Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

Organizacion CSA Ltda

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE No. 07-88653

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

54. TÍTULO CONSTRUCCIONES DE ACIDO NUCLEICO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K39/245. A61P31/12. A61P31/16

SOLICITANTE POWDERJECT VACCINES , INC

DOMICILIO WILMINGTON, DELAWARE , ESTADOS UNIFDOS DE AMERICA

74. APODERADO EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., 29/08/2007

SS

(FORMA P-10)

98124 -Imprenta Nacional de Colombia - 2007

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-088653- -00000-0000
Fecha: 2007-08-29 16:39:05 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 495

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

01/09/2007

1 SOLICITUD DE:

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

2 SOLICITANTE (71)

Nombre: **POWDERJECT VACCINES, INC** sociedad constituida y existente bajo las leyes de los Estados de Delaware y Wisconsin, Estados Unidos de América.

Dirección: 2711 Centerville Road,
Suite 400,
Wilmington,
Delaware 19808,
Estados Unidos de América

Domicilio: Wilmington,
Delaware,
Estados Unidos de América

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3 REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 438.019 T.P 31.929

4 INVENTOR (ES) (72)

1. **James FULLER**
135 Southridge Drive,
Cranberry TWP,
Pennsylvania 16066,
Estados Unidos de América

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB06/000344 Fecha: 01 de febrero de 2006
Publicación Internacional No. WO 2006/082398 Fecha: 10 de agosto de 2006

6 TÍTULO (54) CONSTRUCCIONES DE ACIDO NUCLÉICO

7 Clasificación Internacional (51) A61K 039/245 // A61P31/12 // A61P31/16

8 Prioridad SI☒ NO☐

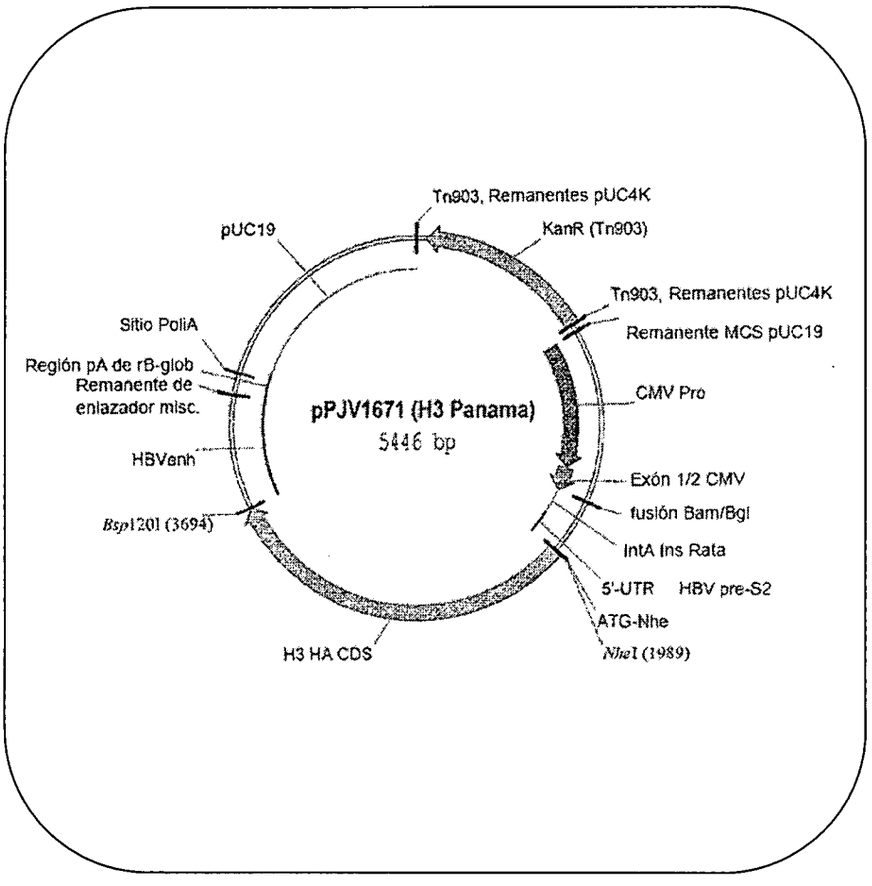
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	01 de febrero de 2005	60/648,382
US	19 de abril de 2005	60/672,497
GB	20 de abril de 2005	0507997.5

9 Comprobante de pago No.: 07-63,295 **Fecha:** 6 de agosto de 2007

10 Anexos:

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por $ 482.000.oo.
- [ ] Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Poderes, si fuere el caso.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [x] Arte final 12x12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

SCT

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2006/082398 A3

   Descripción:

   Páginas 131 en el idioma original

   Páginas 233 en español

   Reivindicaciones: Número (s) 114

   Figuras: Número (s) 51

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒Extracto de publicación.

NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE INTERNACIONAL

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
10 August 2006 (10.08.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/082398 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/245 (2006.01) *C12N 15/44* (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) *C12N 15/38* (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
A61K 9/16 (2006.01) *C12N 15/36* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2006/000344

(22) International Filing Date: 1 February 2006 (01.02.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

60/648,382	1 February 2005 (01.02.2005)	US
60/672,497	19 April 2005 (19.04.2005)	US
0507997.5	20 April 2005 (20.04.2005)	GB

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **POWDER JECT VACCINES, INC.** [US/US]; 2711 Centerville Road, Suite 400, Wilmington, DE 19808 (US).

(71) Applicant *(for MG only)*: **POWDERMED LIMITED** [GB/GB]; 2nd Floor Park Gate, 25 Milton Park, Abingdon, Oxfordshire OX14 4SH (GB).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: **FULLER, James** [US/US]; 135 Southridge Drive, Cranberry TWP, Pennsylvania, PA 16066 (US).

(74) Agents: **WOODS, Geoffrey, Corlett** et al.; J.A. Kemp & Co., 14 South Square, Gray's Inn, London WC1R 5JJ (GB).

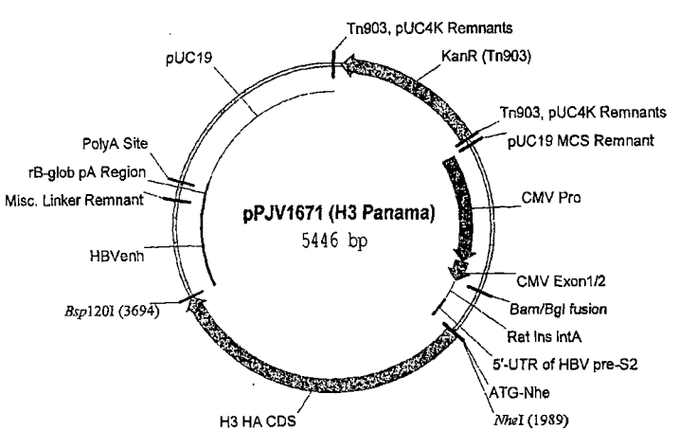
(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

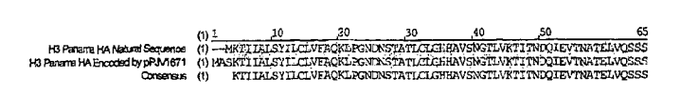
(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT,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

Published:
— *with international search report*

[Continued on next page]

(54) Title: NUCLEIC ACID CONSTRUCTS





(57) Abstract: A nucleic acid construct comprising a chimeric promoter sequence and a cloning site for insertion of a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, wherein the chimeric promoter sequence comprises: (a) a Hcmv immediate early promoter sequence; (b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and (c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

WO 2006/082398 A3

WO 2006/082398 A3

(88) Date of publication of the international search report:
19 October 2006

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

NUCLEIC ACID CONSTRUCTS

Field of the Invention

The invention relates to the fields of molecular biology and immunology and generally to reagents useful in nucleic acid immunisation techniques. More specifically, the invention relates to nucleic acid constructs for the expression of polypeptides and in particular antigenic polypeptides, particularly influenza antigens as well as the expression of adjuvant polypeptides and to nucleic acid immunisation strategies using such reagents

Background of the Invention

Gene therapy and nucleic acid immunisation are promising approaches for the treatment and prevention of both acquired and inherited diseases. These techniques provide for the transfer of a desired nucleic acid into a subject with subsequent *in vivo* expression. Transfer can be accomplished by transfecting the subject's cells or tissues *ex vivo* and reintroducing the transformed material into the host. Alternatively, the nucleic acid can be administered *in vivo* directly to the recipient.

Each of these techniques requires efficient expression of the nucleic acid in the transfected cell, to provide a sufficient amount of the therapeutic or antigenic gene product. Several factors are known to affect the levels of expression obtained, including transfection efficiency, and the efficiency with which the gene or sequence of interest is transcribed and the mRNA translated.

A number of expression systems have been described in the art, each of which typically consists of a vector containing a gene or nucleotide sequence of interest operably linked to expression control sequences. These control sequences include transcriptional promoter sequences and transcriptional start and termination sequences. Commonly used promoters for mammalian cell expression systems include the SV40 early promoter, a cytomegalovirus (CMV) promoter such as the CMV immediate early promoter (Chapman *et al* (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:3979-3986), the mouse mammary tumour virus long terminal repeat (LTR) promoter, the adenovirus major late promoter (Ad MLP) and the herpes simplex virus (HSV)

promoter, among others. Nonviral promoters, such as a promoter derived from the murine metallothionein gene are also commonly used.

Expression systems often include transcriptional modulator elements, referred to as "enhancers". Enhancers are broadly defined as a cis-acting agent, which when operably linked to a promoter/gene sequence, will increase transcription of that gene sequence. Enhancers can function from positions that are much further away from a sequence of interest than other expression control elements (e.g. promoters), and can operate when positioned in either orientation relative to the sequence of interest (Banerji *et al.* (1981) *Cell* 27:299-308, deVilleirs *et al.* (1981) *Nucl. Acids Res* 9: 6251-6264). Enhancers have been identified from a number of viral sources, including polyoma virus, BK virus, cytomegalovirus (CMV), adenovirus, simian virus 40 (SV40), Moloney sarcoma virus, bovine papilloma virus and Rous sarcoma virus (deVilleirs *et al supra*, Rosenthal *et al.* (1983) *Science* 222:749-755, Hearing *et al.* (1983) *Cell* 33:695-703, Weeks *et al.* (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:1222-1234, Levinson *et al.* (1982) *Nature* 295: 568-572, and Luciw *et al.* (1983) *Cell* 33: 705-716).

A number of expression systems for nucleic acid immunisation and gene therapy make use of the hCMV immediate early promoter. See eg US Patent Nos. 5168062 and 5385839 to Stinski, and EP Patent Specification 0323997 B1. Expression vectors using the hCMV immediate early promoter include for example, pWRG7128 (Roy *et al*, Vaccine 19, 764-778, 2001), and pBC12/CMV and pJW4303 which are mentioned in WO 95/20660. Chapman *et al* (1991) *supra* report reduced levels of expression from the hCMV immediate early promoter in the absence of hCMV Intron A.

Summary of the Invention

A nucleic acid construct has been developed using manipulated viral promoter/expression sequences that provides enhanced expression of heterologous coding sequences in host cells. The construct is suitable for efficient expression of genes and in particular antigen-encoding genes, and can therefore be used in nucleic acid immunisation. The construct may also be used to express adjuvant polypeptides The construct can be provided on carrier particles, for use in particle-mediated

nucleic acid immunisation. In an especially preferred embodiment of the invention the construct encodes an influenza antigen, immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either. In a further especially preferred embodiment the construct encodes an adjuvant polypeptide.

Accordingly, the present invention provides a nucleic acid construct suitable for delivery to a subject for inducing an immune response against influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, which construct comprises:

(i) a chimeric promoter sequence comprising:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene;

(ii) a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment having at least 80% amino acid homology to said antigen or fragment;

(iii) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; and

(iv) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, which is in operable linkage with the chimeric promoter and which is downstream of coding sequence.

The present invention also provides a nucleic acid construct suitable for delivery to a subject for inducing an immune response against influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, which construct comprises:

(i) a chimeric promoter sequence comprising:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene; and

(ii) a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment having at least 80% amino acid homology to said antigen or fragment.

Further, the present invention provides a nucleic acid construct comprising a chimeric promoter sequence and a cloning site for insertion of a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, wherein the chimeric promoter sequence comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

In a preferred instance, the construct comprises a coding sequence inserted into the cloning site. Thus, a coding sequence may be provided in the cloning site.

In a further preferred embodiment a construct of the invention may further comprise:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; and/or

(b) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence, or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter, wherein the enhancer sequence is downstream of the cloning site.

The invention also provides a nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence operably linked to the promoter, where the construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence, which is in operable linkage with the coding sequence and promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence, where the enhancer sequence is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

The invention also provides a nucleic acid construct comprising:

(i) a chimeric promoter sequence which comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene; and

(ii) a cloning site for insertion of a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter; and

(iii) (a) a non-translated leader sequence which is derived from HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter;and/or

(b) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence, or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter, wherein the enhancer sequence is downstream of the cloning site.

The invention also provides a nucleic acid construct comprising:

(i) a promoter sequence;

(ii) a non-translated leader sequence derived from HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence; and

(iii) a coding sequence operably linked to (i) and (ii)

wherein the coding sequence is heterologous to the non-translated leader sequence.

The invention also provides a nucleic acid construct comprising:

(i) a promoter sequence;

(ii) a coding sequence operably linked to the promoter sequence (i); and

(iii) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence (ii);

wherein the enhancer sequence (iii) is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence (ii) is heterologous to the 3' enhancer sequence.

The present invention also provides a nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence operably linked to the promoter, where the construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence, which is in operable linkage with the coding sequence and promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence, where the enhancer sequence is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

The present invention additionally provides a population of nucleic acid constructs where the population comprises at least two different constructs of the invention.

In another instance, the invention provides a purified isolated chimeric promoter sequence which comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

The invention also provides

- a method of obtaining expression in mammalian cells of a polypeptide of interest, which method comprises transferring into said cells a nucleic acid construct, a population of nucleic acid constructs or coated particles of the invention;
- coated particles, suitable for delivery from a particle-mediated delivery device, which particles comprise carrier particles coated with a nucleic acid construct of the invention, the construct including a coding sequence encoding the polypeptide;
- a dosage receptacle for a particle mediated delivery device comprising the coated particles;
- a particle mediated delivery device loaded with the coated particles;
- a method of nucleic acid immunisation comprising administering to a subject an effective amount of the coated particles of the invention;
- a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid construct of the invention or a population of nucleic acid constructs of the invention together with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient;
- a vaccine composition comprising a nucleic acid construct of the invention or a population of nucleic acid constructs of the invention or coated particles of the invention.

Also provided for is the use of a nucleic acid construct of the invention, a population of nucleic acid constructs of the invention or coated particles of the invention in the manufacture of a medicament for nucleic acid immunisation.

These and other objects, aspects, embodiments and advantages of the present invention will readily occur to those of ordinary skill in the art in view of the disclosure herein.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 illustrates the levels of expression of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) obtained using various plasmid expression vectors.

Figure 2 shows the effect of intron inclusion on expression of HBsAg in SCC15 cells and of beta-gal in B16 cells (average of three experiments).

Figure 3 shows the effect of rat insulin intron A and HBV3' UTR on expression of beta-gal in SCC15 cells (average of three experiments).

Figure 4 shows the effect of rat insulin intron A and HBV3' UTR on expression of HSVgD in SCC15 cells (average of three experiments).

Figure 5 shows the effect of rat insulin intron A and HBV3' UTR on expression of SEAP in SCC15 and B16 cells (three repetitions per cell line).

Figure 6 shows the ability of heterologous signal peptides to direct secretion of SEAP or hFc fragment in B16 cells.

Figure 7 illustrates levels of antibodies detected in the sera of mice immunised with antigen-encoding nucleic acids contained in a variety of plasmid expression vectors.

Figure 8 is a diagrammatic representation of the pPJV expression vector.

Figure 9 is a diagrammatic representation of pPJV7389.

Figure 10 is a diagrammatic representation of pPJV7400.

Figure 11 is a diagrammatic representation of pPJV7468.

Figure 12 is a diagrammatic representation of pPJV7563.

Figure 13 sets out the base composition for pPJV7563.

Figure 14 provides a flowchart of the derivitisation of plasmids pPJV7563 and pPJV1671.

Figure 15 provides maps of the key plasmids in the construction of pPJV1671.

Figure 16 provides a feature map of pPJV1671 and provides a sequence comparison of the N termini sequences of the natural H3 Panama HA antigen and of the H3 Panama HA antigen encoded by pPJV1671.

Figure 17 shows the hemagglutination inhibition antibody titres in pigs vaccinated with pPJV1671.

Figure 18 shows the local skin reactions following particle mediated epidermal delivery of pPJV1671 to humans.

Figure 19 shows hemagglutination Inhibition antibody titres in pigs immunized with a PMED based trivalent vaccine. HI titers specific for the H3, H1 and B viruses are shown for two PMED devices.

Figure 20 is a diagrammatic representation of pPML7789.

Figure 21 shows the annotated sequence of pPML7789.

Figure 22 is a diagrammatic representation of pPJV2012.

Figure 23 is a flow chart for the construction of pPJV2012.

Figure 24 provides the annotated sequence of pPJV2012.

Figure 25 is a diagrammatic representation of the vector pPJV7788.

Figure 26 is a diagrammatic representation of the vector pPJV7788 showing restriction sites.

Figure 27 is a diagrammatic representation of pICP27.

Figure 28 is the amino acid sequence (SEQ ID NO:65) of ICP27 from MS strain of HSV-2 based on the nucleotide sequence of pICP27. The single amino acid difference between the published sequence of ICP27 from HSV-2 strain MS (asparagine=N) and strain HG52 (lysine) is in bold face type. The sequence identified as the putative CD8 epitope in HSV-2 strain MS is underlined.

Figure 29 shows the identification of a dominant ICP27 epitope in Balb/c mice. A: Spleen (S) and lymph node (N) cells from HSV-2 infected Balb/c mice (BS and BN, respectively) or C57BL/6 mice (CS and CN) were assayed for IFN-γ ELISPOT activity using various peptide pools (C1-C12, R1-R6) described in Example 22. 5×10^5 cells were plated into each well and results are tabulated as negative (empty squares), weak (<25 ELISPOTs/well, grey squares) or strong (>25 ELISPOTs/well, black squares). B: Sequences of the two peptides (SEQ ID NOS:66 and 67) recognized by cells from Balb/c mice highlighting a potential HSV-2 Dd epitope (bold) and a region (underlined) corresponding to a previously identified HSV-1 epitope (Banks *et al*, J. Virol. 67, 613-616, 1993).

Figure 30 reports characterizing the Balb/c response to ICP27 using an IFN-γ ELISPOT assay. Spleen cells from infected Balb/c mice were assayed for IFN-γ ELISPOT activity using the peptide pool made of all peptides from ICP27 (Pool), or

individual peptides HGPSLYRTF (P1, SEQ ID NO:68) and LYRTFAANPRA (P2, SEQ ID NO:69). 5 x 10^5 cells were plated into each well and results are expressed as number of ELISPOTs/well. In addition, an aliquot of the spleen cell sample was treated with magnetic beads to deplete the sample of CD8+ cells as described in Example 22. The original sample (+CD8) and depleted sample (-CD8) were assayed for IFN-γ ELISPOT activity using the peptide pool made of all peptides from ICP27 (Pool).

Figure 31 shows the correlation between HSV-2 challenge protection and ICP27-specific cytokine production. Groups of 16 mice received primary and booster PMED DNA immunizations consisting of the pICP27 DNA vaccine with and without CT DEI vector pPJV2013 (dual A+B subunit) or subunit LT DEI vector pPJV2012 (dual A+B). The pICP27 to DEI vector was a ratio of 9:1. Panel A: post challenge survival data. Half of the animals in each group were challenged two weeks following the second immunization with 50 LD_{50} of HSV-2. Panels B and C: ICP27-specific IFN-γ and TNF-α production in each group, respectively. The remaining animals were sacrificed at the same time and splenocytes were collected for measurement of ICP27-specific cytokine production using a cytometric bead array kit.

Figure 32 shows the role of IFN-γ and TNF-α in protection from HSV-2 lethal challenge – morbidity evaluation. Groups of 4 mice received primary and booster immunizations with the pICP27 PMED DNA vaccine with (4 groups) or without (1 group) the pPJV2012 dual A+B LT DEI vector. The pICP27 to DEI vector was a ratio of 9:1. Animals were intranasally challenged two weeks later with 50 LD_{50} of HSV-2. For T-cell depletion, mice received intraperitoneal injections containing 200 μg of monoclonal antibody specific for IFN-γ and/or TNF-α on days –2, 0, 2, 4, 6, and 8 relative to virus challenge as described in Example 22. Animals were monitored for mortality (% survival) and morbidity, scored on a scale of 0 to 4 according to the following schedule: 4, healthy; 3, ruffled fur, sneezing; 2, sores on eyes or rump, reduced movement; 1, hunched, little movement; 0, dead.

Figure 33 shows the role of T-cell populations in protection from HSV-2 lethal challenge. Five groups of 4 mice received primary and booster immunizations with the pICP27 PMED DNA vaccine with (+LT, 4 groups) or without (-LT, 1

group) the pPJV2012 dual A+B LT DEI vector. The pICP27 to DEI vector was a ratio of 9:1. Animals were challenged intranasally with 50 LD_{50} of HSV-2 two weeks later. Three groups of the ICP27+LT DEI-immunized animals were treated with intraperitoneal injections of 90 μg of αCD4 and/or αCD8-specific monoclonal antibodies at, days -2 and 0 relative to virus challenge. In order to keep the total DNA in the pICP27 alone group (indicated as -LT) equal to the pICP27 + LT groups, empty vector was added to the pICP27 alone group.

