
(72) Inventor(es): BAUDOUX, Guy Jen, Marie, Fernand, Pierre; BLAIS, Normand y MARCHAND, Martine.			
(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad 61/393,413	(32) Fecha 15-10-10	(33) País US
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 15-05-13		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 14-10-11 No. de solicitud: PCT/EP2011/068040		Fecha: 19-04-12 No. publicación: WO 2012/049317 A3	
(54) Título: ANTIGENO GB DE CITOMEGALOVIRUS.			