Brief Description of the Sequences

SEQ ID NO:1 is hCMV immediate early promoter sequence (GenBank #M60321, X17403)

SEQ ID NO:2 is sequence from exons 1 and 2 of the hCMV major immediate early gene (GenBank #M60321, X17403)

SEQ ID NO:3 is rat insulin intron A sequence (GenBank #J00748)

SEQ ID NO:4 is the sequence of a chimeric promoter according to the present invention

SEQ ID NO:5 is a leader sequence from HBV pre S2 antigen 5' UTR sequence (GenBank #M54923)

SEQ ID NO:6 is a leader sequence from HSV type 2 gD 5' UTR sequence (GenBank #Z86099)

SEQ ID NO:7 is a leader sequence from HBV e antigen 5' UTR sequence (GenBank #M54923)

SEQ ID NO:8 is HBVenh 3' UTR sequence (GenBank #AF143308)

SEQ ID NO:9 is simian immediate early gene 3' UTR sequence (GenBank #M16019)

SEQ ID NO:10 is rabbit globin poly A sequence (GenBank #K03256)

SEQ ID NO:11 is simian sCMV immediate early gene poly A sequence (GenBank #M16019)

SEQ ID NO:12 is HSV2 gB gene poly A sequence (GenBank #Z86099)

SEQ ID NO:13 is HPV16 early gene poly A sequence (GenBank #K02718)

SEQ ID NO:14 is the sequence of the pPJV expression vector

SEQ ID NO:15 is PCR primer JF93

SEQ ID NO:16 is PCR primer F110
SEQ ID NO:17 is PCR primer GW1
SEQ ID NO:18 is PCR primer JF254
SEQ ID NO:19 is PCR primer GW150
SEQ ID NO:20 is PCR primer JF255
SEQ ID NO:21 is PCR primer DS1
SEQ ID NO:22 is PCR primer DA1
SEQ ID NO:23 is PCR primer JF301
SEQ ID NO:24 is PCR primer JF302
SEQ ID NO:25 is PCR primer JF84
SEQ ID NO:26 is PCR primer JF225
SEQ ID NO:27 is PCR primer JF335
SEQ ID NO:28 is PCR primer JF336
SEQ ID NO:29 is PCR primer JF357
SEQ ID NO:30 is PCR primer JF365
SEQ ID NO:31 is PCR primer JF393
SEQ ID NO:32 is PCR primer JF406
SEQ ID NO:33 is PCR primer JF256
SEQ ID NO:34 is PCR primer JF257
SEQ ID NO:35 is PCR primer JF320
SEQ ID NO:36 is PCR primer JF321
SEQ ID NO:37 is PCR primer JF386
SEQ ID NO:38 is PCR primer FcAS
SEQ ID NO:39 is oligonucleotide JF354
SEQ ID NO:40 is PCR primer JF355
SEQ ID NO:41 is PCR primer JF356
SEQ ID NO:42 is oligonucleotide JF348
SEQ ID NO:43 is PCR primer JF349
SEQ ID NO:44 is PCR primer JF350
SEQ ID NO:45 is oligonucleotide JF351
SEQ ID NO:46 is PCR primer JF352
SEQ ID NO:47 is PCR primer JF353

SEQ ID NO:48 is PCR primer JF430

SEQ ID NO:49 is PCR primer JF442

SEQ ID NO:50 is PCR primer JF421

SEQ ID NO:51 is PCR primer JF444

SEQ ID NO:52 is Pseudorabies virus (PRV) promoter sequence.

SEQ ID NO:53 is Rous sarcoma virus (RSV) promoter sequence.

SEQ ID NO:54 provides the nucleotide sequence of the pPJV1671 vector and the amino acid sequence of the encoded H3N2 HA antigen.

SEQ ID NO:55 provides the amino acid sequence alone of the H3N2 HA antigen encode by pPJV1671.

SEQ ID NO:56 provides the natural N terminal amino acid sequence of the H3 Panama HA antigen.

SEQ ID NO:57 provides the N terminal amino acid sequence for the H3 Pananama HA antigen encoded by pPJV1671.

SEQ ID NO:58 provides the consensus sequence of the sequences of SEQ ID Nos. 56 and 57.

SEQ ID NO:59 provides the nucleotide sequence of the pPML7789 vector and the amino acid sequence of the VN1194H5 antigen.

SEQ ID NO:60 provides the amino acid sequence alone of the VN1194H5 antigen.

SEQ ID NO:61 provides the nucleotide sequence of the pPJV2012 vector.

SEQ ID NO:62 provides the nucleotide sequence of the PJV7788 vector.

SEQ ID NOS:63 and 64 are the 5' and 3' primers used in Example 22 to amplify DNA of the MS strain of HSV-2.

SEQ ID NO:65 is the amino acid sequence of ICP27 from MS strain of HSV-2 based on the nucleotide sequence of pICP27, Example 22.

SEQ ID NOS:66 and 67 are peptides 45 and 46 recognised by cells from Balb/c mice in Example 22.

SEQ ID NO:68 is a homologous nine amino acid sequence contained in peptides 45 and 46.

SEQ ID NOS:69 and 70 are amino acid regions of HSV-2 ICP27 and HSV-1 ICP27 that differ by one amino acid.

Detailed Description of the Invention

Before describing the present invention in detail, it is to be understood that this invention is not limited to particularly exemplified molecules or process parameters as such may, of course, vary. It is also to be understood that the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments of the invention only, and is not intended to be limiting. In addition, the practice of the present invention will employ, unless otherwise indicated, conventional methods of virology, microbiology, molecular biology, recombinant DNA techniques and immunology all of which are within the ordinary skill of the art. Such techniques are explained fully in the literature. See, e.g., Sambrook, *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); and *Fundamental Virology*, 2nd Edition, vol. I & II (B.N. Fields and D.M. Knipe, eds.).

All publications, patents and patent applications cited herein, whether *supra* or *infra*, are hereby incorporated by reference in their entirety.

It must be noted that, as used in this specification and the appended claims, the singular forms "a," "an" and "the" include plural referents unless the content clearly dictates otherwise.

In instances where a particular agent is specified as comprising particular units, in a preferred instance the agent may consist essentially of such units.

A. Definitions

Unless defined otherwise, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which the invention pertains. Although a number of methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice of the present invention, the preferred materials and methods are described herein.

In describing the present invention, the following terms will be employed, and are intended to be defined as indicated below.

The term "nucleic acid immunization" is used herein to refer to the

introduction of a nucleic acid molecule encoding one or more selected antigens or polypeptides into a host cell for the *in vivo* expression of the antigen or antigens. The nucleic acid molecule can be introduced directly into the recipient subject, such as by standard intramuscular or intradermal injection; transdermal particle delivery; inhalation; topically, or by oral, intranasal or mucosal modes of administration. In particular, the nucleic acid may be administered via transdermal particle delivery. The molecule alternatively can be introduced *ex vivo* into cells which have been removed from a subject. In this latter case, cells containing the nucleic acid molecule of interest are re-introduced into the subject such that an immune response can be mounted against the antigen encoded by the nucleic acid molecule. The nucleic acid molecules used in such immunization are generally referred to herein as "nucleic acid vaccines." Any of the nucleic acids mentioned herein may be present in such vaccines and in particular the nucleic acid constructs mentioned herein may be present.

The term "adjuvant intends an material or composition capable of specifically or non-specifically altering, enhancing, directing, redirecting, potentiating or initiating an antigen specific immune response. Thus, coadminisration of an adjuvant with an antigen may result in a lower dose or fewer doses of antigen being necessary to achieve a desired immune response in the subject to which the antigen is administered, or coadministration may result in a qualitatively and/or quantitavely different immune response in the subject. In particular, the administration of the adjuvant may result in an enhanced immune response such as one of greater magnitude and/or duration. The effectiveness of an adjuvant can be determined by administering the adjuvant with a vaccine composition in parallel with a vaccine composition alone to animals and comparing antibody and/or cellular mediated immunity in the two groups using standard assays such as radioimmunoassay, ELISAs, and CTL assays. The constructs of the invention may express one or more adjuvant polypeptides.

By "core carrier" is meant a carrier on which a guest nucleic acid (e.g., DNA, RNA) is coated in order to impart a defined particle size as well as a sufficiently high density to achieve the momentum required for cell membrane penetration, such that the guest molecule can be delivered using particle-mediated techniques (see, e.g.,

U.S. Patent No. 5,100,792). Core carriers typically include materials such as tungsten, gold, platinum, ferrite, polystyrene and latex. See e.g., *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, New York, NY pages 10-11.

By "needleless syringe" is meant an instrument which delivers a particulate composition transdermally without the aid of a conventional needle to pierce the skin. Needleless syringes for use with the present invention are discussed herein.

The term "transdermal" delivery intends intradermal (e.g., into the dermis or epidermis), transdermal (e.g., "percutaneous") and transmucosal administration, i.e., delivery by passage of an agent into or through skin or mucosal tissue. *See, e.g., Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives*, Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); and *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987). Thus, the term encompasses delivery from a needleless syringe as described in U.S. Patent No. 5,630,796, as well as particle-mediated delivery as described in U.S. Patent No. 5,865,796.

A "polypeptide" is used in it broadest sense to refer to a compound of two or more subunit amino acids, amino acid analogs, or other peptidomimetics. The subunits may be linked by peptide bonds or by other bonds, for example ester, ether, etc. As used herein, the term "amino acid" refers to either natural and/or unnatural or synthetic amino acids, including glycine and both the D or L optical isomers, and amino acid analogs and peptidomimetics. A peptide of three or more amino acids is commonly called an oligopeptide if the peptide chain is short. If the peptide chain is long, the peptide is typically called a polypeptide or a protein.

An "antigen" refers to any agent, generally a macromolecule, which can elicit an immunological response in an individual. The term may be used to refer to an individual macromolecule or to a homogeneous or heterogeneous population of antigenic macromolecules. As used herein, "antigen" is generally used to refer to a protein molecule or portion thereof which contains one or more epitopes. An "antigen" may comprise, for instance, a naturally occurring polypeptide, a fragment of such a polypeptide which is immunogenic or a variant form of either which retains

immunogenicity. In a preferred instance, where a fragment or variant is referred to, the immune response generated may preferably be capable of recognizing the original polypeptide from which the fragment or variant is derived.

For the purposes of the present invention, antigens can be obtained or derived from any appropriate source. For the purposes of the present invention, an "antigen" includes a protein having modifications, such as deletions, additions and substitutions (generally conservative in nature) to the native sequence, so long as the protein maintains sufficient immunogenicity. These modifications may be deliberate, for example through site-directed mutagenesis, or may be accidental, such as through mutations of hosts which produce the antigens. In a particularly preferred embodiment of the invention the antigen employed or encoded may be an influenza antigen, an immunogenic fragment of an influenza antigen or an immunogenic variant of either.

An "immune response" against an antigen of interest is the development in an individual of a humoral and/or a cellular immune response to that antigen. For purposes of the present invention, a "humoral immune response" refers to an immune response mediated by antibody molecules, while a "cellular immune response" is one mediated by T-lymphocytes and/or other white blood cells.

The terms "nucleic acid molecule" and "polynucleotide" are used interchangeably herein and refer to a polymeric form of nucleotides of any length, either deoxyribonucleotides or ribonucleotides, or analogs thereof. Polynucleotides may have any three-dimensional structure, and may perform any function, known or unknown. Non-limiting examples of polynucleotides include a gene, a gene fragment, exons, introns, messenger RNA (mRNA), transfer RNA, ribosomal RNA, ribozymes, cDNA, recombinant polynucleotides, branched polynucleotides, plasmids, vectors, isolated DNA of any sequence, isolated RNA of any sequence, nucleic acid probes, and primers.

A polynucleotide is typically composed of a specific sequence of four nucleotide bases: adenine (A); cytosine (C); guanine (G); and thymine (T) (uracil (U) for thymine (T) when the polynucleotide is RNA). Thus, the term nucleic acid sequence is the alphabetical representation of a polynucleotide molecule. This alphabetical representation can be input into databases in a computer having a central

processing unit and used for bioinformatics applications such as functional genomics and homology searching.

A "vector" is capable of transferring nucleic acid sequences to target cells (e.g., viral vectors, non-viral vectors, particulate carriers, and liposomes). The target cells may be procaryotic or eucaryotic. Typically, "vector construct," "expression vector," and "gene transfer vector," mean any nucleic acid construct capable of directing the expression of a gene of interest and which can transfer gene sequences to target cells. Thus, the term includes cloning and expression vehicles, as well as viral vectors. A "plasmid" is a vector in the form of an extrachromosomal genetic element.

A nucleic acid sequence which "encodes" a selected antigen is a nucleic acid molecule which is transcribed (in the case of DNA) and translated (in the case of mRNA) into a polypeptide *in vivo* or *in vitro* when placed under the control of appropriate regulatory sequences. The boundaries of the coding sequence are determined by a start codon at the 5' (amino) terminus and a translation stop codon at the 3' (carboxy) terminus. For the purposes of the invention, such nucleic acid sequences can include, but are not limited to, cDNA from viral, procaryotic or eucaryotic mRNA, genomic sequences from viral or procaryotic DNA or RNA, and even synthetic DNA sequences. A transcription termination sequence may be located 3' to the coding sequence.

In some cases a transcribed sequence may give rise to multiple polypeptides, for instance a transcript may contain multiple open reading frames (ORFs) and also one or more Internal Ribosome Entry Sites (IRES) to allow translation of ORFs after the first ORF. A transcript may be translated to give a polypeptide which is subsequently cleaved to give a plurality of polypeptides. In some cases a nucleic acid construct may give rise to multiple transcripts and hence a plurality of polypeptides.

A "promoter" is a nucleotide sequence which initiates and regulates transcription of a polypeptide-encoding polynucleotide. Promoters can include inducible promoters (where expression of a polynucleotide sequence operably linked to the promoter is induced by an analyte, cofactor, regulatory protein, etc.), repressible promoters (where expression of a polynucleotide sequence operably

linked to the promoter is repressed by an analyte, cofactor, regulatory protein, etc.), and constitutive promoters. It is intended that the term "promoter" or "control element" includes full-length promoter regions and functional (*e.g.*, controls transcription or translation) segments of these regions.

"Operably linked" refers to an arrangement of elements wherein the components so described are configured so as to perform their usual function. Thus, a given promoter operably linked to a nucleic acid sequence is capable of effecting the expression of that sequence when the proper enzymes are present. The promoter need not be contiguous with the sequence, so long as it functions to direct the expression thereof. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between the promoter sequence and the nucleic acid sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

"Recombinant" is used herein to describe a nucleic acid molecule (polynucleotide) of genomic, cDNA, semisynthetic, or synthetic origin which, by virtue of its origin or manipulation is not associated with all or a portion of the polynucleotide with which it is associated in nature and/or is linked to a polynucleotide other than that to which it is linked in nature. Two nucleic acid sequences which are contained within a single recombinant nucleic acid molecule are "heterologous" relative to each other when they are not normally associated with each other in nature.

Homologues of polynucleotides are referred to herein. Typically a polynucleotide which is homologous to another polynucleotide is at least 70% homologous to the polynucleotide, preferably at least 75, 80 or 90% and more preferably at least 95%, 97% or 99% homologous thereto. Methods of measuring homology are well known in the art and it will be understood by those of skill in the art that in the present context, homology is calculated on the basis of nucleic acid identity. Such homology may, for instance, exist over a region of at least 15, preferably at least 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides. The region of homology may be over at least 150, preferably at least 200 and even more preferably over at least 300 nucleotides. The region of homology may relate to any of the elements referred to herein in relation to the nucleic acid

constructs of the invention. In some cases, the region of homology may be over the entire region in question, such as, for instance, over the entire region of any of the elements specified herein.

Equivalent levels of amino acid homology to those referred to in relation to nucleotide homology above may be present. Thus, any of the above mentioned levels of homology may apply at the amino acid level. Homology at the amino acid level may, for instance, be over at least 15, preferably at least 25, more preferably over at least 50, still more preferably at least 75 and even more preferably over at least 100 amino acids. The region of homology may be over the entire length of the element in question.

Methods of measuring polynucleotide homology or identity are known in the art. For example the UWGCG Package provides the BESTFIT program which can be used to calculate homology (e.g. used on its default settings) (Devereux *et al* (1984) *Nucleic Acids Research* **12**, p387-395).

The PILEUP and BLAST algorithms can also be used to calculate homology or line up sequences (typically on their default settings), for example as described in Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F *et al* (1990) J Mol Biol 215:403-10.

Software for performing BLAST analysis is publicly available through the National Centre for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). This algorithm involves first identifying high scoring sequence pair (HSPs) by identifying short words of length W in the query sequence that either match or satisfy some positive-valued threshold score T when aligned with a word of the same length in a database sequence. T is referred to as the neighbourhood word score threshold (Altschul *et al*, supra). These initial neighbourhood word hits act as seeds for initiating searches to find HSPs containing them. The word hits are extended in both directions along each sequence for as far as the cumulative alignment score can be increased. Extensions for the word hits in each direction are halted when: the cumulative alignment score goes to zero or below, due to the accumulation of one or more negative-scoring residue alignments; or the end of either sequence is reached. The BLAST algorithm parameters W, T and X determine the sensitivity and speed of the alignment. The BLAST program uses as defaults a word length (W) of 11, the

BLOSUM62 scoring matrix (see Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89:10915-10919) alignments (B) of 50, expectation (E) of 10, M=5, N=4, and a comparison of both strands.

The BLAST algorithm performs a statistical analysis of the similarity between two sequences; see e.g., Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl, Acad. Sci.* USA 90:5873-5787. One measure of similarity provided by the BLAST algorithm is the smallest sum probability (P(N)), which provides an indication of the probability by which a match between two nucleotide or amino acid sequences would occur by chance. For example, a sequence is considered similar to another sequence if the smallest sum probability in comparison of the first sequence to the second sequence is less than about 1, preferably less than about 0.1, more preferably less than about 0.01, and most preferably less than about 0.001.

The homologues typically hybridize with the relevant polynucleotide at a level significantly above background. The signal level generated by the interaction between the homologue and the polynucleotide is typically at least 10 fold, preferably at least 100 fold, as intense as "background hybridisation". The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with ^{32}P. Selective hybridisation is typically achieved using conditions of medium to high stringency, (for example, 0.03M sodium chloride and 0.003M sodium citrate at from about 50°C to about 60°C.

Stringent hybridization conditions can include 50% formamide, 5x Denhardt's Solution, 5x SSC, 0.1% SDS and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA and the washing conditions can include 2x SSC, 0.1% SDS at 37°C followed by 1x SSC, 0.1% SDS at 68°C. Defining appropriate hybridization conditions is within the skill of the art. See, e.g., Sambrook *et al.*, *supra.*

The homologue may differ from a sequence in the relevant polynucleotide by less than 3, 5, 10, 15, 20 or more mutations (each of which may be a substitution, duplication, deletion or insertion). These mutations may be measured over a region of at least 30, for instance at least 40, 60 or 100 or more contiguous nucleotides of the homologue. In some instances the mutations may be measured over the entire region of the homologue. Where a polynucleotide encodes a polypeptide, substitutions preferably create "conservative" changes in the amino acid encoded.

These are defined according to Table 1 below. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other in conservative changes.

Table 1

ALIPHATIC	Non-Polar	G A P
		I L V
	Polar-uncharged	C S T M
		N Q
	Polar-charged	D E
		K R
AROMATIC		H F W Y

The term "fragment" indicates a smaller part of a larger entity. Fragments of specific elements referred to herein may be employed in the invention. In particular, such fragments will retain some or all functionality of the original element and in particular any of the functions mentioned herein. In preferred instances a fragment of an antigen may retain immunogenicity and a fragment of an adjuvant the ability to act as an adjuvant. In some instances, a fragment may be at least 50%, preferably at least 60%, more prefereably at least 70%, still more preferably at least 80%, even more preferably at least 90% and still more preferably at least 95% of the length of the original. A fragment may be equal to or less than such percentages of the length of the original.

The terms "individual" and "subject" are used interchangeably herein to refer to any member of the subphylum cordata, including, without limitation, humans and other primates, including non-human primates such as chimpanzees and other apes and monkey species; farm animals such as cattle, sheep, pigs, goats and horses; domestic mammals such as dogs and cats; laboratory animals including rodents such as mice, rats and guinea pigs as well as pigs; birds, including domestic, wild and game birds such as chickens, turkeys and other gallinaceous birds, ducks, geese, and the like. The terms do not denote a particular age. Thus, both adult and newborn

individuals are intended to be covered. The methods described herein are intended for use in any of the above vertebrate species, since the immune systems of all of these vertebrates operate similarly.

In some instances, the invention may be used to immunize any suitable subject and in particular any suitable subject of a given species. In a preferred instance, any suitable human subject may be immunized. Thus, as many subjects as possible may, for instance, be immunized without emphasis on any particular group of subjects. For instance, a population of subjects as a whole, or as many as possible, may be immunized. In particular, where the invention is being used to treat influenza, and especially to immunize against a pandemic strain of influenza, the constructs of the invention may be used to immunize any subject and preferably as many subjects as possible.

In other cases, the subject or individual may be one at risk of infection or for whom infection would be particularly detrimental. The infection may, in a preferred instance, be a respiratory infection. In particular, where the invention is being used to prevent or treat a respiratory infection and in particular against influenza, the subject may be human. In some cases, the nucleic acid constructs of the invention may be administered in preference, or first, to particular at risk groups. This may, for instance, be the case for administration of constructs to immunize against non-pandemic strains of influenza. In some cases the subjects may, for instance, fall into one or more of the following categories:

- a subject with a respiratory disorder and/or heart problems and in particular who has asthma, emphysema, bronchitis and/or chronic obstructive pulmonary disease (COPD);
- a subject with a chronic medical condition such as diabetes, immune suppression, immune deficiency, sickle cell disease and/or a kidney disease;
- a subject aged at least 50 years, preferably at least 60 years, more preferably at least 65 years, even more preferably at least 75 years of age and still more preferably at least 80 years of age;
- a child aged 2 years or less, in particular from 6 to 23 months, for instance 18 months or less;

- a subject on a chronic aspirin therapy and in particular one aged from 6 months to 18 years;
- a pregnant woman and in particular one who will be in their second or third trimester of pregnancy during influenza season;
- a resident of a nursing home or long term care facility; and/or
- a care worker for any of the above or someone who is likely to come into regular contact with them.

B. General Overview

The invention is concerned with nucleic acid constructs which allow efficient expression of heterologous coding sequences, and in particular antigen-encoding genes, in host cells. The constructs may, in some instances, express one or more adjuvant polypeptides. More specifically, the invention provides nucleic acid constructs comprising, or in some embodiments, consisting essentially of a chimeric promoter sequence and a cloning site, such that when a coding sequence is inserted in the cloning site, the coding sequence is in operable linkage with the chimeric promoter. The invention also provides constructs with coding sequences inserted into the cloning site or sites. The coding sequences may encode any of the polypeptides referred to herein and in particular an antigen and expecially any of the antigens and adjuvant polypeptides mentioned herein.

In an especially preferred embodiment the constructs comprise a coding sequence and in particular a coding sequence encoding an antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either. In an especially preferred embodiment the coding sequences encode an influenza antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either. In a further preferred embodiment the coding sequence may encode an adjuvant polypeptide and in particular an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either with adjuvant activity.

The chimeric promoter comprises, or in some embodiments consists essentially of:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

The hCMV immediate early promoter sequence (a) may comprise:

(i) a native hCMV immediate early promoter sequence;

(ii) a functional homologous variant thereof; or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

In general sequence (a) comprises about 100 to 600, preferably 200 to 600, for instance 400 to 600 nucleotides. Typically sequence (a) comprises the sequences present in (i) which bind transcription factors or the RNA polymerase, or instead of any of these sequences, homologues of these sequences able to bind the same transcription factors and RNA polymerase. Typically such sequences or their homologues are present in promoter sequence (a) in the same order and/or substantially the same relative spacing as in (i).

Generally, (i) comprises at least from nucleotides -100 to -1, typically -150 to -1, for example -500 to -1 or -600 to -1 of the hCMV major immediate early gene. Sequence (i) typically comprises the hCMV core promoter sequence and may also include one or more enhancer elements present in hCMV immediate early promoter. For example, (i) may comprise from nucleotides -118 to -1, or -524 to -1 as in US 6218140, or from nucleotides -62 to 1 or -465 to -1 as in US 538 5839.

Generally (i) includes a TATA box or CAAT box commonly found in promoter sequences. Preferably the sequence includes one or more of the repeat sequences in the hCMV immediate early promoter.

In a preferred embodiment, (i) comprises SEQ ID NO: 1. In a further preferred embodiment, (i) comprises nucleotides 903 to 1587 of SEQ ID NO: 54. In another embodiment (i) may comprise nucleotides 903 to 1587 of SEQ ID NO: 14. In a further preferered embodiment (i) may comprise nucleotides 1002 to 1686 or 2624 to 3308 of SEQ ID No. 57. In a further preferred embodiment (i) may comprise nucleotides 1815 to 1935 and/or 1948 to 2632 of SEQ ID No. 61 and in particular nucleotides 1948 to 2632 of SEQ ID No. 61. In another preferred embodiment nucleotides 1815 to 1935 may be used.

In a particularly preferred embodiment of the invention the hCMV immediate early promoter sequence (a) comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No.1, nucleotides 903 to 1587 of SEQ ID No.54, nucleotides 1815 to 1935 of SEQ ID No: 61, nucleotides 1948 to 2632 of SEQ ID No: 61, nucleotides 1002 to 1686 of SEQ ID No: 62 and/or nucleotides 2624 to 3308 of SEQ ID No: 62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

In some instances, a fragment may comprise at least 300 nucleotides, preferably at least 400 nucleotides, more preferably at least 500 nucleotides and even more preferably at least 600 nucleotides of such sequences. The fragment may comprise up to 800, up to 600 or up to 400 nucleotides

A hCMV immediate early promoter sequence can be obtained using known methods. A native hCMV immediate early promoter can be isolated directly from a sample of the virus, using standard techniques. US 5385839, for example, describes the cloning of a hCMV promoter region. The sequence of a hCMV immediate early promoter is available at Genbank #M60321 (hCMV Towne strain) and X17403 (hCMV Ad169 strain). A native sequence could therefore be isolated by PCR using PCR primers based on the known sequence. See e.g Sambrook *et al*, supra, for a description of techniques used to obtain and isolate DNA. A suitable hCMV promoter sequence could also be isolated from an existing plasmid vector. Promoter sequences can also be produced synthetically.

A functional variant (ii) or fragment (iii) is generally one which retains and/or complements the activity of the native promoter (i). Typically this activity is the ability to cause (including initiating and regulating) transcription of an operably linked polynucleotide, in particular the hCMV major immediate early gene. In one embodiment, the variant or fragment would be able to complement the activity of the native promoter in a hCMV virus, for example allowing the virus to retain the ability to infect and/or replicate in cells.

A homologous variant (ii) or fragment (iii) can be assayed for the ability to retain and/or complement the activity of (i). For example, a variant or fragment may be assayed for ability to restore functionality (such as infection and/or replication ability) to mutant hCMV in which the native hCMV immediate early promoter is defective.

A homologous variant (ii) or fragment (iii) may be tested for utility using the Comparative Expression Assay below. The test promoter sequence is swapped into the base vector in place of the native hCMV immediate early promoter. Typically, a functional variant or fragment allows at least 50%, for instance, 60, 70, 80, 90% or more of the expression provided using the base vector. A functional variant or fragment may provide any of the levels of expression referred to herein. In some instances, the variant or fragment may provide a higher level of expression such as at least 50%, 100%, 150%, 200%, 300% or more increase in activity. Generally expression is provided in at least one, but preferably two, reference cell types. Typically, the reference cells are mammalian HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. The reference cells may be SSC-15 or B16 host cells in some instances.

Additionally or alternatively, promoter sequence may be tested in the Comparative Immunogenicity Assay below. Test promoter sequence is swapped into the base vector in place of the native hCMV immediate early promoter. A functional promoter sequence typically provides antibody titres that are at least as high as or higher than those achieved by the base vector with at least one, preferably two antigens. Preferably antibody titres are at least 5%, 10%, 20%, 30% or 40% higher than with the base vector. In some cases, the level of antigen titres may be any of those referred to herein. Suitable antigens are HBsAg, HSV 2gD and flu-M2 antigens. Particularly preferred antigens are influenza antigens. Influenza antigens include the HA, NA, M2, NP, M1, PB1, PB2, PA, NS1 and NS2 antigens and in particular the HA, NA and M2 antigens. In an especially preferred embodiment the antigen is HA or a fragment thereof or a variant of either. According to the assay, a functional homologous variant (ii) or functional fragment (iii) of native promoter sequence (i) is typically one which allows the highest antibody titres achieved by the native sequence. In some instances, the antibody titre may be slightly lower including any of the levels mentioned herein.

In instances where a construct of the invention encodes an adjuvant polypeptide, the comparative immunogenicity test may be employed with a standard antigen and comparing a test vector encoding a polypeptide of unknown adjuvant activity with a standard adjuvant vector. For instance, a test adjuvant vector may encode a fragment or variant of a known adjuvant polypeptide and be compared against a standard vector expressing the known adjuvant polypeptide in their ability to promote an immune response when administered with an antigen. A fragment or variant may have any of the levels of activity mentioned herein and in particular will provide at least 50%, preferably at least 75%, more preferably at least 85% and even more preferably at least 100% of the adjuvant activity of the standard adjuvant. Preferably the test vector and standard vector will be identical, or at least substantially identical, apart from the sequences encoding the adjuvant /polypeptide under test.

As mentioned above, the construct may comprise exon sequence (b) which comprises sequence derived from exon 1 and exon 2 of the hCMV major immediate early gene. Exons are coding sequences, which in nature are generally separated by introns. In the native hCMV major immediate early gene, exons 1 and 2 are usually separated by the native intron A. In the present chimeric construct exon 2 sequence is generally positioned 3' of exon 1 sequence, without intervening intron sequence, so that the exon 1 and exon 2 sequences are contiguous.

Exon sequence (b) may comprise:

(i) native exon sequence, typically exon 1 and (whole or partial) exon 2;

(ii) a homologous variant of (i) which is functional; or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Sequence (i) may comprise from about 50 to 100% of the native hCMV major immediate early gene exon 1 sequence, for example, 60 to 90% or 70 to 80%. Typically at least 50% of the natural exon 1 sequence is present, such as 60%, 70%, 80%, 90% or more. Exon sequence (b) also comprises at least a part of exon 2 sequence. In sequence (i), typically 2 or more bases of native exon 2, for example 2 to 9, 2 to 7 or 3 to 5 bases are present. Up to and including 100% of natural exon 2 sequence, for example 5 to 95%, 20 to 80% or 40 to 60% of natural exon 2 sequence

may be present. Typically the homologous variant has any of the above lengths mentioned for the native sequence.

Preferably (i) comprises SEQ ID No. 2. In a further preferred embodiment (i) comprises nucleotides 1588 to 1718 of SEQ ID NO: 54. In a further preferred embodiment (i) comprises nucleotides 1588 to 1718 of SEQ ID No. 14. In another preferred instance (i) comprises nucleotides 1684 to 1814 and/or 2633 to 2763 of SEQ ID No. 51. In a further preferred embodiment, (i) may comprise nucleotides 1687 to 1817 and/or 3309 to 3439 of SEQ ID No: SEQ ID No. 62.

Thus, in a particularly preferred embodiment exon sequence (b) of the chimeric promoter comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No.2, the nucleotide sequence of nucleotides 1588 to 1718 of SEQ ID No.54, nucleotides 1684 to 1814 of SEQ ID No: 61, nucleotides 2633 to 2763 of SEQ ID No: 61, nucleotides 1687 to 1817 of SEQ ID No: 62 and/or nucleotides 3309 to 3439 of SEQ ID No: 62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Suitable exon sequence (b) can be obtained using known methods. See e.g Sambrook *et al.*, supra, for a description of techniques used to obtain and isolate DNA. Native hCMV major immediate early gene sequence can be isolated directly from a sample of the virus, using standard techniques (see for example, MacLean, A (1998) "Preparation of HSV-DNA and Production of Infectious Virus" in Herpes Simplex Virus Protocols S. Brown, A Maclean, editors, Humana Press, Totowa, NJ, pp.19-26). The sequence of a hCMV major immediate early gene, including the location of exon 1 and exon 2, is available at Genbank #M60321, X17403. Native exon 1 and 2 sequences could therefore be isolated by cutting the native major gene sequence at appropriate restriction sites or by PCR using PCR primers based on the known sequence. Suitable exon sequences could alternatively be isolated from an existing plasmid vector, such as pWRG7128. Exon sequences can also be produced synthetically, rather than cloned. Variant sequences can readily be constructed by routine methodologies such as site-directed mutagenesis.

Generally the exon sequence will, when present in the construct of the invention, enhance expression, typically causing comparable enhancement to the native exon 1 and exon 2 sequence (i) mentioned above.

Exon sequence may be assayed for functionality using the Comparative Expression Assay below. Test exon sequence is swapped into the base vector in place of the exon sequence already present. Generally exon sequence is functional if the sequence does not abrogate expression, but preferably increases expression in at least one, preferably two reference cell types when compared to the base vector. Typically the reference cells are mammalian HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. SSC15 or B16 cells may be used. Preferably expression increases by at least 5%, 10%, 20%, 30% or 40%. Expression may increase by any of the levels mentioned herein. According to this assay, a functional homologous variant (ii) or functional fragment (iii) of natural exon sequence (i) is one which typically allows at least 50% of the expression improvement provided by the natural sequence. In some instances, where the level of expression is lower than that given by the base level, the descrease may be any of the levels mentioned herein.

Additionally or alternatively, exon sequence may be tested in the Comparative Immunogenicity Assay below. Test exon sequence is swapped into the base vector in place of the exon sequence already present. Functional exon sequence provides antibody titres that are typically at least as high as or higher than those achieved by the base vector with at least one, preferably two antigens. Preferably antibody titres are at least 5%, 10%, 20%, 30% or 40% higher than with the base vector. The increase may be any of the levels mentioned herein. Preferred antigens are HBsAg, HSV 2gD and flu-M2 antigens. Especially preferred antigens are influenza antigens, including any of those mentioned herein and in particular HA, NA and M2 antigens. The use of HA antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either is especially preferred. According to this assay, a functional homologous variant (ii) or functional fragment (iii) of natural exon sequence (i) is one which typically allows the highest antibody titres achieved by the natural sequence. In instances where the level of antibody titre is slightly lower, the decrease may be any of the levels mentioned herein. Adjuvant vectors may be assessed in an equivalent manner as discussed above.

The chimeric promoter construct comprises heterologous intron (c) in place of the native intron A region of the hCMV major immediate early gene. An intron is a non-coding sequence which is spliced from the hnRNA transcribed from a gene. A heterologous intron is one which is not present in the coding sequence in nature.

The heterologous intron (c) replaces wholly or partially, native intron A of the hCMV major immediate early gene. Typically the native intron A is absent.

In general the heterologous intron (c) is 3' of exon sequence (b).

Typically the heterologous intron (c) comprises:

(i) a natural intron;

(ii) a functional homologous variant of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Heterologous intron (c) is in general a viral or eukaryotic intron. Preferably the intron is a mammalian intron, in particular a non-human intron, for example a rat intron may be employed. In some instances, a chicken intron may be employed. Preferably the intron is an intron A, for example, rat insulin intron A, chicken keratin intron A or chicken cardiac actin intron A. In an especially preferred embodiment the intron is rat insulin intron A.

In a preferred embodiment the heterologous intron (c) comprises a sequence selected from the rat insulin gene intron A sequence, chicken keratin gene intron A sequence, chicken cardiac actin gene intron A sequence, a functional fragment of any thereof or a functional variant of any of the preceding

Typically intron (c) has a length of from about 50 nucleotides to about 1000 nucleotides, for instance from about 100 to about 500 nucleotides. The intron (c) may for example, comprise 50 to 500 nucleotides, such as up to 100, 200, 300 or 400 nucleotides. Preferably the intron comprises sequence found at about nucleotides 50 to 133 of native rat insulin intron A, or a homolog of this sequence.

Preferably heterologous intron (c) is capable of being spliced from an RNA transcript in a eukaryotic host cell. In general the intron comprises one or more of a donor sequence (such as GT), an acceptor sequence (such as AG), a 3' pyrimidine rich region and a branch point sequence. The pyrimidine rich region, if present, may include, for example at least 5, 8, 10 or more pyrimidines. Preferably the intron comprises at least a donor sequence, acceptor sequence and a branch point sequence.

Typically in the chimeric construct, intron (c) comprises non-intron flanking sequences which are derived from exon sequences found on the intron/exon boundaries of the natural intron (i). The flanking exon sequence may be native exon sequence or a homologue of this sequence which retains substantially the same activity as the native sequence, for example retains splicing function. Typically from 5 to 10, preferably from 7 to 10 bases of exon sequence are included at each end of the intron.

Intron (c) may be an artificial intron, provided that the intron is functional. For example, a recombinant or chimeric intron may be used. Such an intron may comprise sequence from more than one natural intron.

Typically intron (c) comprises sequences present in hCMV intron A which bind transcription factors or regulatory proteins or instead of any of these sequences, homologues of these sequences able to bind the same factors or proteins. Typically such sequences or their homologues are present in the intron (c) in the same order and/or substantially the same relative spacing as in hCMV intron A.

Intron (c) may comprise an homologous variant (ii) in which the sequence of the natural intron (i) has been modified to remove an internal restriction site. For example, an homologous variant of rat insulin intron A may be used in which an internal *Nhe*I site has been destroyed.

Preferably, intron (c) comprises:

(i) SEQ ID No. 3;

(ii) a functional homologous variant of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

In a further preferred instance, (i) may comprise nucleotides 1725 to 1857 of SEQ ID NO: 54 or the same nucleotides of SEQ ID No. 14. In a further preferred embodiment (i) may comprise nucleotides 1545 to 1677 and/or 2770 to 2902 of SEQ ID No: 61. In another preferred instance, (i) may comprise nucleotides 1824 to 1956 and/or3446 to 3578 of SEQ ID No:62.

In one preferred instance, the rat insulin gene intron A sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No. 3, the nucleotide sequence of nucleotides 1725 to 1857 of SEQ ID No. 54, nucleotides 1545 to 1677 of SEQ ID No: 61, nucleotides 2770 to 2902 of SEQ ID No: 61,

nucleotides 1824 to 1956 of SEQ ID No:62 and/or nucleotides 3446 to 3578 of SEQ ID No:62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Intron sequence (c) may be obtained using standard cloning techniques. For example, rat insulin intron A sequence is available at GenBank J00748, chicken keratin intron A sequence at GenBank J00847 and chicken cardiac intron A sequence at GenBank X02212. Intron sequence can be isolated from natural sources using primers based on known sequence. Sequence may be prepared synthetically. Variant sequences may be obtained by mutagenesis.

Typically a functional intron sequence, for example a functional variant (ii) or a functional fragment (iii) is one which has substantially the same activity as, and/or complements the activity of a natural intron (i). In one embodiment the activity is splicing activity.

Intron (c) sequences may be tested for splicing activity using a routine splicing assay. In general a functional homologue (ii) or functional fragment (iii) will show at least 50%, for example 60%, 70%, 80%, 90% and up to 100% or more of the splicing efficiency of the natural intron (i) in the assay.

In general the heterologous intron sequence will, when present in the construct of the invention, enhance expression. Typically, a variant (ii) or fragment (iii) intron will cause comparable enhancement to a natural intron (i). In some cases, a decrease in expression might be seen including any of the levels mentioned herein.

Functionality of potential intron sequence (c) can be tested using the Comparative Expression Assay below. The heterologous intron is swapped into the base vector. Generally heterologous intron sequence is functional if the addition of the sequence increases expression in at least one, but preferably two reference cell types by 25% or more, compared to the base vector. Typically the reference cells are mammalian HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. SSC15 or B16 cells may be used. The increase in expression may be at least 35%, 45%, 55% or more. The increase may be any of the levels mentioned herein. According to this assay, a functional variant (i) or functional fragment (ii) of a natural intron sequence (i) is

typically one which allows greater than 50% of the expression improvement achieved by the natural sequence. In cases where a decrease in expression is seen the decrease may, for instance, be any of the levels mentioned herein.

A heterologous intron (c) sequence may, additionally or alternatively be tested for functionality using the Comparative Immunogenicity Assay below. Intron (c) sequence is added to the base vector. A functional intron (c) sequence provides antibody titres that are higher than those achieved by the base vector with at least one, preferably two antigens. Preferably, the antibody titres are at least 5 or 10%, for instance 20%, 30% or 40% higher than with the base vector. Preferred antigens are HBsAg, HSV2gD and Flu-M2 antigens. Especially preferred antigens are influenza antigens, including any of those mentioned herein and in particular HA, NA and M2 antigens. In particular, HA antigen, an immunogenic fragment thereof or a immunogenic variant of either may be employed. According to this assay, a functional variant (ii) or functional fragment (iii) of a natural intron sequence (i) is typically one which allows the highest antibody titres achieved by the natural sequence. In some cases a decrease might be seen, the levels may, for instance, be any of those mentioned herein. Adjuvant vectors may be assessed in an equivalent manner as discussed elsewhere herein.

Suitable heterologous intron sequence can be obtained using standard cloning techniques. For example, rat insulin intron A sequence is available at GenBank J00748, chicken keratin intron A at GenBank J00847, and chicken cardiac actin intron A at X02212. Intron sequence can be isolated from native sources using primers based on the known sequence data. Suitable sequence may also be prepared synthetically.

The component sequences (a), (b) and (c) may be provided suitably linked together to form a chimeric promoter using standard cloning or molecular biology techniques. Preferably intron sequence (c) is provided 3' of exon sequence (b). The chimeric promoter construct is linked to a cloning site, in such a way that the promoter will effect the expression of a coding sequence inserted in the site, when the proper enzymes are present. Suitable cloning sites, including multi-cloning sites are known in the art, e.g the pUC19, pBC SK, pBluescript II KS, cDNA3.1, pSP72,

pGEM 7Z multicloning site. Any suitable restriction site may, for instance, be used as a cloning site to insert the coding sequences.

In one preferred embodiment, the chimeric promoter employed comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No. 4 or the nucleotide sequence of nucleotides 903 to 1857 of SEQ ID No. 54;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

In a further preferred instance, the chimeric promoter employed may be one that comprises the sequence of SEQ ID No: 14.

Typically, a nucleic acid for insertion (or inserted) in the cloning site encodes a therapeutically relevant polypeptide. It is preferred that the coding sequence is suitable for use in nucleic acid immunisation or gene therapy. The nucleic acid insert may thus comprise a sequence capable of providing immunity, for example an immunogenic sequence that elicits a humoral and/or cellular immune response when delivered to a subject. Alternatively, the nucleic acid may comprise one or more genes encoding a therapeutic polypeptide e.g a protein defective or missing from a target cell genome or a non-native protein having a desired biological or therapeutic effect (e.g., an antiviral function). The construct may encode an adjuvant polypeptide. For the treatment of genetic disorders, functional genes corresponding to genes known to be deficient in the particular disorder can be administered to a subject. Preferably the nucleic acid is DNA. The nucleic acid may in some instances be RNA or PNA.

In some instances a non-coding RNA may be expressed by a construct of the invention. Thus the vector may have inserted into the cloning site a region which can give rise to such an RNA, for instance an anti-sense RNA or SiRNA. The anti-sense RNA or SiRNA may, for instance, inhibit the expression of any of the genes mentioned herein or a gene of any of the pathogens mentioned herein. However, in the most preferred embodiment, a polypeptide is encoded.

Suitable nucleic acids for insertion include those used for the treatment of inflammatory diseases, autoimmune, chronic and infectious diseases, including such disorders as AIDS, cancer, neurological diseases, cardivascular disease,

hypercholestemia; various blood disorders including various anemias, thalassemia and hemophilia; genetic defects such as cystic fibrosis, Gaucher's Disease, adenosine deaminase (ADA) deficiency, emphysema, etc.

The constructs in the invention may be used to treat or prevent a condition. The constructs may be used to ameliorate a condition and/or eliminate or reduce a particular, or all, symptoms of a disorder. In a particularly preferred instance the constructs may be used to vaccinate a subject against a pathogen.

For example, in methods for the treatment of solid tumors, genes encoding toxic peptides (i.e., chemotherapeutic agents such as ricin, diptheria toxin and cobra venom factor), tumor suppressor genes such as p53, genes coding for mRNA sequences which are antisense to transforming oncogenes, antineoplastic peptides such as tumor necrosis factor (TNF) and other cytokines, or transdominant negative mutants of transforming oncogenes, can be inserted for expression at or near the tumor site.

In one preferred embodiment a construct of the invention may encode a polypeptide for treating or preventing a cancer. In a particularly preferred embodiment a construct of the invention may encode a tumour antigen. Examples of tumour associated antigens include, but are not limited to, cancer-testes antigens such as members of the MAGE family (MAGE 1, 2, 3 etc), NY-ESO-1 and SSX-2, differentation antigens such as tyrosinase, gp100, PSA, Her-2 and CEA, mutated self antigens and viral tumour antigns such as E6 and/or E7 from oncogenic HPV types. Further examples of particular tumour antigens include MART-1, Melan-A, p97, beta-HCG, GalNAc, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-4, MAGE-12, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC18, CEA, DDC, P1A, EpCam, melanoma antigen gp75, Hker 8, high molecular weight melanoma antigen, K19, Tyrl, Tyr2, members of the pMel 17 gene family, c-Met, PSM (prostate mucin antigen), PSMA (prostate specific membrane antigen), prostate secretary protein, alpha-fetoprotein, CA125, CA19.9, TAG-72, BRCA-1 and BRCA-2 antigen.

Examples of particular cancers that the antigen may be derived include those from cancers of the lung, prostate, breast, colon, ovary, testes, bowel, melanoma, a lymphoma and a leukaemia. The constructs of the invention may also be used to treat or prevent such cancers.

Similarly, nucleic acids coding for polypeptides known to display antiviral and/or antibacterial activity, or stimulate the host's immune system, can also be included. The nucleic acid may encode one of the various cytokines (or functional fragments thereof), such as the interleukins, interferons and colony stimulating factors.

In a preferred instance, the coding sequences may encode an antigen, immunogenic fragment thereof or immunogenic variant of either. The antigen may in particular be a viral, bacterial, parasitic or fungal pathogen antigen or a tumour antigen. In a preferred instance, the antigen is a viral antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either.

The nucleic acid may encode an antigen for the treatment or prevention of a number of conditions including but not limited to cancer, allergies, toxicity and infection by a pathogen such as, but not limited to, fungus, viruses including Human Papilloma Viruses (HPV), HIV, HSV2/HSV1, influenza virus (types A, B and C), Polio virus, RSV virus, Rhinoviruses, Rotaviruses, Hepatitis A virus, Norwalk Virus Group, Enteroviruses, Astroviruses, Measles virus, Para Influenza virus, Mumps virus, Varicella-Zoster virus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, Adenoviruses, Rubella virus, Human T-cell Lymphoma type I virus (HTLV-I), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Hepatitis D virus, Pox virus, Marburg and Ebola; bacteria including *M.tuberculosis, Chlamydia, N.gonorrhoeae, Shigella, Salmonella, Vibrio Cholera, Treponema pallidua, Pseudomonas, Bordetella pertussis, Brucella, Franciscella tulorensis, Helicobacter pylori, Leptospria interrogaus, Legionella pnumophila, Yersinia pestis, Streptococcus* (types A and B), *Pneumococcus, Meningococcus, Hemophilus influenza* (type b), *Toxoplama gondii, Complybacteriosis, Moraxella catarrhalis, Donovanosis,* and *Actinomycosis;* fungal pathogens including Candidiasis and Aspergillosis; parasitic pathogens including Taenia, Flukes, Roundworms, Amebiasis, Giardiasis, Cryptosporidium, Schitosoma, Pneumocystis carinii, Trichomoniasis and Trichinosis. The nucleic acid my also be used to provide a suitable immune response against numerous veterinary diseases, such as Foot and Mouth diseases, Coronavirus, *Pasteurella multocida, Helicobacter, Strongylus vulgaris, Actinobacillus pleuropneumonia,* Bovine viral diarrhea virus (BVDV), *Klebsiella pneumoniae, E. coli, Bordetella pertussis, Bordetella*

parapertussis and Bordetella brochiseptica. Thus in one aspect, the nucleic acid constructs of the present invention may find use in a vaccine. Vaccines of the invention may be used tovaccinate against any of the pathogens and conditions mentioned herein. Thus, the invention provides a vaccine composition comprising a nucleic acid construct of the invention or a population of nucleic acid constructs of the invention or coated particles of the invention.

In one preferred instance a nucleic acid construct of the invention may encode an antigen from a member of the *adenoviridae* (including for instance a human adenovirus), *herpesviridae* (including for instance HSV-1, HSV-2, EBV, CMV and VZV), *papovaviridae* (including for instance HPV), *poxviridae* (including for instance smallpox and vaccinia), *parvoviridae* (including for instance parvovirus B19), *reoviridae* (including for instance a rotavirus), *coronaviridae* (including for instance SARS), *flaviviridae* (including for instance yellow fever, West Nile virus, dengue, hepatitis C and tick-borne encephalitis), *picornaviridae* (including polio, rhinovirus, and hepatitis A), *togaviridae* (including for instance rubella virus), *filoviridae* (including for instance Marburg and Ebola), *paramyxoviridae* (including for instance a parainfluenza virus, respiratory syncitial virus, mumps and measles), *rhabdoviridae* (including for instance rabies virus), *bunyaviridae* (including for instance Hantaan virus), *orthomyxoviridae* (including for instance influenza A, B and C viruses), *retroviridae* (including for instance HIV and HTLV) and *hepadnaviridae* (including for instance hepatitis B). In a further preferred instance the antigen may be from a pathogen responsible for a veterinary disease and in particular may be from a viral pathogen, including, for instance, a Reovirus (such as African Horse sickness or Bluetongue virus) and Herpes viruses (including equine herpes). The antigen may be one from Foot and Mouth Disease virus. In a further preferred instance the antigen may be from a Tick borne encephalitis virus, dengue virus, SARS, West Nile virus and Hantaan virus.

In another preferred case the antigen may be from a *retroviradae* (e.g. HTLV-I; HTLV-11; or HIV-1 (also known as HTLV-111, LAV, ARV, hTLR, etc.)). In particular from HIV and in particular the isolates HIVIllb, HIVSF2, HTVLAV, HIVLAI, HIVMN; HIV-1CM235, HIV-1; or HIV-2. In a particularly preferred embodiment, the antigen may be a human immunodeficiency virus (HIV) antigen.

Examples of preferred HIV antigens include, for example, gp120, gp 160 gp41, gag antigens such as p24gag and p55gag, as well as proteins derived from the pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu or LTR regions of HIV. In a particularly preferred case the antigen may be HIV gp120 or a portion of HIV gp120. The antigen may be from an immunodeficiency virus, and may, for example, be from SIV or a feline immunodeficiency virus.

Thus, the encoded polypeptide may be an antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant thereof. The fragment or variant may, for instance, have any of the levels of homology, proportion of the length of the original antigen, and functionality specified herein and in particular ability to give rise to an immune response. In some instances, the encoding sequence of the nucleic acid construct may have been modified to optimize expression. For instance, codon useage may be modified to that typical of the subject. A consensus Kozak sequence for the subject may also be substituted for the naturally occurring sequence around the start codon.

In an especially preferred embodiment the nucleic acid construct of the invention comprises a coding sequence encoding an influenza antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either. The fragment and/or variant may have any of the levels of sequence homology, fragment lengths and/or levels of functionality specified herein. In particular, preferably a coding sequence of the construct encodes an influenza virus antigen, an immunogenic fragment of an influenza virus antigen or an immunogenic variant with 80% amino acid homology to any of the preceding.

For instance the influenza antigen may be an influenza NP (nucleoprotein/nucleocapsid protein), HA (hemagglutinin), NA (neuraminidase), M1, M2, PB1, PB2, PA, NS1 and/or NS2 antigens or may be a fragment or variant of such antigens. In a preferred embodiment the encoded antigen may be HA, NA and/or M2 influenza antigen or a fragment or a variant of such antigens. In an especially preferred instance, the encoded antigen may be an HA or an NA antigen or a fragment or variant of such antigens and in particular an HA antigen or a fragment or variant of such an antigen.

Thus, in an especially preferred construct of the invention the encoded antigen is influenza hemaglutinin (HA), an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant with 80% amino acid sequence homology to either. In a further preferred instance the encoded antigen is influenza Neuraminidase (NA), M2, an immunogenic fragment of either or an immunogenic variant with 80% amino acid sequence homology to any of the preceding.

In apreferred instance, a construct of the invention may encode more than one polypoeptide and in particular more than one influenza antigen, immunogenic fragment or immunogenic variant of either. In instances where more than one antigen is to be employed in a preferred instance HA and NA antigens may be employed together or a fragment or a variant of such antigens.

In instances where a construct of the invention expresses more than one influenza antigen, immunogenic fragment, or immunogenic variant of either, at least two of the different antigens, fragments or variants encoded are from the same influenza polypeptide from different strains of influenza virus.

In one preferred embodiment the antigen may be from the H5N1 strain of influenza and immunogenic fragments thereof and variants of either which retain immunogenicity may be employed. In particular, the antigen may be one from the H5N1 strain or a fragment of such an antigen.

In some instances, the antigen may be a fragment or variant of a naturally occurring influenza polypeptide. For instance, the antigen may correspond to a sub-region of a naturally occurring influenza polypeptide including any of the various fragment lengths referred to herein. The antigen may be a variant of a naturally occurring influenza antigen or of a fragment of such an antigen. Preferably such variants and/or fragments will be able to give rise to an immune response capable of recognising the antigen and in particular the influenza virus the fragment or variant is derived from.

The influenza antigen may be from any influenza virus. The antigen may be from influenza virus A, B or C, in particular from influenza A and/or B. The antigen may be from a variant influenza strain and in particular a variant strain associated with increased infectivity or pathogenicity of the influenza strain. The antigen may, for instance, be from one of the strains identified annually by the World Health

Organisation to be used in influenza vaccines and in particular may be an antigen identified by the WHO for such use. In a preferred instance, a nucleic acid construct, population of nucleic acids, pharmaceutical composition or vaccine of the invention may encode an antigen of each of three influenza strains and in particular the three strains identified by WHO or other equivalent authorities in a particular year.

In a preferred instance, one or more of the encoded influenza antigens may originate from a pandemic influenza strain. Thus, the influenza antigen, immunogenic fragment or variant of either may be from a pandemic influenza strain. A construct encoding the antigen from the pandemic strain may, for instance, be administered, or be present, on its own. In others, the construct may also encode, or be administered with other constructs that encode, other antigens. In a preferred case, an antigen from a pandemic influenza strain and an antigen from a non-pandemic influenza strain may be encoded either on the same or separate constructs. In particular, a pandemic flu antigen and an antigen from 1, 2, 3, 4, 5, 6 or more non-pandemic influenza strains may be administered, preferably an antigen from each of 3, 4 or 5 non-pandemic influenza strains may be administered and even more preferably an antigen from each of 3 or 4 non-pandemic influenza strains may be administered.

In some instances, the construct may encode more than one polypeptide. In particular, a construct may encode more than one antigen and especially more than one influenza antigen. For instance, the construct may express two, three, four, five, six or more polypeptides and in particular antigens. In a preferred case, the construct may encode three, four, five or more different polypeptides and in particular antigens. In an even more preferred case the construct may encode three, four or five different polypeptides and in particular antigens. In a still more preferred case the construct may encode three or four different polypeptides, in particular antigens and especially influenza antigens. At least one of the antigens will be expressed using the chimeric promoter of the invention and preferably all of the antigens will be so expressed. Typically, each antigen may be expressed from a separate chimeric promoter of the invention. In some cases, a single promoter may be used to generate a transcript which gives rise to a plurality of polypeptides. In some instances, several antigens may be expressed as a fusion protein.

In a preferred instance, a construct of the invention encodes a pandemic influenza antigen, immunogenic fragment thereof, or immunogenic variant of either and one or more non-pandemic influenza antigens, immunogenic fragments thereof or immunogenic variants of either.

The nucleic acid constructs of the invention may be employed in a vaccine. Thus, the invention provides a vaccine composition comprising a nucleic acid construct, a population of nucleic acid constructs or coated carrier particles of the invention. The vaccine may comprise a suitable pharmaceutical carrier or excipient. The vaccine may comprise an adjuvant and in particular an adjuvant construct of the invention. Alternatively, the vaccine may be administered separately, sequentially or simultaneously with such an adjuvant.

In one preferred instance, the invention provides a multivalent vaccine comprising at least two different constructs of the invention that encode different antigens, immunogenic fragments thereof, or immunogenic variants of either. The antigen may be any of those mentioned herein. In a preferred instance, the invention provides a multivalent vaccine comprising at least two different constructs of the invention which encode different influenza antigens, immunogenic fragments thereof or immunogenic variants of either. In alternative instances, a plurality of antigens may be expressed from the same construct to provide a multivalent vaccine or combinations of constructs encoding single and plural antigens may be used.

In a further preferred instance, a multivalent vaccine of the invention may be one which is a trivalent, tetravalent or pentavalent vaccine encoding three, four or five different antigens, immunogenic fragments or immunogenic variants and in particular influenza antigens, fragments or variants of either.

In another preferred instance a vaccine of the invention, including the multivalent vaccines, may comprises a construct which encodes a pandemic influenza antigen, immunogenic fragment thereof or immunogenic variant of either. A multivalent vaccine may encode a pandemic influenza antigen, immunogenic fragment, or immunogenic variant of either and also, for instance, an antigen from each of three, four or five different influenza strains, immunogenic fragments thereof or immunogenic variants of either.

An adjuvant may be present in a vaccine of the invention or administered simulateously, separately or sequentially with a vaccine of the invention. In particular, the invention provides a vaccine which comprises at least one construct of the invention encoding an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof with adjuvant activity or variant thereof with adjuvant activity.

Nucleic acid constructs expressing more than one antigen may be used to generate multivalent vaccines, i.e. a vaccine intended to immunize against a plurality of different antigens and in particular against influenza antigens. In some instances, an influenza antigen or antigens and an antigen or antigens from a different pathogen will be provided. Thus, any of the constructs, populations of nucleic acid constructs, vaccines, pharmaceutical compositons and coated carrier particles mentioned herein may comprise a construct encoding an influenza antigen and either the same construct, or different constructs, may encode antigens from different pathogens. The various multivalent influenza constructs, populations and vaccines mentioned herein may also encode an antigen or antigens from a different pathogen.

In some cases, the antigens encoded will be from the same pathogen. In some instances, the different antigens will all be from the same virus. Thus, in a preferred instance, all of the antigens will be influenza antigens. The plurality of antigens may come from the same strain influenza virus and hence may be from several different polypeptides of the influenza virus. Alternatively, the plurality of antigens may be from different strains of virus and in particular influenza virus. In the case of multivalent constructs and/or vaccines antigens from at least two and preferably at least three, four or five different influenza strains may be chosen. The antigens may, for instance, be from 2, 3, 4, 5, 6 or more different strains, in particular antigens from three, four or five strains may be employed, and even more preferably from three or four different strains.

Multivalent vaccines may alternatively or additionally comprise a plurality of different constructs of the invention with the different constructs encoding different antigens. For instance, at least 2, 3, 4, 5, or 6 different constructs may be employed. In a particularly preferred instance 2, 3, 4 or 5 different constructs and especially three or four constructs may be employed. In one instance, where more than one construct is present, each construct encodes a singular antigen. In a further instance,

constructs may encode 2, 3, 4, 5 or more different antigens, particularly 3 or 4 different antigens.

The invention also provides a population of nucleic acid constructs where the population comprises a plurality of constructs of the invention and in particular any of the combinations mentioned above. Thus, the invention provides a population of nucleic acid constructs where the population comprises at least two different constructs of the invention. The nucleic acid constructs may be present in any suitable amounts relative to each other. Typically, each nucleic acid construct is present in a weight ratio of approximately 1:10 to each other.

The populations of nucleic acid constructs may be used to generate multivalent vaccines and in the various methods of the invention. Multivalent vaccines may also be multivalent because they comprise any of the constructs of the invention that encode more than one antigen.

In one preferred instance a population of nucleic acids is provided where the population comprises at least two different constructs that encode different antigens. In particular, the invention provides a population comprising at least two different constructs which encode influenza antigens, immunogenic fragments thereof or immunogenic variants of either. In such a population of nucleic acid constructs preferably at least two of the different antigens may be from the same influenza polypeptide, such as HA, from different influenza strains. In populations with at least two different constructs which encode influenza antigens are present, preferably at least two of the different antigens, fragments or variants are from different influenza polypeptides may be from the same or a different influenza strain. Further preferred populations include a population of nucleic acid constructs where the population comprises at least three different constructs which each encode an antigen of a different influenza strain or an immunogenic fragment or immunogenic variant.

In another preferred instance, the invention provides a population of nucleic acid constructs which comprises at least one construct encoding an antigen, immunogenic fragment thereof, or an immunogenic variant of either and at least one construct encoding an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof with adjuvant activity or variant thereof with adjuvant activity. The or each construct encoding an antigen, immunogenic fragment or immunogenic variant is

typically present at a weight ratio of about 10:1 to 1:10 with respect to the or each construct encoding the ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof with adjuvant activity or variant thereof with adjuvant activity. The weight ratio may be from about 10:1 to about 1:1, for example about 9:1.

In instances where a plurality of polypeptides is to be encoded, any combination of constructs encoding one or more polypeptides and a plurality of constructs may be employed. For instance, where three antigens are to be encoded, one construct may encode all three, one construct may encode two and another construct one antigen, or three constructs each encoding one antigen may, for instance, be employed. In instances where four antigens are to be encoded, they may be encoded via four, three, two or one construct, with each construct encoding one, two, three, or four different antigens. In one instance, as few as possible constructs may be employed, for instance only one or two constructs may be employed. The invention also provides populations of nucleic acids and vaccines comprising such combinations of nucleic acid constructs.

In a preferred instance, the invention provides a multivalent vaccine or population of nucleic acids comprising a construct encoding an antigen from a pandemic influenza virus and which also encodes 3, 4 or 5 and in particular 3 or 4 non-pandemic influenza antigens. The non-pandemic influenza antigens may be encoded on the same construct as the pandemic influenza antigen or on different constructs. In a preferred instance the 3, 4 or 5 other non-pandemic influenza antigens may be encoded on a separate construct or constructs and in particular on a single separate construct. In another instance, the construct encoding the pandemic antigen may also encode one or more of the other antigens.

In some embodiments, the nucleic acid construct will encode an adjuvant or a separate construct may do so. Any of the populations, compositions and vaccines of the invention may comprise, or may be administered simultaneously, sequentially or separately with such an adjuvant construct. Thus, the sequences inserted into the cloning site for insertion of a coding sequence may encode a polypeptide that can act as an adjuvant.

Thus, in one instance the invention comprises a nucleic acid construct wherein the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin

subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either with adjuvant activity which also has 80% amino acid homology to any of the preceding. In a preferred instance, the nucleic acid construct comprises two coding sequences comprising an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof with adjuvant activity or variant of either with adjuvant activity, where each is linked to such a chimeric promoter.

The two coding sequences encoding an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof with adjuvant activity or variant of either with adjuvant activity may be, in one instance, in inverse orientation. In another instance the two coding sequences encoding an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof with adjuvant activity or variant of either with adjuvant activity may be in the same orientation. In any of the constructs of the invention comprising more than one coding sequence linked to a chimeric promoter, the promoters may be in the same orientation, in different orientations or a mixture of the two where there are three or more such promoters.

In a preferred instance, the encoded adjuvant in any of the adjuvant constructs may be an ADP-ribosylating bacterial toxin. These include diphtheria toxin (DT), pertussis toxin (PT), cholera toxin (CT), the *E.coli* heat labile toxins (LT1 and LT2), *Pseudomonas* endotoxin A, *Pseudomonas* exotoxin S, *B cereus* exoenzyme, *B. sphaericus* toxin, *C botulinum C2 and C3 toxins*, C. *limosum* exoenzyme, as well as toxins from *C. perfringens*, *C spiriforma* and *C. difficile* and *Staphylococcus aureus* EDIN. Most ADP-ribosylating bacterial toxins contain A and B subunits. The construct may express the A subunit, the B subunit and/or both subunits.

In a preferred instance, the nucleic acid construct may encode the *E.coli* heat labile toxin and/or cholera toxin and in particular may express *E.coli* heat labile toxin. A GenBank entry for the complete sequences of the CT subunit A and B genes can be found at Locus VIBCTXABB (Accession No. D30053), while a GenBank entry for the complete sequences of the LT subunit A and B genes can be found at locus AB0116677 (Accession No. AB011677). In a particularly preferred instance, a construct of the invention may encode the LT A and/or LT B subunits encoded by the vectors pPJV2012 and/or pPJV7788 or a fragment of such a subunit which retains adjuvant activity or a variant of either which retains adjuvant activity. A

construct of the invention may comprise the coding sequences for the LT A and/or LTB subunits of the vectors pPJV2012 and/or pPJV7788, a fragment thereof which encodes a polypeptide which has adjuvant activity or a variant of either which has adjuvant activity. In a preferred instance a construct of the invention has both the LT A and LT B coding sequences.

In another preferred instance, the the construct may comprise the sequence of the vector PJV2012 provided by SEQ ID No: 61 or a sequence with 60% sequence identity thereto. In a further instance, the construct may comprise the sequence of the vector PJV7788 provided by SEQ ID No: 62 or a sequence with 60% sequence identity thereto.

The construct may express an active variant or fragment of a particular adjuvant. The variant or fragment will be said to be active if it retains at least some of the adjuvant activity of the polypeptide it is derived from. Thus, the variant and/or fragment will still be able to enhance an immune response against a particular antigen in comparison to the immune response seen when no adjuvant is administered with the antigen. The encoded sequence may be active fragments or variants of CT A and/or B subunits and in particular may be active fragments of LT A and/or B subunits. Variants and fragments which may be employed may, for instance, have any of the lengths, levels of sequence homology or other characteristics mentioned herein for variants and fragments. They may, for instance, be assessed using the Comparative Immunogenicity Assay using a particular antigen and then comparing the results seen with an adjuvant base vector and a variant vector encoding an adjuvant. In a particularly preferred embodiment the construct may encode the LTA and/or LTB subunits and in particular both. The construct may, in a particularly preferred instance be pPJV2012 or pPJV7788 the sequences for which are provided herein.

Any of the adjuvant constructs of the invention may be administered simultaneously, sequentially or separately with an antigen or a nucleic acid encoding an antigen. In a preferred instance an adjvuant construct of the invention may be administered simultaneously, sequentially or separately with a construct of the invention encoding an antigen. Compositions and vaccines comprising an adjuvant construct and a construct encoding an antigen are provided, as are core carriers

coated with both types of construct provided on them or mixtures of core carriers coated with an adjuvant construct and other core carriers coated with a construct encoding an antigen.

The toxin subunit may have had its naturally occurring signal sequence deleted. The natural signal sequences of the exotoxins may be replaced by a eukaryotic signal sequence and in particular by chicken lysozyme signal peptide. A naturally occurring exotoxin subunit may have been modified to detoxify the toxin. The A subunit may have been modified to disrupt or inactivate ADP-ribosyl transferase activity. In some cases the exotoxin subunits may retain toxicity. Thus, in some instances the exotoxin subunits may not have been detoxified.

Thus, the adjuvant constructs of the invention may be used to enhance an immune response against a particular antigen. The enhanced immune response may involve an immune response of greater magnitude or duration. In may mean that when the antigen is re-encountered the immune response then is greater than if no adjuvant was administered. The enhanced immune response may result in higher antibody titres. In the case of some constructs, and in particular those expressing exotoxin subunits, the adjuvant may result in an augmented cellular response and a T helper 1–like immune response against the antigen in question.

The adjuvant constructs may be administered with, be present in a vaccine with, or be present in a population of nucleic acids with any of the other constructs mentioned herein. The adjuvant constructs may also encode, or be administered with a construct which encodes, an antigen or antigen, including any of these mentioned herein and in particular those encoding influenza.

In one embodiment, a construct of the invention may encode an immunostimulator and/or an immunosuppressor. In a preferred instance a construct may encode one or more of interferon alpha, beta and/or gamma, interleukin-1, -2, -4, -5, -7, -10, -12, -13, -18, -23 and –24, GM-CSF, G-CSF, TGF-beta, B7.1, B7.2, CTLA-4, CD40 ligand, CD40, OX40, OX40 ligand, Flt-3 ligand, TRAIL, TRANCE, Fas ligand, TNF alpha, MCP-1 alpha, PF-4, SLC, MIP-3 alpha, IP-10. In some cases such a construct may be administered simulatenously, separately or sequentially with any other construct, in particular one of the invention and especially a construct encoding an antigen.

A construct of the invention may comprise a polyadenylation signal. The nucleic acid for insertion into the cloning site may comprise a polyadenylation (polyA) sequence. Such a polyA sequence is generally native to the coding sequence. Alternatively, a heterologous polyA sequence may be provided in the nucleic acid construct of the invention. Typically the polyA sequence will be provided downstream of the cloning site, such that it is operatively linked to a coding sequence inserted in the cloning site. Any suitable polyA sequence may be included in the construct using standard cloning techniques. Such polyA sequences are known in the art.

The poly A sequence may be:

(i) a natural poly A sequence;

(ii) a functional homologous variant of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

The natural poly A sequence (i) may be, for example a rabbit beta globin gene poly A, Human Papilloma Virus (HPV) early or late gene poly A, HSV-2gB gene poly A, a simian CMV immediate early gene poly A or HSV gD late gene poly A. The polyadenylation sequence may be derived from a polyadenylation sequence of a gene selected from that of the rabbit beta-globin gene, human papilloma virus (HPV) early or late genes, the HSV-2gB gene, a simian CMV immediate early gene and HSVgD late gene.

Preferably the natural poly A sequence (i) is selected from the group consisting of SEQ ID No. 10 (GenBank K03256), SEQ ID No. 11 (GenBank M16019), SEQ ID No. 12 (GenBank Z80699) and SEQ ID No. 13 (GenBank K02718). A particularly preferred poly A sequence comprises nucleotides 4243 to 4373 of SEQ ID NO: 54 or is a functional homologous variant or fragment thereof. A preferred poly A sequence is also provided by nucleotides 2556 to 2686 of SEQ ID No. 14 or a functional fragment or variant of either may also be employed.

In a further preferred instance, a polyadenylation signal employed in a construct of the invention may comprise:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, nucleotides 4243 to 4373 of SEQ ID No:54,

nucleotides 906 to 1038 of SEQ ID No: 61, nucleotides 4375 to 4050 of SEQ ID No:61, and/or nucleotides 2463 to 2593 of SEQ ID No:62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

In general, a functional polyA sequence is one which retains polyadenylation activity.

A poly A sequence may be tested for the ability to bring about polyadenylation of an RNA transcript using a routine expression assay. A functional homologous variant (ii) or functional fragment (iii) typically shows at least 50%, for example 60%, 70% 80% or more of the poly A activity of the natural poly A sequence in the assay.

Generally the poly A sequence will, when present in the construct of the invention, enhance expression, typically causing comparable enhancement to the natural poly A sequence (i) mentioned above.

A poly A sequence may also be assayed for functionality using the Comparative Expression Assay below. A test poly A region is swapped into the base vector in place of the RBGpA. A test poly A is considered functional if the poly A does not abrogate expression, but preferably increases expression in at least one but preferably two reference cell types, compared to the base vector. Preferably there is an increase in expression of at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40% or 50% or more. The increase may be any of the levels mentioned herein. In some cases a decrease may occur, including any of the levels mentioned herein. Preferred cell types are mammalian HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. SSC15 or B16 cells may also be employed. According to the assay, typically an homologous variant (ii) or fragment (iii) is functional if it allows greater than 50% of the expression improvement achieved by the natural poly A sequence (i).

Alternatively, or additionally, poly A sequences may be tested for activity in the Comparative Immunogenicity Assay below. Poly A sequence is swapped into the base vector in place of RBGpA. A functional poly A sequence provides antibody titres that are at least as high as or higher than those achieved by the base vector with at least one, preferably two antigens. Preferably the antibody titres are at least 5%,

10%, for instance 20%, 30% or 40% higher than those achieved with the base vector. In some instances any of the increases or descreases mentioned herein may be seen. Preferred antigens are HBsAg, HSV2gD and Flu-M2 antigens. Especially preferred antigens are influenza antigens, including any of those mentioned herein and in particular HA, NA and M2 antigens. In particular, HA antigen, or an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either may be employed. An homologous variant (ii) or fragment (iii) is typically functional if it allows the highest antibody titres achieved by the natural poly A sequence (i).

The nucleic acid construct may comprise additional control sequences which influence expression of a coding sequence inserted in the cloning site. The construct may include a non-translated leader sequence. The sequence is provided in the construct in operable linkage with the chimeric promoter, and therefore also with a coding sequence inserted at the cloning site. The leader provides a translational start site for expression of an inserted coding sequence and typically includes a Kozak sequence.

Typically the untranslated leader sequence comprises:

(i) a natural untranslated leader sequence;

(ii) a functional homologous variant of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Typically the leader sequence comprises sequences present in (i) which bind transcription components or regulatory proteins, or homologues of these sequences which are able to bind the same components or proteins. Typically such sequences or their homologues are present in the leader sequence in the same order and/or substantially the same relative spacing as in (i). In general the leader sequence comprises a translational start site for expression of an inserted coding sequence. Typically the leader sequence includes a Kozak sequence.

In general the untranslated leader sequence has a length of from about 10 to about 200 nucleotides, for example from about 15 to 150 nucleotides, preferably 15 to about 130 nucleotides. Leader sequences comprising, for example, 15, 50, 75 or 100 nucleotides may be used.

Generally a functional untranslated leader sequence is one which is able to provide a translational start site for expression of a coding sequence in operable

linkage with the leader sequence. Typically a functional variant (ii) or fragment (iii) has substantially the same activity as and/or complements the activity of the natural sequence (i), usually in facilitating or enhancing expression of a coding sequence in operable linkage with the sequence.

A variant (ii) or fragment (iii) may be tested for activity as an untranslated leader sequence relative to natural leader sequence using standard protocols. For example, expression vectors may be prepared comprising a natural leader sequence (i) operably linked to its native coding sequence, and expression monitored in suitable host cells e.g. mammalian HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. Test constructs may be prepared in which the natural leader sequence is replaced by an homologous variant or fragment and expression is monitored again in the same host cells. In general, a variant (ii) or fragment (iii) provides at least 50%, such as 60%, 70%, 80%, 90% or 100% or more of the expression provided by the natural sequence. In some cases any of the increases or descreases in expression mentioned herein may be seen.

A potential leader sequence can also be tested for utility in the Comparative Expression Assay below. A test leader sequence is swapped into the base vector in place of the HBV pre S2 5'UTR. A functional leader sequence does not abrogate expression but preferably increases expression in at least one but preferably two reference cell types, compared to the base vector. In general expression is increased by at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40% or 50%. Preferred cell types are mammalian HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. According to the assay, an homologous variant (ii) or fragment (iii) is typically functional if it allows greater than 50% of the expression improvement achieved by the natural leader sequence.

Alternatively, or additionally, a leader sequence may be tested for activity in the Comparative Immunogenicity Assay below. A leader sequence is swapped into the base vector in place of HBV pre S2 5' UTR. A functional leader sequence provides antibody titres that are at least as high as or higher than those achieved by the base vector, with at least one preferably two antigens. Preferably the antibody titres are at least 5%, 10%, 20%, 30% or 40% higher than with the base vector. Preferred antigens are HBsAg, HSV 2gD and Flu-M2 antigens. Especially preferred antigens are influenza antigens, including any of those mentioned herein and in

particular HA, NA and M2 antigens. In particular, HA antigen, or a fragment or variant thereof may be employed. An homologous variant (ii) or fragment (iii) is typically functional if it allows the highest antibody titres allowed by the natural leader sequence (i). However, in some instances one of the decreased levels of expression mentioned herein may be seen.

Suitable leader sequence can be obtained using standard protocols. For example, HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence and HSV type 2 gD antigen sequence is available at GenBank M54923, M54923 and Z86099 respectively. Primers can be designed based on this known sequence and used to isolate homologous sequences. Leader sequences may be synthesised based on known sequences.

In general the natural sequence (i) is a eukaryotic sequence or a viral sequence, in particular, of a virus which infects a eukaryote. Preferably the natural sequence (i) is HBV or HSV sequence, for example HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence, or HSV type 2 gD antigen sequence. Particularly preferably, (i) is selected from the group consisting of SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6 and SEQ ID No. 7. In a further preferred instance, the untranslated leader sequence comprises nucleotides 1864-1984 of SEQ ID NO: 54 or SEQ ID No. 14. Functional fragments or variants of any of these sequences may also be employed.

In one instance, the non-translated leader sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No 5, Seq ID No: 6, Seq ID No: 7 or nucleotides 1864 to 1984 of SEQ ID No. 54.

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Such a non-translated leader sequence may be employed in any of the constructs of the invention.

The nucleic acid construct may comprise an enhancer sequence. An enhancer sequence is typically provided 3' of the cloning site, in operable linkage with both the chimeric promoter and an inserted coding sequence, and acts to increase transcription of the inserted sequence.

In general the enhancer comprises:

(i) a natural enhancer;

(ii) a functional homologous variant of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

The enhancer sequence generally comprises from about 50 to about 850 nucleotides, for example from about 75 to about 500 nucleotides. Enhancers of about 100, 200, 300 or 400 nucleotides may be used.

Typically (i) is a eukaryotic or viral enhancer, in particular, of a virus which infects eukaryotes. Usually such enhancers occur in the 3' untranslated region (3' UTR) of a gene. Preferably (i) is an HBV or a CMV enhancer, for example an HBs Ag 3' UTR or a simian CMV immediate early gene 3' UTR. Preferably (i) comprises SEQ ID No. 8 or SEQ ID No. 9. Preferably (i) may comprise nucleotides 3699-4231 of SEQ ID NO: 54. In another preferred instance (i) may comprise nucleotides 2012 to 2544 of SEQ ID No. 14. Functional fragments or variants of any of these sequences may be employed.

In general, the enhancer in the construct comprises sequences found in (i) which bind transcription components or regulatory proteins, for example transcription factors, or homologues of these sequences which bind the same components or proteins. Preferably these sequences are present in the enhancer in the same order and/or substantially the same relative spacing as in (i).

Generally a functional enhancer is one which enhances or increases expression of a polynucleotide, for example, a coding sequence, which is operably linked to the enhancer sequence. Typically a functional homologous variant (ii) or fragment (iii) has substantially the same activity (for example, enhancement of expression) as and/or complements the activity of the natural enhancer (i).

Enhancer activity may be assayed using an enhancer trap assay. Protocols are known in the art. A functional homologous variant (ii) or fragment (iii) preferably provides at least 50% of the enhancer activity shown by the natural enhancer in such as assay. Typically the activity is at least 60%, 70%, 80%, 90, 100% or more of the activity of the natural enhancer. In general, a functional variant (ii) or fragment (iii) is able to complement the activity of the natural enhancer (i) in the assay.Any of the increases or decreases referred to herein may, for instance, be seen.

In one preferred instance, the enhancer sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No:8, SEQ ID No: 9, nucleotides 3699 to 4231 of SEQ ID No. 54, nucleotides 3831 to 4363 of SEQ ID No: 61 and/or 4507 to 5038 of SEQ ID No: 62.

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); and/or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

Enhancer utility may also be tested using the Comparative Expression Assay set out below. A test 3' UTR sequence is swapped into the base vector. A 3' UTR has utility if it does not abrogate expression, but preferably increases expression in at least one but preferably two reference cell types compared to the base vectors in the assay. Preferably expression is increased by at least 5%, 10%, 20%, 30%, 40% or 50%. Preferred cell types are mammalian HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. According to this assay, an homologous variant (ii) or fragment (iii) is typically functional if it allows greater than 50% of the expression improvement achieved by the natural enhancer sequence (i).

Additionally or alternatively, enhancer sequences may be tested for activity in the Comparative Immunogenicity Assay below. A 3' UTR is swapped into the base vector. A functional enhancer sequence provides antibody titres that are at least as high as or higher than those achieved by the base vector with at least one, preferably two antigens. Preferably the antibody titres are at least 5%, 10%, 20%, 30% or 40% higher than with the base vector. Preferred antigens are HBs Ag, HSV2gD and Flu-M2 antigens. Especially preferred antigens are influenza antigens, including any of those mentioned herein and in particular HA, NA and M2 antigens. In particular, HA may be employed or a fragment or variant thereof. An homologous variant (ii) or fragment (iii) is functional if it allows the highest antibody titre allowed by the natural enhancer sequence (i).

Suitable enhancer sequence can be obtained using standard cloning methods. For example, HBsAg 3' UTR sequence, or simian CMV immediate early gene 3' UTR sequence can be accessed at GenBank AF143308 and M16019. Primers can be designed based on this known sequence and used to isolate homologous sequences.

In some instances, where a plurality of polypeptides are encoded by a single construct, it may be desirable to omit particular sequences to reduce the size of the

construct. In particular, a construct may lack an enhancer and/or region encoding an untranslated leader sequnce operably linked to the sequence or sequences encoding the polypeptide to be expressed. This may, for instance, be the case where three, four, five or more polypeptides are expressed from the same construct and particularly three, four or five polypeptides are expressed from the same construct.

In a preferred embodiment, the nucleic acid construct comprises a heterologous polyA sequence, a heterologous leader sequence and a heterologous enhancer, all in operable linkage with the chimeric promoter, for efficient expression of an inserted coding sequence.

In a further aspect, the present invention also provides a nucleic acid construct comprising, or sometimes consisting essentially of:

(i) a promoter sequence

(ii) a non-translated leader sequence derived from HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence; and

(iii) a coding sequence operably linked to (i) and (ii)

wherein the coding sequence is heterologous to the non-translated leader sequence.

Typically the promoter sequence (i) is derived from a viral or eukaryotic promoter sequence. The promoter sequence may be a natural promoter sequence, a functional homologue of the natural sequence or a functional fragment of either. Suitable natural promoters include, for example, the hCMV immediate early promoter, Pseudorabies virus (PRV) promoter or Rous sarcoma virus (RSV) promoter. Preferably the natural promoter comprises SEQ ID NO: 52 or SEQ ID NO: 53.

An artificial promoter construct, such as the chimeric promoter described above, may be used, provided that the promoter is functional.

A functional promoter sequence is generally one which is able to cause (including initiate and regulate) transcription of an operably linked coding sequence in a suitable host cell.

A promoter sequence may be tested for promoter activity using a routine expression assay. A functional homologue or fragment of a natural promoter

sequence typically provides at least 50%, for example, or least 60, 70, 80 or 90% of the expression provided by the natural sequence in such an assay.

The non-translated leader sequence (ii) is as described above. Suitable coding sequences (iii) include those already described in relation to the chimeric promoter construct. However, in the present aspect of the invention, the coding sequence is heterologous to the non-translated leader sequence. The present construct typically includes a poly A sequence, which as already described, may be native to the coding sequence, or provided as a heterologous poly A sequence in the construct. Suitable poly A sequences have already been described. The construct may additionally include an enhancer sequence 3' of the coding sequence. Suitable enhancer sequences are described above in relation to the chimeric promoter construct.

In another aspect, the invention provides a nucleic acid construct comprising, or in some embodiments consisting essentially of:

(i) a promoter sequence;

(ii) a coding sequence operably linked to the promoter sequence (i) and;

(iii) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence (ii);

wherein the enhancer sequence (iii) is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence (ii) is heterologous to the enhancer sequence.

The construct may include a non-translated leader sequence such as the ones already described in relation to the chimeric promoter construct.

Typically the promoter sequence (i) is derived from a viral or eukaryotic promoter sequence. The promoter sequence may be a natural promoter sequence, a functional homologue of the natural sequence or a functional fragment of either. Suitable natural promoters include, for example, the hCMV immediate early promoter, Pseudorabies virus (PRV) promoter or Rous sarcoma virus (RSV) promoter. Preferably the natural promoter comprises SEQ ID NO: 52 or SEQ ID NO: 53.

An artificial promoter construct, such as the chimeric promoter described above, may be used, provided that the promoter is functional.

A functional promoter sequence is generally one which is able to cause (including initiate and regulate) transcription of an operably linked coding sequence in a suitable host cell.

A promoter sequence may be tested for promoter activity using a routine expression assay. Functional homologues or fragments of a natural promoter sequence typically provide at least 50%, for example, or least 60, 70, 80 or 90% or the expression provided by the natural sequence in such an assay.

Suitable coding sequences (ii) include those already mentioned in relation to the chimeric promoter construct. However, in the present aspect, the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence. The enhancer sequence (iii) of the construct is described above. The present construct also typically includes a poly A sequence. As in the case of the chimeric promoter construct, this poly A region may be native to the coding sequence (ii) or may be provided as a heterologous poly A component in the construct.

A construct according to any aspect of the present invention may comprise a signal peptide sequence. Thus, a nucleic acid construct may comprise a nucleotide sequence encoding a signal peptide that is operably linked to the coding sequence. The signal peptide sequence is inserted in operable linkage with the promoter such that the signal peptide is expressed and facilitates secretion of a polypeptide encoded by coding sequence also in operable linkage with the promoter.

Typically a signal peptide sequence encodes a peptide of 10 to 30 amino acids for example 15 to 20 amino acids. Often the amino acids are predominantly hydrophobic. In a typical situation, a signal peptide targets a growing polypeptide chain bearing the signal peptide to the endoplasmic reticulum of the expressing cell. The signal peptide is cleaved off in the endoplasmic reticulum, allow for secretion of the polypeptide via the Golgi apparatus.

A signal peptide for use in the invention may comprise:

(i) a natural signal peptide sequence;

(ii) a homologous variant of (i) which retains signal peptide activity; or

(iii) a fragment of (i) or (ii) which retains signal peptide activity.

Sequence (i) may be for example human tissue plasminogen activator signal peptide (hTPAsp) (GenBank L00141), the aprotinin signal peptide (GenBank

AAD13685), tobacco extensin signal peptide (GenBank JU0465), or chicken lysozyme signal peptide (GenBank AF410481).

A signal peptide, suitable for use in the present invention, is one which will enable the secretion of heterologous proteins. A functional signal peptide can be identified in an assay which compares the effect of a test signal peptide with the effect of a known signal peptide - e.g. human tissue plasminogen activator signal peptide (hTPAsP) - and with the effect of having no signal peptide. The Comparative Expression Assay set out below may be used but with the following modification. Secretion expression vectors are constructed containing the base vector with either the test signal peptide, hTPAsp or no signal peptide. Coding sequences for polypeptides devoid of their naturally occurring signal peptides are inserted into the vectors and the vectors transformed into reference host cells. Preferably cells are mammalian HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. The cell media is analysed for polypeptide expression levels. A functional signal peptide enables polypeptide secretion at a higher level than a vector lacking a signal peptide with at least one, preferably two polypeptides. Typically, secretion is 5% higher, or more preferably 10% higher or more, for example 20 or 50% higher or more. Typically, secretion levels are comparable to those obtained using hTPAsp. In some cases, any of increases or descreases referred to herein may be seen.

In a preferred instance, the signal peptide is selected from the human tissue plasminogen activator signal peptide (hTPAsp), aprotinin signal peptide, tobacco extensin signal peptide and chicken lysozyme signal peptide.

Allowing secretion of encoded protein outside of an expressing cell may have a number of advantages, in particular where the protein is an antigen. For example, increased antigen secretion could allow greater antigen uptake and response by immune cells (macrophages, Langerhan's cells, B-cells, T-cells etc), enable the ability of antigen to reach the bloodstream and signal cells (cytokines), enable an antigen to find cellular ligands and effect a function (antibodies, toxins such as cholera toxin, *E.coli* LT) and participate in normal cellular biochemical processes (cellular receptors).

A construct of the invention may be in the form of a plasmid. A nucleic acid construct of the invention may be in the form of a plasmid expression vector. In a

preferred instance, a construct of the invention may be a DNA construct. In alternative instances, the construct may be an RNA or PNA construct

The vector may then include additional elements, such as an origin of replication, or selector genes. Such elements are known in the art and can be included using standard techniques. In one embodiment, the plasmid vector has the sequence in SEQ ID NO:14. Alternatively, the construct may be included in a viral vector construct.

In some embodiments, the nucleic acid construct of the invention may comprise two or more of the chimeric promoters defined herein. Thus, the construct may comprise a plurality of chimeric promoters and in particular the construct may have two, three, four, five or more chimeric promoters. The chimeric promoters will preferably be each separately operably linked to a cloning site for insertion of a coding sequence. Thus, the construct may express two, three, four, five or more more coding sequences. The coding sequences expressed may be any of those specified herein. In a preferred instance, the construct has two chimeric promoters with each having a coding sequence operably linked to them. In particular, the two promoters may be transcribed away from each other. In other embodiments, the promoters may be transcribed towards each other. Thus, the promoters may be in inverted orientation or in some cases the same orientation.

In particular, the constructs with two promoters may express the A and B subunits of an ADP-ribosylating bacterial toxin, including any of those mentioned herein and preferably an LTA and B subunit. However, constructs with multiple promoters may express any combination of the coding sequences mentioned herein. In a further preferred aspect, constructs with multiple promoters may express a plurality of influenza antigens, including combinations of any of the influenza antigens mentioned herein. In another preferred aspect, a construct may express a pandemic influenza antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of either and one or more of any of the coding sequences mentioned herein.

In cases where the construct has multiple chimeric promoters each may comprise, or be operably linked to, any of the sequences mentioned herein. In a particularly preferred instance, the heterologous intron of one or more of the promoters may be the rat insulin gene intron A sequence. One or more of the

chimeric promoters may also preferably comprise the 5' UTR of HBVpre-S2. One or more of the promoters may comprise the poly adenylation sequence of the rabbit beta globin gene.

In a preferred case, the nucleic acid construct of the invention may comprise two chimeric promoter sequences, with each promoter sequence being operably linked to a cloning site which has a coding sequence inserted into it, where each chimeric promoter comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

with the coding sequence operably linked to one chimeric promoter encoding a LTA subunit and the coding sequence linked to the other encoding an LTB subunit. The construct can therefore express both subunits. Preferably:

- the heterologous intron of each promoter is the rat insulin gene intron A sequence;
- the sequence encoding each LT subunit is operably linked to the 5' UTR of HBV pre-S2; and/or
- an LT encoding sequence is operably linked to the rabbit beta globin gene polyadenylation sequence.

In an especially preferred instance, one or more of the elements of the vectors pPJV7563 and/or pPJV1671 may be employed in a nucleic acid construct of the invention. Functional fragments or variants of such elements may be employed. In particular, any of the elements of pPJV1671 specified in Table 3, functional variants of such elements or functional fragments of either may be employed. Similarly, any of the elements of pPJV7563 specified in Example 5, functional variants of such elements or functional fragments of either may be employed. Preferably, the sequences of one or more of those elements of pPJV7563 and/or pPJV1671 themselves may be employed. In another preferred embodiment the corresponding elements of the construct pPML7789 may be employed and the location of these is indicated in particular in Figure 21 and the sequence listing provided herein. In

further preferred instances, the corresponding elements of the vectors pPJV2012 and pPJV7788 may be employed and in particular those elements indicated in Tables 6 and 8 may be employed. Functional fragments and variants of the elements of the vectors pPML7789, pPJV2012 and pPJV7788 may also be employed in constructs of the invention.

In one preferred instance, a construct of the invention comprises:

(i) the sequence of the vector pPJV7563 provided as SEQ ID No:14;

(ii) a sequence with 60% sequence identity to the sequence of (i),

apart from insertion of the sequence encoding the influenza antigen, an immunogenic fragment or immunogenic variant into the sequence of (i) or (ii) so that it is operably linked to the chimeric promoter. In a preferred instance, a coding sequence of such a construct enodes a HA antigen, an immunogenic variant thereof or or an immunogenic fragment of either.

In further preferred instances of the invention a construct is provided where the vector comprises the sequence of the vector pPJV1671 provided as SEQ ID No: 54 or a sequence with 60% sequence identity thereto. IN another preferred instance, the vector comprises the sequence of the vector pPML7789 provided as SEQ ID No: 59 or a sequence with 60% sequence identity thereto.

In a preferred instance, the CMV promoter, untranslated leader sequence, rat insulin intron A, untranslated leader sequence, HBV enhancer and/or rabbit poly A sequence of pPJV7563 and/or pPJV1671 are employed or a functional variant or fragment of such sequences. In an especially preferred instance the rat insulin intron A intron and/or HBV enhancer of pPJV7563 and/or pPJV1671 are employed or a functional fragment or variant of such sequences. In particular, both the rat insulin intron A and HBV enhancer are employed or a functional fragment or variant of such sequences is employed. In another preferred instance the corresponding sequences of pPML7789, pPJV2012, pPJV7788, functional fragments of such sequences or variants of such sequences may be employed.

In instances where the construct encodes several polypeptides and in particular antigens, particular sequences may be omitted to reduce the size of the construct. For instance, the constructs may lack an enhancer and/or an untranslated leader sequence, particularly where three, four, five or more antigens are encoded. In

other constructs encoding the same number of antigens these sequences may still be present.

In a particularly preferred instance, the vector pPJV7563 vector is used to clone the desired coding sequences into and in particular the coding sequences for an antigen such as, for instance, any of the antigens mentioned herein. In a preferred instance a desired influenza antigen, fragment or variant thereof is cloned into the vector. Modifications may in some cases be made to pPJV7563. For instance, the Kanamycin resistance gene may be swapped for an alternative gene and in particular an alternative selectable or screenable marker. Any of the nucleic acid constructs of the invention may comprise selectable markers. The pUC19 plasmid backbone of pPJV7563 may be modified or replaced with a different plasmid backbone. The specific elements of pPJV7563 may, for instance, be swapped with any elements fulfilling the same function and in particular functional variants or fragments of the sequences in pPJV7563. In some instances pPJV7563 may be modified by replacement of a particular element with any of the elements referred to herein which have the same function as the element to be replaced. Similar modifications may be to pPJV1671 when it is being employed. Similar modifications may also be made to any of the vectors mentioned herein and in particular pPML7789, pPJV2012 and pPJV7788. The coding sequences of pPML7789, pPJV2012 and pPJV7788 may be swapped for any of the coding sequences mentioned herein. In the case of pPJV2012 and pPJV7788 one or both coding sequences of the vector may be swapped.

In one preferred embodiment a nucleic acid construct of the invention comprises:

(i) the sequence of the vector pPJV7563 provided as SEQ ID No:14;

(ii) a sequence with 60% sequence identity to the sequence of (i),

apart from insertion of the desired coding sequences so that they are operably linked to the chimeric promoter. In a preferred instance, the coding sequences encode an antigen. In particular, a coding sequence encoding an influenza antigen, an immunogenic fragment or immunogenic variant is inerted into the sequence of (i) or (ii) so that it is operably linked to the chimeric promoter.

The construct may have 60% sequence identity to the sequence of (i) taking into account the inserted coding sequences or disregarding them. The construct may

have any of the values of sequence identity specified herein and in particular, at least 70%, preferably at least 80%, more preferably at least 90% and even more preferably at least 95%. In a preferred embodiment the construct is pPJV7563 apart from insertion of the coding sequences.

Additional sequences may be added to the sequence of pPJV7563 to generate further constructs of the invention. For instance, one or more chimeric promoters of the invention may be added togther with any of the sequences mentioned herein which may be in operable linkage to such a promoter. The cloning site of pPJV7563 may be modified to allow the cloning of different restriction fragments and in particular the cloning of coding sequences as different fragments. Similar modifications may be made to any of the vectors mentioned herein and in particular to pPML7789, pPJV2012 and pPJV7788.

In another preferred instance, a construct of the invention may be made by replacing some or all of the coding sequences of pPJV1671 encoding an antigen with sequences encoding a different antigen. Again, any of the modifications discussed above in relation to pPJV7563 may also be made to modifiy pPJV1671. Such modifications may also be made to pPML7789. The coding sequences of pPJV2012 and pPJV7788 may also be replaced with other desired coding sequences and in particular those encoding an antigen.

In other preferred instances, the construct of the invention comprises the:

- sequence of the vector pPJV1671 provided as SEQ ID No: 54 or a sequence with 60% sequence identity thereto;
- sequence of the vector pPML7789 provided as SEQ ID No: 59 or a sequence with 60% sequence identity thereto;
- sequence of the vector pPJV2012 provided by SEQ ID No: 61 or a sequence with 60% sequence identity thereto;
- sequence of the vector pPJV7788 provided by SEQ ID No: 62 or a sequence with 60% sequence identity thereto.

In such instances, the construct may have any of the percentage sequence identities specified herein and in particular those specified above in relation to pPJV7563.

A construct of the invention may comprise any of the elements specified in the Tables herein and in particular those specified in Tables 3, 6 and 8. Functional fragments of such sequences and variants of such sequences and their fragments may also be employed. In a preferred instance, where the vector is an adjuvant vector one or more of the elements specified by Tables 6 and/or 8 may be present or a fragment or variant of such a sequences.

The invention also provides a method for generating a construct of the invention comprising inserting coding sequences for a polypeptide and in particular an antigen into a vector of the invention lacking such sequences. The coding sequences may encode any of the antigens mentioned herein. In a preferred instance, the invention provides such a method comprising inserting the chosen coding sequences into pPJV7563, pPJV1671 or one of the modified versions of the vectors discussed herein. They may be inserted into pPML7789, pPJV2012 and/or pPJV7788 and in particular pPML7789. In some cases an additional coding sequence may be inserted and/or a coding sequence already present may be replaced with a different coding sequence.

The invention also provides a promoter sequence and a coding sequence operably linked to the promoter, where the construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence, which is in operable linkage with the coding sequence and promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence, where the enhancer sequence is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or a 3' UTR of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

The various elements of the vector may be any of those specified herein. In one instance, the promoter sequence (i) is selected from the hCMV immediate early promoter sequence, Pseudorabies virus promoter sequence and Rous sarcoma virus promoter sequence. In another, the promoteris one of the chimeric promoters discussed herein.

In another instance, the invention provides a purified, isolated chimeric promoter where the chimeric promoter is any of those defined herein.

A polynucleotide construct of the invention may be substantially free of or associated with cells or with cellular material. It may be in substantially isolated form, or it may be in substantially purified form, in which case it will generally comprise at least 90% e.g at least 95%, 98% or 99% of the polynucleotide or dry mass in the preparation.

The present nucleic acid molecules may be delivered to suitable host cells, for expression of a polynucleotide in operable linkage with the promoter. Preferably the host cells are mammalian cells, in particular human cells. Suitable methods for delivery of nucleic acids to such cells are known in the art and include, for example, dextran mediated transfection, calcium phosphate precipitation, electroporation and direct microinjection into nucleii. Thus, the invention provides a cell transformal with a vector of the invention.

As described above, a nucleic acid coding sequence in a construct may encode a therapeutically relevant polypeptide. The present constructs may therefore be used for nucleic acid immunisation or gene therapy using standard gene delivery protocols. Suitable methods for gene delivery are known in the art, as discussed below. The nucleic acid molecules can be delivered either directly to a subject, or alternatively, delivered *ex vivo* to cells derived from the subject whereafter the cells are reimplanted in the subject. In a preferred instance, the constructs are delivered directly to the subject where the encoded polypeptide is an antigen, particularly an influenza antigen. Any of the delivery routes mentioned herein may be employed and in particular transdermal delivery. The adjvuant constructs of the invention may be administered to enhance an immune response against an antigen and in particular against an antigen expressed from a construct of the invention.

The invention also provides for the use of a nucleic acid construct of the invention or a population of nucleic acid constructs of the invention or coated particles of the invention in the manufacture of a medicament for nucleic acid immunisation. The medicament may be one which is to be delivered by injection, transdermal particle delivery, inhalation, topically, orally, intranasally or

transmucosally. In a preferred instance, the medicament is to be delivered by needleless injection.

For use in nucleic acid immunisation or gene therapy, the nucleic acid constructs may be formulated as conventional pharmaceutical preparations. This can be done using standard pharmaceutical formulation chemistries and methodologies, which are available to those skilled in the art. For example, compositions containing one or more nucleic acid sequences (e.g., present in a suitable vector form such as a DNA plasmid) can be combined with one or more pharmaceutically acceptable excipients or vehicles to provide a liquid preparation. Thus also provided is a pharmaceutical composition comprising a nucleic acid construct of the invention and a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. In a preferred instance a pharmaceutical composition may comprise a plurality of constructs of the invention or a population of constructs of the invention including any of those mentioned herein.

Auxiliary substances, such as wetting or emulsifying agents, pH buffering substances and the like, may be present in the excipient or vehicle. These excipients, vehicles and auxiliary substances are generally pharmaceutical agents which may be administered without undue toxicity and which, in the case of vaccine compositions will not induce an immune response in the individual receiving the composition. Pharmaceutically acceptable excipients include, but are not limited to, liquids such as water, saline, polyethyleneglycol, hyaluronic acid, glycerol and ethanol. Pharmaceutically acceptable salts can also be included therein, for example, mineral acid salts such as hydrochlorides, hydrobromides, phosphates, sulfates, and the like; and the salts of organic acids such as acetates, propionates, malonates, benzoates, and the like. It is also preferred, although not required, that the preparation will contain a pharmaceutically acceptable excipient that serves as a stabilizer, particularly for peptide, protein or other like molecules if they are to be included in the composition. Examples of suitable carriers that also act as stabilizers for peptides include, without limitation, pharmaceutical grades of dextrose, sucrose, lactose, trehalose, mannitol, sorbitol, inositol, dextran, and the like. Other suitable carriers include, again without limitation, starch, cellulose, sodium or calcium phosphates, citric acid, tartaric acid, glycine, high molecular weight polyethylene glycols (PEGs),

and combination thereof. A thorough discussion of pharmaceutically acceptable excipients, vehicles and auxiliary substances is available in REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N.J. 1991), incorporated herein by reference.

Certain facilitators of nucleic acid uptake and/or expression ("transfection facilitating agents") can also be included in the compositions, for example, facilitators such as bupivacaine, cardiotoxin and sucrose, and transfection facilitating vehicles such as liposomal or lipid preparations that are routinely used to deliver nucleic acid molecules. Anionic and neutral liposomes are widely available and well known for delivering nucleic acid molecules (see, e.g., *Liposomes: A Practical Approach*, (1990) RPC New Ed., IRL Press). Cationic lipid preparations are also well known vehicles for use in delivery of nucleic acid molecules. Suitable lipid preparations include DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride), available under the tradename Lipofectin™ , and DOTAP (1,2-bis(oleyloxy)-3-(trimethylammonio)propane), see, e.g., Felgner *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416; Malone *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081; US Patent Nos 5,283,185 and 5,527,928, and International Publication Nos WO 90/11092, WO 91/15501 and WO 95/26356. These cationic lipids may preferably be used in association with a neutral lipid, for example DOPE (dioleyl phosphatidylethanolamine). Still further transfection-facilitating compositions that can be added to the above lipid or liposome preparations include spermine derivatives (see, e.g., International Publication No. WO 93/18759) and membrane-permeabilizing compounds such as GALA, Gramicidine S and cationic bile salts (see, e.g., International Publication No. WO 93/19768).

Alternatively, the nucleic acid molecules of the present invention may be encapsulated, adsorbed to, or associated with, particulate carriers. Suitable particulate carriers include those derived from polymethyl methacrylate polymers, as well as PLG microparticles derived from poly(lactides) and poly(lactide-co-glycolides). See, e.g., Jeffery *et al.* (1993) *Pharm. Res.* 10:362-368. Other particulate systems and polymers can also be used, for example, polymers such as polylysine, polyarginine, polyornithine, spermine, spermidine, as well as conjugates

of these molecules. In a preferred embodiment, constructs of the invention are precipitated onto carriers in the presence of a nucleic acid condensing agent and a metal ion chelating agent. Preferred condensing agents include cationic polymers, in particular polyamines, and in particular a polyargine or a polylysine. In a preferred instance the polyamine is $(Arg)_4$ or $(Arg)_6$. Reference may be made to the techniques discussed in WO2004/208560 which may be employed to generate coated carrier particles of the invention.

Once formulated the compositions can be delivered to a subject *in vivo* using a variety of known routes and techniques. For example, the liquid preparations can be provided as an injectable solution, suspension or emulsion and administered via parenteral, subcutaneous, intradermal, intramuscular, intravenous injection using a conventional needle and syringe, or using a liquid jet injection system. Liquid preparations can also be administered topically to skin or mucosal tissue, or provided as a finely divided spray suitable for respiratory or pulmonary administration. Other modes of administration include oral administration, suppositories, and active or passive transdermal delivery techniques.

Alternatively, the compositions can be administered *ex vivo,* for example delivery and reimplantation of transformed cells into a subject are known (e.g., dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation, electroporation, and direct microinjection into nuclei).

The compositions are administered to a subject in an amount that is compatible with the dosage formulation and that will be prophylactically and/or therapeutically effective. An appropriate effective amount will fall in a relatively broad range but can be readily determined by one of skill in the art by routine trials. The "Physicians Desk Reference" and "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" are useful for the purpose of determining the amount needed. For example, it is generally expected that an effective dose of the polynucleotide will fall within a range of about 0.001 to 1000μg, preferably from 0.001 to 100μg, more preferably 0.01 to 10.0μg. In some instances the dose may be from 0.1 to 100μg, preferably from 0.5 to 25μg. In cases where the dose is administered via needleless injection, the dose may in some cases be from 0.1 to 25μg, preferably from 0.5 to 10 μg and more preferably from 1 to 5μg. In particular,

the dose may be 4μg. In some cases, the dose may be given via a plurality of needleless injections such as, for instance, in one, two, three, four or five needleless injections.

In some cases after an initial administration a subsequent administration of the construct may be performed. In particular, following an initial immunization a subject may be given a booster immunization. The booster immunization may be, for instance, a dose chosen from any of those mentioned herein. The subject administration may, for instance, be at least a week, two weeks, a month, two months or six months after the initial administration.

In one instance, a nucleic acid construct of the invention may be used in conjunction with another nucleic acid construct. In one case, the nucleic acid construct may be one of those described herein for the expression of an adjuvant and the other construct may be a construct encoding one or more antigens. In a preferred case, both constructs may employ the chimeric promoters of the invention. Where two or more agents are given herein they may in particular be administered separately, simultaneously or sequentially.

In the case where one construct expresses an adjuvant and the other an antigen or antigens, the antigens may in particular be from HSV, HPV, or Hepatitis virus (particularly Hepatitis B virus). The antigens may in particular be the HSV ICP0, ICP4, ICP 22 and/ICP 27 antigens and preferably all four. In an especially preferred case, the antigens may be an influenza antigen including any of those mentioned herein and in particular HA, NA and/or M2 and in particular HA and NA and especially HA. In cases where such antigens are expressed, the adjuvant construct will in particular express LTA and/or LTB and in particular both. Any of the adjuvant constructs mentioned herein may be employed simultaneously, separately or sequentially with any of the constructs encoding an antigen.

Any two entities of the invention may be administered separately, sequentially or simultaneously. The two constructs may be administered separately, simultaneously or sequentially. The two may be administered in the same or different compositions. In particular, where one construct has an adjuvant effect the two will be delivered so that an adjuvant effect is seen, that is the immune response generated will be greater and/or for a longer period than if the adjuvant had not been

administered with the antigen. In a preferred instance, the two constructs may be delivered in the same composition, preferably on the same carrier particles. In other cases carrier particles carrying a construct may be mixed with carrier particles carrying another construct. Any such administration schemes may be employed for any of the combinations of a plurality of construct discussed herein.

In a preferred embodiment, the nucleic acid constructs of the invention are delivered to target cells using a particle-mediated delivery technique. Particle mediated methods for delivering nucleic acid preparations are known in the art.

Thus, in a preferred instance the invention provides coated particles which comprise carrier particles coated with a nucleic acid construct of the invention or a population of nucleic acid constructs of the invention. In particular, the coated particles are suitable for delivery from a particle-mediated delivery device.

Particles for particle mediated delivery may be formed by coating the present nucleic acid molecules onto carrier particles (*e.g.*, core carriers) using a variety of techniques known in the art. Carrier particles are selected from materials which have a suitable density in the range of particle sizes typically used for intracellular delivery from a particle-mediated delivery device. Typically carrier particles have a diameter of from 0.1 to 5μm, for example 0.5 to 3μm, preferably 1 to 2μm. In some cases, the particles may have a diameter of from 1 to 3μm. The optimum carrier particle size will, of course, depend on the diameter of the target cells.

Usually carrier particles are selected from inert metals. The metals are inert in that they are not physiologically active. For the purposes of the invention Iron, Cobalt, Nickel, Copper, Silver, Cadmium, Hafnium, Tantalum, Tungsten, Platinum, Gold, and Stainless Steel may, for instance may be used and in particular tungsten, gold, platinum and iridium carrier particles can be used. Tungsten and gold particles are preferred. Thus, in a preferred instance, the invention provides coated carrier particles which are gold or tungsten. Tungsten particles are readily available in average sizes of 0.5 to 2.0 μm in diameter. Although such particles have optimal density for use in particle acceleration delivery methods, and allow highly efficient coating with DNA, tungsten may potentially be toxic to certain cell types. Gold particles or microcrystalline gold (e.g., gold powder A1570, available from

Engelhard Corp., East Newark, NJ) will also find use with the present methods. Gold particles provide uniformity in size (available from Alpha Chemicals in particle sizes of 1-3 μm, or available from Degussa, South Plainfield, NJ in a range of particle sizes including 0.95 μm) and reduced toxicity. Microcrystalline gold provides a diverse particle size distribution, typically in the range of 0.1-5 μm. However, the irregular surface area of microcrystalline gold provides for highly efficient coating with nucleic acids.

A number of methods are known and have been described for coating or precipitating DNA or RNA onto gold or tungsten particles. Most such methods generally combine a predetermined amount of gold or tungsten with plasmid DNA, $CaCl_2$ and spermidine. The resulting solution is vortexed continually during the coating procedure to ensure uniformity of the reaction mixture. After precipitation of the nucleic acid, the coated particles can be transferred to suitable membranes and allowed to dry prior to use, coated onto surfaces of a sample module or cassette, or loaded into a delivery cassette for use in particular particle-mediated delivery instruments.

As an alternative, the polynucleotides of the invention can be formulated as a particulate composition. Formulation can be carried out using the above-described standard pharmaceutical formulation chemistries. For example, the polynucleotides can be combined with one or more pharmaceutically acceptable excipients or vehicles to provide a suitable composition. The formulated compositions are then prepared as particles using standard techniques such as by simple evaporation (air drying), vacuum drying, spray drying, freeze drying (lyophilisation), spray-freeze drying, spray coating, precipitation, supercritical fluid particle formulation, and the like. If desired, the resultant particles can be densified using the techniques described in commonly owned International Publication No. WO 97/48485, incorporated herein by reference.

These methods can be used to obtain nucleic acid particles having a size ranging from about 0.01 to about 250 μm, preferably about 10 to about 150 μm, and most preferably about 20 to about 60 μm; and a particle density ranging from about 0.1 to about 25 g/cm^3, and a bulk density of about 0.5 to about 3.0 g/cm^3, or greater.

Once formed, the particles comprising the nucleic acid molecules may be packaged in single unit dosages or multidose containers. The invention therefore also provides a dosage receptacle for a particle mediated delivery device comprising coated particles of the invention. Such containers may comprise an hermetically sealed container enclosing a suitable amount of the particles. The particles can be packaged as a sterile formulation, and the hermetically sealed container can thus be designed to preserve the sterility of the formulation until use in delivery to a subject. The containers are preferably adapted for direct use in a particle mediated delivery device. Typically such containers take the form of capsules, foil pouches, sachets, cassettes and the like. The particle delivery devices can also be provided in a preloaded condition containing a suitable dosage of the particles. The preloaded device may then also be prepackaged in a hermetically sealed container.

The container in which the particles are packaged can further be labelled to identify the composition and provide relevant dosage information. In addition, the container can be labelled with a notice in the form prescribed by a governmental agency, for example, the Food and Drug Administration, wherein the notice indicates approval by the agency under Federal Law of the manufacture, use or sale of the nucleic acid preparation contained therein for human administration.

The invention also provides a particle mediated delivery device loaded with coated particles of the invention. Prefereably, the delivery device is a needleless syringe. Particle acceleration devices, suitable for particle-mediated delivery are known in the art. For example, current gene gun devices employ an explosive, electric or gaseous discharge to propel coated carrier particles towards target cells. The coated carrier particles can be releasably attached to a movable carrier sheet, or removably attached to a surface along which a gas stream passes, lifting the particles from the surface and accelerating them toward the target. An example of a gaseous discharge device is described in U.S.Patent No. 5,204,253. An explosive-type device is described in U.S.Patent No. 4,945,050. One example of an electric discharge apparatus suitable for use herein is described in U.S.Patent No. 5,120,657. Another electric discharge apparatus is described in US Patent No 5,149,655. The disclosure of all of these patents is incorporated herein by reference in their entireties.

Particles may also be administered using a needleless syringe device, such as those described in U.S.Patent No. 5,630,796 to Bellhouse *et al* ("the PowderJect® needleless syringe device") and in International Publication Nos. WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513 and WO 96/20022, all of which are incorporated herein by reference.

Devices such as the one described in US Patent No.5,630,796 may be provided as a pen-shaped instrument containing, in linear order moving from top to bottom, a gas cylinder, a particle cassette or package, and a supersonic nozzle with an associated silencer medium. The particles are provided within a suitable container, e.g. a cassette formed by two rupturable polymer membranes that are heat-sealed to a washer-shaped spacer to form a self-contained sealed unit. Membrane materials can be selected to achieve a specific mode of opening and burst pressure that dictate the conditions at which the supersonic flow is initiated.

In operation, the device is actuated to release the compressed gas from the cylinder into an expansion chamber within the device. The released gas contacts the particle cassette and, when sufficient pressure is built up, suddenly breaches the cassette membranes sweeping the particles into the supersonic nozzle for subsequent delivery. The nozzle is designed to achieve a specific gas velocity and flow pattern to deliver a quantity of particles to a target surface of predefined area. The silencer is used to attenuate the noise produced by the supersonic gas flow.

The delivery system described in International Publication No. WO 96/20022 also uses the energy of a compressed gas source to accelerate and deliver powdered compositions. However, it is distinguished from the system of US Patent No. 5,630,796 in its use of a shock wave instead of gas flow to accelerate the particles. More particularly, an instantaneous pressure rise provided by a shock wave generated behind a flexible dome strikes the back of the dome, causing a sudden eversion of the flexible dome in the direction of a target surface. This sudden eversion catapults a powdered composition (which is located on the outside of the dome) at a sufficient velocity, thus momentum, to penetrate target tissue, e.g., oral mucosal tissue. The powdered composition is released at the point of full dome eversion. The dome also serves to completely contain the high-pressure gas flow which therefore does not come into contact with the tissue. Because the gas is not

released during this delivery operation, the system is inherently quiet. This design can be used in other enclosed or other wise sensitive applications for example, to deliver particles to minimally invasive surgical sites.

Particles may be delivered *in vivo* directly to a subject, or *ex vivo* to cells taken from a subject, the transformed cells then being reimplanted in the subject. For *in vivo* delivery, particle injection is typically subcutaneously, epidermally, intradermally, intramucosally (e.g. nasally, rectally and/or vaginally), intraperitoneally, intravenously, orally or intramuscularly. Preferably, delivery is to terminally differentiated cells; however, the particles can also be delivered to non-differentiated, or partially differentiated cells such as stem cells of blood and skin fibroblasts. Most preferably, delivery is to skin epidermal cells.

The particles are administered to a subject in a manner compatible with the dosage formulation and in an amount that will be prophylactically and/or therapeutically effective. A "therapeutically effective amount" of the present particulate compositions will be sufficient to bring about treatment or prevention of disease or condition symptoms, and will fall in a relatively broad range that can be determined by routine trials. Generally the particles are delivered in an amount of from 0.001 to 1000μg, more preferably 0.01 to 10.0μg of nucleic acid per dose. However, the exact amount necessary will vary depending on the age and general condition of the individual being treated and the particular nucleotide sequence selected, as well as other factors. An appropriate effective amount can be readily determined through clinical testing. The "Physicians Desk Reference" and "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" are useful for the purpose of determining the amount needed.

Assays

Comparative Expression Assay

A suitable test for element utility determines the effect the element has on expression of a polypeptide. In a preferred instance the polypeptide may be an influenza antigen, variant thereof or fragment of either. The basis of comparison for testing utility of the elements is a 'base vector', generally (unless otherwise noted) a

plasmid with a hCMV promoter, hCMV exon 1, 9 bases of hCMV exon 2, the 5' UTR from HBV preS2 and the rabbit beta-globin polyadenylation region, positioned to drive expression of a coding sequence. Typically, the base vector is pPJV7384, pPJV 7401, pPJV 7450 or pPJV7533. In some instances, any of the vectors mentioned herein with the above mentioned elements may be employed as a base vector. In one instance, pPJV1671 may be employed as a base vector. pPJV2012, pPJV7788 and pPML7789 may also be employed as base vectors.

The basic vector, heterologous introns and 3' UTRs are added, or promoter sequences, exons, 5' UTRs and polyA sites are swapped into the base vectors to create test expression vectors. Any of the elements of the vectors discussed herein may be swapped with a test sequence and compared with a base sequence. Thus, functional variants or fragments can be tested.

The base vectors and test vectors are transformed into suitable host cells and the cells analysed for polypeptide expression levels. Preferably mammalian host cells are used. Suitable cells include mammalian HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 or COS cells. In some instances, SSC15 or B16 cells may be employed.

Typically, a functional element causes expression which is comparable to the base vector, for example at least the same as or greater. Preferably expression is tested in more than one cell type and with more than one coding sequence. In some instances, a functional element may cause expression which is slightly less than the base vector such as, for instance, at least 25%, in particular at least 50%, preferably at least 60%, more preferably at least 70%, still more preferably at least 80%, even more preferably at least 90% and still more preferably at least 90% of the expression of the base vector. Typically, a variant or fragment of a particular element may still be considered to represent a functional variant or fragment of a particular element if it shows such levels of expression. However, preferably functional variants and fragments will give rise to higher expression than the base vector as discussed above. The percentage increase may, for instance, be any of the percentages mentioned above.

Suitable experimental protocols are provided, for example, in Examples 1 to 18 below.

Comparative Immunogenicity Assay

Where the polypeptide to be expressed is an antigen, a further test may be carried out to identify functional or particularly preferred construct elements. In particular, such a test may be carried out where the antigen is, for instance, an influenza antigen, fragment thereof or variant of either. In the assay, the effect of an element on immune response is determined after delivery of an expression vector to a test organism. Antibody levels against the antigen are the easiest way to judge immune response. Groups of mice are vaccinated with the base vectors or test vectors constructed as above. Sera is collected after an appropriate amount of time and analyzed for antibody levels.

This experiment is performed twice, and the antibody levels from all the groups in both experiments are plotted. Functional elements will typically give rise to at least as high as or higher antibody titres in both experiments for a particular antigen than the base vector. Preferably, the result will be seen with more than one antigen to demonstrate the breadth of utility of the element(s) in that expression panel. In some instances, a functional element may give rise to an antibody titre which is which is slightly less than that seen with the base vector such as, for instance, at least 25%, in particular at least 50%, preferably at least 60%, more preferably at least 70%, still more preferably at least 80%, even more preferably at least 90% and still more preferably at least 90% of the antibody titre seen with the base vector. Typically, a variant or fragment of a particular element may still be considered to represent a functional variant or fragment of a particular element if it give rises to such an antibody titre. However, preferably functional variants and fragments will give rise to high titres than the base vector as discussed above. The percentage increase may, for instance, be any of the percentages mentioned above.

Adjuvant vectors may also be assessed by comparison of a test adjuvant vector with a standard adjuvant with both being administered with the same antigen. A comparison of the adjuvant effect of both vectors is made using the antigen administered alone as a control. Any of the adjuvant vectors mentioned herein may be employed as a standard. The percentage increase or descrease in adjuvant effect may be any of those levels mentioned herein.

Suitable experimental protocols are provided for example, in Example 14 below. Suitable protocols are also described in Examples 15 to 18 below.

C. Experimental

Below are examples of specific embodiments for carrying out the present invention. The examples are offered for illustrative purposes only, and are not intended to limit the scope of the present invention in any way.

Efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (*e.g.*, amounts, temperatures, etc.), but some experimental error and deviation should, of course, be allowed for.

Methods

Standard PCR Conditions

The standard PCR conditions used for the construction of vectors were as follows: 1x PCR core buffer with 1.5mM $MgCl_2$ (Promega Corporation, Madison, WI), 0.400µM each of each primer, 200µM of each dNTP (USB, Inc, Cleveland, OH) , 2.5µ Taq polymerase (Promega Corporation, Madison, WI), 1.0 ng template DNA, water to 100µl, and a mineral oil (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI) overlay. The PTC-200 thermocycler (MJ Research, Inc, Waltham, MA) was programmed to run the following routine: 4'@95°C, 30 cycles of (1'@95°C/ 1'15"@55°C/ 1'@72°C), 10'@72°C, 4°C hold). The amplification products were removed from the PCR reaction by using the QIAquickâPCR Purification Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA) prior to cutting with restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, MA).

All PCR products were sequenced after cloning to ensure fidelity of the amplification.

Example 1. Construction of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) vector panels

A number of plasmid expression vectors were constructed for expression of HBsAg.

Starting materials

(i) pWRG7128 (Roy, M, *et.al. Vaccine* (2001) 19: 764-778), which contains the hCMV immediate early promoter sequence, the first exon, first intron, and a partial second exon of the hCMV major immediate early gene, the HBsAg coding sequence with flanking regions (HBV preS2 5'UTR derived sequence and 3' posttranscriptional response element) and the bovine growth hormone polyadenylation region (BGHpA)

(ii) pPJV7284, a derivative of pWRG7128 that exchanges the rabbit globin polyadenylation region (RBGpA) for BGHpA.

(a) pPJV7384 (CMV(no intron), HBV preS2 5' UTR and RBGpA)

pWRG7128 was PCR amplified with JF93 (SEQ ID NO:15) and F110 (SEQ ID NO:16) using standard conditions and cut with *Sal*1 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment containing the CMV promoter, exon 1 and part of the exon 2 sequence. pAM6 (ATCC, Mannassas, VA) was cut with *Bam*H1 and *Bst*X1 to isolate an insert fragment that contained the 5'-UTR of HBsAg, and roughly 70% of the HBsAg coding region. pJV7284 was cut with *Sal*1 and *Bst*X1 to generate a vector fragment into which the two insert fragments were ligated, resulting in pJV7293.

pWRG7128 was PCR amplified with primers GW1 (SEQ ID NO:17) and JF254 (SEQ ID NO:18) and cut with *Bst*X1 and *Bgl*2 to isolate an insert fragment that contained the 3'-end of the HBsAg coding region. pPJV7293 was cut with *Bst*X1 and *Bgl*2 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in vector pPJV7384.

(b) pPJV7382 (CMV(no intron), HBsAg 3' UTR, HBV preS2 5' UTR and RBGpA)

pPJV7293 was cut with *Xho*1 and *Xba*1 to generate an insert fragment containing the CMV promoter/exons and the 5'-UTR with 5'-end of the HBsAg coding sequence. pWRG7128 was cut with *Xba*1 and *Bcl*1 to generate an insert fragment containing the majority of the HBsAg coding sequence and the 3'-UTR.

pPJV7284 was cut with *Xho*1 and *Bgl*2 to generate a vector fragment into which the two insert fragments were ligated, resulting in pPJV7382.

(c) pPJV7389 (CMV (RIA), HBsAg 3' UTR, HBV preS2 5' UTR and RBGpA)

The rat insulin intron A (RIA) was PCR amplified out of plasmid p5'rIns with primers GW150 (SEQ ID NO:19) and JF255 (SEQ ID NO:20). The PCR product was cut with *Bam*H1 and inserted into *Bam*H1 linearized pPJV7382, resulting in pPJV7389.

(d) pPJV7387 (CMV(RIA), HBV preS2 5'UTR and RBGpA)

pPJV7384 was cut with *Bst*X1 and *Eco*R1 to generate an insert fragment containing the 3' end of the HBsAg coding region and RBGpA. pPJV7389 was cut with *Bst*X1 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7387.

Example 2. Construction of herpes simplex virus glycoprotein D antigen (HSVgD) vector panels

A number of plasmid expression vectors were constructed for expression of HSVgD.

Starting materials

(a) pPJV7334, a derivative of pWRG7284 (pPJV 7284) that replaces the HBsAg coding sequence with an in-frame *Nhe*1 directly downstream of the ATG start codon, followed by a stuffer fragment with a *Bam*H1 immediately 5' of the HBV Enh (Enhancer).

(b) pWRG7202, a derivative of pGem3Z (Promega) with a stuffer fragment that allows the fusion of a coding sequence to the human tissue plasminogen activator (TPA) signal peptide downstream of a *Nhe*1 site.

(a) pPJV7392(CMV(native intron), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5'UTR and RBGpA)

The coding region for HSV2 gD was PCR amplified out of a viral DNA stock (Advanced Biotech, Inc, Columbia, MD) using primers DS1 (SEQ ID NO:21) and DA1 (SEQ ID NO:22) and was cut with *Nhe*1 and *Eco*R1 to generate an insert fragment. pWRG7202 was cut with *Nhe*1 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7391.

pPJV7391 was cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to generate an insert fragment containing the HSV2 gD coding sequence. pPJV7334 was cut with *Nhe*1 and *Bam*H1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7392. This vector consists of the following expression elements: the hCMV immediate early promoter sequence, the first exon, first intron, and a partial second exon of the hCMV major immediate early gene, the 5'-UTR from HBsAg, the coding sequence for HSV2 gD gene, the 3'-UTR from HBsAg, and RBGpA.

(b) pPJV7399 (CMV(no intron), HBsAg 3' UTR HBsAg 5'UTR and RBGpA)

An intronless version of pPJV7392 was constructed as follows. pPJV7384 was cut with *HindIII* and *Nde*1 to isolate an insert fragment containing the 5' ends of the kanamycin resistance gene and the CMV promoter. pPJV7384 was cut with *Nde*1 and *Ssp*1 to isolate an insert fragment containing the 3' end of the CMV promoter, the CMV exon1/2 and 5' end of the 5'-UTR from HBsAg. These insert fragments were inserted into pPJV7392 from which the *Hind*3-*Ssp*1 fragment was removed, resulting in pPJV7399.

(c) pPJV7400 (CMV(RIA), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5'UTR and RBGpA)

A RIA version of pPJV7392 was constructed as follows. pPJV7384 was cut with *HindIII* and *Nde*1 to isolate an insert fragment containing the 5' ends of the kanamycin resistance gene and CMV promoter. pPJV7387 was cut with *Nde*1 and *Ssp*1 to isolate an insert fragment containing the 3' end of the CMV promoter, the CMV exon1/2(partial), RIA, and 5' end of the 5'-UTR from HBsAg. These insert fragments were inserted into pPJV7392 from which the *Hind*3-*Ssp*1 fragment was removed, resulting in pPJV7400.

(d) pPJV7401 (CMV(no intron), HBsAg 5'UTR and RBGpA)

A 3'-UTR-less version of pPJV7399 was constructed as follows. pPJV7391 was cut with *Bsp*120I and *Bgl*2 to isolate an insert fragment containing the 3' end of the HSV2 gD gene. pPJV7284 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to isolate the RBGpA signal. These insert fragments were inserted into pPJV7399 from which the *Bsp*120I-*Eco*R1 fragment was removed, resulting in pPJV7401.

(e) pPJV7402 (CMV(RIA), HBsAg 5'UTR and RBGpA)

A 3'-UTR-less version of pPJV7400 was constructed as follows. pPJV7391 was cut with *Bsp*120I and *Bgl*2 to isolate an insert fragment containing the 3' end of the HSV2 gD gene. pPJV7284 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to isolate the RBGpA signal. These insert fragments were ligated into pPJV7400 from which the *Bsp*120I-*Eco*R1 fragment was removed, resulting in pPJV7402.

Example 3. Construction of Flu M2 antigen vector panels

(a) pPJV7450 (CMV(no intron), HBsAg 5'UTR and RBGpA)

A coding region for Flu M2 was PCR amplified out of plasmid pFL-M2 (Joel Haynes, pPJV) using primers JF301 (SEQ ID NO:23) and JF302 (SEQ ID NO:24) and was cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to generate an insert fragment. pPJV7401 was cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7450.

(b) pPJV7452 (CMV(no intron), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5'UTR and RBGpA)

A 3' UTR fragment was PCR amplified out of pPJV7389 with primers JF84 (SEQ ID NO:25) and JF225 (SEQ ID NO:26) was cut with *Bsp*120I, filled with T4 DNA polymerase, and linkered with *Bgl*2 linkers (cat# 1036, New England Biolabs). The fragment was then cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to isolate an insert fragment containing the 3' UTR of HBsAg and the RBGpA region. pPJV7450 was cut with

*Bgl*2 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7452

(c) pPJV7458 (CMV(RIA) HBsAg 5' UTR and RBGpA)

A version of pPJV7450 containing the RIA was constructed as follows: pPJV7389 was cut with *Bam*H1 to isolate a RIA containing insert fragment. pPJV7450 was cut with *Bam*H1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7458.

(d) pPJV7468 (CMV(RIA), HBsAg 3' UTR ,HBsAg 5'UTR and RBGpA)

A version of pPJV7458 containing the 3' UTR of HBsAg was constructed as follows: pPJV7452 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to produce an insert fragment containing the HBsAg 3' UTR and RBGpA. pPJV7458 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7468.

Example 4. Construction of Beta-gal vector panels

(a) pPJV7488 (CMV(no intron), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5'UTR and RBGpA)

CMV-beta (Clontech) was PCR amplified with primers JF335 (SEQ ID NO:27) and JF336 (SEQ ID NO:28) and cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to isolate an insert fragment coding for beta-galactosidase. pPJV7452 was cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7488.

(b) pPJV7533 (CMV(no intron), HBsAg 5'UTR and RBGpA)

pPJV7450 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to isolate an insert fragment containing the RBGpA. pPJV7488 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7533.

(c) pPJV7551(CMV(RIA/*Nhe*I), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5'UTR and RBGpA)

pPJV7530 (see Example 5) was cut with *Xho*1 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment containing the CMV promoter through RIA. pPJV7488 was cut with *Xho*1 and *Bam*H1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7551.

(d) pPJV7552(CMV(RIA/*Nhe*I), HBsAg 5'UTR and RBGpA)

pPJV7530 was cut with *Xho*1 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment containing the CMV promoter through to the RIA. pPJV7533 was cut with *Xho*1 and *Bam*H1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7552.

Example 5. Construction of pPJV Expression (pPJV7563)

(a) pPJV7496

pPJV7389 was PCR amplified with primers JF357 (SEQ ID NO:29) and JF365 (SEQ ID NO: 30), treated with T4 DNA polymerase to blunt the ends, and cut with *Sal*1 to isolate an insert fragment coding for kanamycin resistance. pPJV7389 was cut with *Ava*1, treated with T4 DNA polymerase to blunt the ends, and cut with *Sal*1 to isolate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7496.

(b) pPJV7530

pPJV7389 was PCR amplified with primers JF393 (SEQ ID NO:31) and JF406 (SEQ ID NO:32) and cut with *Bgl*2 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment containing the RIA devoid of an internal *Nhe*1 site. pPJV7496 was cut with *Bam*H1 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7530.

(c) pPJV7549

pPJV7468 was cut with *Bam*H1 and *Eco*R5 to isolate an insert fragment containing M2 and part of the HBV 3' ENH. pPJV7530 was cut with *Bam*H1 and

*Eco*R5 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7549.

(d) pPJV7563

Primers JF256 (SEQ ID NO:33) and JF257 (SEQ ID NO:34) were annealed to prepare an insert fragment consisting of a multiple cloning site. pPJV7549 was cut Nhe1 and Bgl2 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7563. A pPJV7563 plasmid map is provided in Figure 12. The base composition for the pPJV7563 plasmid is provided in Figure 13. The components and their position in the plasmid pPJV7563 are as follows:

1-44	Transposon 903 sequences
45-860	Kanamycin resistance coding sequence from Transposon 903
861-896	Transposon 903 sequences
897-902	Sal1 site
903-1587	CMV promoter
1588-1718	untranslated leader sequence from the immediate-early gene of CMV
1719-1724	Fusion of BamH1 and BglII restriction enzymes
1725-1857	Rat insulin intron A
1858-1863	BamH1 site
1864-1984	HBV surface antigen 5'- untranslated leader
1985-1993	Synthetic start codon/ Nhe1 cloning site
1994-2011	Synthetic cloning sites
2012-2544	HBV enhancer
2545-2555	Old vector sequence. No hits against NCBI databases
2556-2686	Rabbit beta-globin polyadenylation region
2687-3759	pUC19 vector sequence

Example 6. Construction of Signal Peptide Expression Panels using Human Secreted Alkaline Phosphatse (SEAP) and Human IgG Fc Fragment (hFc) as Model Antigens

(i) pPJV7507 (hTPAsp and SEAP)

pSEAP-Basic (Clontech) was PCR amplified with primers JF320 (SEQ ID NO:35) and JF321 (SEQ ID NO:36) then cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to isolate an insert fragment consisting of the human SEAP fragment. pPJV7079 (Macklin, *et.al.*) was cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7507.

(ii) pPJV7508 (hTPAsp and hFc)

Human DNA was PCR amplified with primers JF386 (SEQ ID NO:37) and FcAS (SEQ ID NO:38) then cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to isolate an insert fragment consisting of the human IgG Fc fragment. pPJV7079 was cut with *Nhe*1 and *Bgl*2 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7508.

(iii) Preparation of Aprotinin Signal Peptide Coding Sequence

Synthetic oligo JF354 (SEQ ID NO:39) was PCR amplified with primers JF355 (SEQ ID NO:40) and JF356 (SEQ ID NO:41) to generate the coding sequence for the aprotinin signal peptide.

(iv) Preparation of Tobacco Extensin Signal Peptide Coding Sequence

Synthetic oligo JF348 (SEQ ID NO:42) was PCR amplified with primers JF349 (SEQ ID NO:43) and JF350 (SEQ ID NO:44) to generate the coding sequence for the tobacco extensin signal peptide.

(v) Preparation of Chicken Lysozyme Signal Peptide Coding Sequence

Synthetic oligo JF351 (SEQ ID NO:45) was PCR amplified with primers JF352 (SEQ ID NO:46) and JF353 (SEQ ID NO:47) to generate the coding sequence for the chicken lysozyme signal peptide.

(a) Flu M2 antigen signal peptide panels

pPJV7499 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA. aprotinin s.p.)

pPJV7497 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, tobacco extensin s.p.)

PPJV7500 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme s.p.)

Coding sequences for the signal peptides were cut with *Spe*1 and *Nhe*1 to isolate insert fragments. pPJV7450 was cut with *Nhe*1 to prepare a vector fragment into which the insert fragments were ligated, resulting in pPJV7499 (aprotinin), pPJV7497 (tobacco extensin), and pPJV7500 (chicken lysozyme).

(b) SEAP signal peptide panels

pPJV7513 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, aprotinin s.p.)

pPJV7512 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, tobacco extensin sp.)

pPJV7510 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme s.p.)

pPJV7499, 7497, and 7500 were cut with *Xho*1 and *Nhe*1 to isolate an insert fragment consisting of the CMV promoter through the signal peptide coding sequence of the plasmids. pPJV7507 was cut with *Xho*1 and *Nhe*1 to prepare a vector fragment into which the insert fragments were ligated, resulting in pPJV7513 (aprotinin), pPJV7512 (tobacco extensin), and pPJV7510 (chicken lysozyme).

(c) hFc signal peptide panels

pPJV7524 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, aprotinin s.p.)

pPJV7525 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, tobacco extensin s.p.)

pPJV7526 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme signal peptide)

pPJV7499, 7497, and 7500 were cut with *Xho*1 and *Nhe*1 to isolate an insert fragment consisting of the CMV promoter through the signal peptide coding sequence of the plasmids. pPJV7508 was cut with *Xho*1 and *Nhe*1 to prepare a vector fragment into which the insert fragments were ligated, resulting in pPJV7524 (aprotinin), pPJV7525 (tobacco extensin), and pPJV7526 (chicken lysozyme).

Example 7. Construction of Human Secreted Alkaline Phosphatase (SEAP) panels

(a) pPJV7531 (CMV(no intron), HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme s.p.)

pPJV7510 was cut with *Sal*1 and *Bgl*2 to isolate an insert fragment containing the CMV promoter through lysozyme signal peptide. pPJV7450 was cut with *Sal*1 and *Bgl*2 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7531.

(b) pPJV7554 (CMV(RIA/*Nhe*I), HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme s.p.)

pPJV7530 was cut with *Xho*1 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment containing the CMV promoter through RIA. pPJV7531 was cut with *Xho*1 and *Bam*H1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7554.

(c) pPJV7568 (CMV(no intron), HBsAg 3' UTR, HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme s.p.)

pPJV7563 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to isolate an insert fragment containing the HBV 3'-UTR and RBGpA. pPJV7531 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7568.

(d) pPJV7572 (CMV(RIA/*Nhe*I), HBsAg 3' UTR, HbsAg 5' UTR, RBGpA, chicken lysosyme s.p.)

pPJV7563 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to isolate an insert fragment containing the HBV 3' UTR and RBGpA. pPJV7554 was cut with *Bgl*2 and *Eco*R1 to generate a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7572.

Example 8. Construction of Beta-gal and HBsAg Vectors Using the Chicken Keratin and Chicken Cardiac Actin Introns

(a) pPJV7557 (Beta-gal, CMV(cA intron), HbsAg 3' UTR, HbsAg 5' UTR and RBGpA)

Chicken DNA was PCR amplified with primers JF430 (SEQ ID NO:48) and JF442 (SEQ ID NO:49) and cut with *Bgl*2 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment consisting of the intron and flanking exon sequences from chicken cardiac actin. pPJV7488 was cut with *Bam*H1 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7557.

(b) pPJV7558 (Beta-gal, CMV(cK intron), HbsAg 3' UTR, HbsAg 5' UTR and RBGpA)

Chicken DNA was PCR amplified with primers JF421 (SEQ ID NO:50) and JF444 (SEQ ID NO:51)and cut with *Bgl*2 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment consisting of the intron and flanking exon sequences from the chicken keratin gene. pPJV7488 was cut with *Bam*H1 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7558.

(c) pPJV7578 (HBsAg, CMV(cA intron), HbsAg 3' UTR, HbsAg 5' UTR and RBGpA)

pPJV7557 was cut with *Sal*1 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment consisting of the CMV promoter through intron regions. pPJV7496 was cut with *Sal*1 and *Bam*H1 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7558.

(d) pPJV7579 (HBsAg, CMV(cK intron), HbsAg 3' UTR, HbsAg 5' UTR and RBGpA)

pPJV7558 was cut with *Sal*1 and *Bam*H1 to isolate an insert fragment consisting of the CMV promoter through intron regions. pPJV7496 was cut with *Sal*1 and *Bam*H1 to prepare a vector fragment into which the insert fragment was ligated, resulting in pPJV7579.

Example 9. *In Vitro* Analysis of Antigen Expression by HBsAg Vector Panels

On day one, SCC15 (ATCC) or B16 (origin unknown, versions available at ATCC) cells were plated on 6 well tissue culture plates at 20-40% confluency, and allowed to grow overnight in an incubator. The host cells were propagated in media recommended by ATCC.

On day two, the transfection reaction was performed. For each vector to be tested, 20µl of Lipofectin® reagent (Life Technologies Inc, Grand Island, NY) was added to 180µl of Optimem® media (Life Technologies, Grand Island, NY), and allowed to incubate at room temperature for 45 minutes. For each vector to be tested, 2µg of vector was mixed into 200µl of Optimem® at 40 minutes. At 45 minutes, the vector and Lipofectin® solutions were mixed together and allowed to sit at room temperature for an additional 10 minutes. During this final incubation, the plated host cells were removed from the incubator and washed twice with Optimem® media. At 10 minutes, 1.6ml of Optimem® was added to the Lipofectin® / vector mix, and 1ml of the resultant mix was added to each of two cell wells. The host cells were returned to the incubator and allowed to sit undisturbed for 5 hours, at which point the Lipofectin®/vector mix was removed and replaced by standard cell maintenance media.

At 18 to 24 hours after the media change, from 50 to 100µl of cell maintenance media was removed from the tissue culture plates and analyzed for antigen expression by placing the samples into reaction vessels provided in the AUSZYME® Monoclonal Diagnostic Kit (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). The volume of the test samples was brought to a volume of 200µl with PBS, then 50µl of conjugate and a reaction bead were added to each sample. The vessel is incubated for 80 minutes at 40°C, after which the wells were washed clean of all liquid reaction components. The beads were transferred to new tubes after which 300µl of color development buffer was added. At 30 minutes, the color development reaction was stopped by the addition of 1M sulfuric acid, and the absorbance of the reaction was measured at 490nm. The data shown in Figure 1 is the average absorbance readings of the duplicate wells from two experiments.

As shown in Figure 1, the addition of RIA, the HBV 3' UTR or both elements to a base vector (CMV promoter, exon and polyadenylation region) increased the expression of HBsAg in SCC15 cells. As shown in Figure 2, the addition of either

the chicken keratin or the chicken cardiac actin intron to a base vector (CMV promoter, exon, HBV 3' UTR and polyadenylation region) increased expression of HBsAg in SCC15 cells.

Example 10. *In Vitro* Analysis of Antigen Expression by Beta-gal Vector Panels

SSC-15 or B16 host cells were transfected as described in Example 9.

At eighteen to fourty hours after the media change, the media supernatants were removed and the cells were washed with PBS. After removal of the wash, the cells were lysed by incubating the cells in 500µl lysis buffer (50mM $NaPO_4$, 0.1%Triton X-100, pH 7) for 5 minutes, followed by physically scraping the cells off the plastic dish. The lysates were microfuged for two minutes to remove cell debris, and 10 to 25µl of the cleared lysate were added to 500µl of reaction buffer (80ug/ml o-nitrophenyl galactopyranoside, 50mM $NaPO_4$, pH 7) and incubated at 37°C for 10 to 20 minutes. The reaction was stopped by the addition of 500µl of 1M Na_2CO_3 and read at 405 nm. Data is presented as the ratio of the expression of enhanced (containing an intron, HBVenh, or both) vector to a base vector.

The addition of RIA, the HBV 3' UTR or both elements to a base vector (CMV promoter, exon and polyadenylation region) increased the expression of beta-gal in both cell lines. The results for SCC15 cells are shown in Figure 3. Addition of either the chicken keratin or the chicken cardiac actin intron to a base vector (CMV promoter, exon, the HBV 3' UTR and polyadenylation region) increased the expression of beta-gal in both cell lines. Results for B16 cells are shown in Figure 2.

Example 11. *In Vitro* Analysis of Antigen Expression by HSV gD Vector Panel

SCC15 or B16 host cells were transfected as described in Example 9. Eighteen hours post transfection, plates were placed on ice for 15 minutes. Each well was then washed with 2 ml of PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD). Cells were fixed with 0.05% gluteraldehyde (Polysciences Inc, Warrington, PA) diluted in PBS and incubated for 30 minutes at room temperature. All subsequent incubations lasted 1 hour at room temperature and washes between each incubation were as

stated above. The plates were blocked with 2 ml of 5% dry milk (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) in PBS. Incubations with 1 ml of a 1:1000 dilution of anti-gD monoclonal (ABI, Columbia, MD) in 2% dry milk / PBS / 0.05% Tween-20® (Sigma, St. Louis, MO) and 1 ml of a 1:2500 dilution of goat anti-mouse HRP (KPL, Gaithersburg, MD) in PBS / 0.1% Tween-20® followed. Color was developed using 1 ml of TMB microwell substrate (BioFX, Owings Mills, MD). The reactions were stopped with 1M H_2SO_4, the liquid was transferred to plastic cuvettes and the optical density read at 450nm. Data is presented as the ratio of the expression of enhanced (containing an intron, HBVenh, or both) vector to a base vector.

Addition of RIA with or without the HBV 3' UTR to a base vector (CMV promoter, exon and polyadenylation region) increased the expression of HSV gD in both cell lines. Results for SC15 cells are shown in Figure 4.

Example 12. *In Vitro* Analysis of Antigen Expression by SEAP Vector Panels

SCC15 or B16 host cells were transfected as described in Example 9. At eighteen to forty hours after the media change, the media supernatants were removed and heated at 70°C for 30 minutes. 10 to 25 µl of the heat-inactivated supernatants were incubated for 5 minutes with 1/10th volume of 100mM l-homoarginine. 500 µl of alkaline phosphatase reaction buffer (cat # 172-1063, Bio-Rad, prepared according to instructions) were added to the lysates and incubated at 37°C for 10 to 20 minutes. The reaction was stopped by the addition of 500µl of 1M NaOH and read at 405 nm. Data is presented as the ratio of the expression of enhanced (containing an intron, HBVenh, or both) vector to a base vector, or the ratio of the expression of the experimental signal peptides to the human TPA signal peptide vector.

As shown in Figure 5, the addition of RIA, the HBV 3' UTR or both elements to a base vector (CMV promoter, exon and polyadenylation region) increased the expression of SEAP in B16 cells. Unexpectedly, only the addition of the HBV 3' UTR to a base vector (CMV promoter, exon and polyadenylation region) increased the expression of SEAP in SCC15 cells.

Addition of signal peptides from either bovine aprotinin, chicken lysozyme, or tobacco extensin to the N-terminus of mature SEAP allowed for efficient secretion

of SEAP into cell media supernatants of both cell lines. Results for B16 cells are shown in Figure 6.

Example 13. *In Vitro* Analysis of Antigen Expression by Human IgG Fc Fragment Signal Peptide Panel

SCC15 or B16 host cells were transfected as described in Example 9. The media supernatants were removed from eighteen to fourty hours after the media change.

ELISA plates (Costar) were incubated overnight at 4°C with 100 µl of goat anti-human IgG (Sigma #I3382, 1/1000 dilution in carbonate coating buffer) per well. All subsequent incubations lasted 1 hour at room temperature with washes (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Brij-35, pH8.0) between each incubation. The wells were then blocked with 100µl of 5% dry in PBS, followed by incubation with serially diluted media supernatants in dilution buffer (2% dry milk, PBS, 0.05% Tween-20®). This was followed by incubation with with 100 µl of goat anti-human IgG/HRP (Sigma #A6029, 1/5000 dilution in dilution buffer) per well, followed by color development using 100µl of TMB microwell substrate. The reactions were stopped with 100µl of 1M H_2SO_4, and read at 450 nm. Data is presented as the ratio of the expression of the experimental signal peptides to the human TPA signal peptide vector.

Addition of signal peptides from either bovine aprotinin, chicken lysozyme, or tobacco extensin to the N-terminus of the human Fc fragment allowed for efficient secretion of hFc into cell media supernatants of both cell lines. Results for B16 cells are shown in Figure 6.

Example 14. Use of the HBsAg, HSVgD and Flu-M2 plasmid expression vectors for immunisation of mice

(a) Preparation of cartridges of immunization

For each plasmid to be tested, 25mg of 2 micron gold powder was

weighed into a microfuge tube. After the addition of a 250µl aliquot of 50 mM spermidine (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI), the tube was vortexed and briefly sonicated. The gold was microfuged out, and the spermidine replaced by a fresh 100µl aliquot. The gold was resuspended by vortexing, after which 25µg of DNA was added to the tube and mixed. While the tube was lightly vortexed, 100µl of 10% $CaCl_2$ (Fujisawa USA, Inc, Deerfield, IL) was added to precipitate the DNA onto the gold beads. The precipitation reaction was allowed to proceed for 10 minutes on the benchtop, after which the gold was collected by a brief microfuge spin and washed three times with absolute ethanol (Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) to remove excess precipitation reagents. The washed gold/DNA complex was then resuspended in 3.6 ml of 0.05 mg/ml polyvinylpyrrolidone (360KD, Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) in absolute ethanol. This slurry was then injected into a Tefzelâ tube (McMaster-Carr, Chicago, IL) located in a tube turner (PowderJect Vaccines) which coats the inside of the Tefzelâ tube with the gold/DNA complex. After the tube turning procedure was completed, the tube was cut into 0.5" "shots" of vaccine which were loaded into the XR1 device (PowderJect Vaccines) for delivery to the mice.

(b) Vaccination Procedure

Four to six week old mice were anesthetized with a mixture of Ketasetâ (Fort Dodge) and Rompunâ (Bayer). The bellies were shaved with a pair of electric clippers to remove hair, and two non-overlapping "shots" of vaccine were delivered via the XR1 device (450psi) to the shaved area. The animals were returned to their cages and bled at six weeks post vaccination. Balb/c mice were used to evaluate the HBsAg expression vectors, and Swiss Webster mice were used to evaluate the HSV-gD and Flu M2 expression vectors.

Analysis of Sera for Anti-HBsAg Antibodies

At six weeks, blood samples were harvested from vaccinated animals. A volume of serum isolated from these samples was placed into wells of a reaction vessel supplied with the AUSAB® EIA Diagnostic Kit (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). The volume of sera added depended upon the antibody titer of the sample,

and the sample was diluted with sample dilution buffer to fall within values obtainable with a quantification panel panel. 200µl from each vial of the AUSAB® Quantification Panel (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) was added to wells of the reaction vessel. To each well a bead was added, after which the vessel was sealed and incubated for two hours at 40°C. The wells were then washed of all liquid reaction components. To each washed well was added 200µl of conjugate mix, after which the vessel was sealed and incubated for two hours at 40°C. The wells were then washed of all liquid reaction components. The beads were transferred to new tubes after which 300µl of color development buffer was added. At 30 minutes, the color development reaction was stopped by the addition of 1M sulfuric acid, and the absorbance of the reactions was measured at 490nm in a Quantum II® spectrophotometer (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). This spectrophotometer calculates the antibody levels of a sample by comparing the absorbance of the sample with a standard curve generated with the quantification panel. These antibody levels were then corrected for dilution factors. The data shown in Figure 7 are the geometric mean titers of all animals vaccinated with a particular vector.

Analysis of Sera for Anti-Flu M2 Antigen Antibodies

96-well Costar medium-binding ELISA plates (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) were coated with a synthetic Flu M2 peptide (QCB/Biosource, Hopkinton, MA) at a concentration of 1ug/ml in PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) and incubated overnight at 4°C. The plates were washed three times with 10mM Tris (Sigma, St. Louis, MO)/150mM NaCl (Fisher Scientific)/0.1% Brij-35 (Sigma), then blocked with 5% dry milk (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) in PBS for 1 hour at room temperature. All subsequent incubations were at room temperature for one hour and washes between each incubation were as stated above. Sample mouse sera, a standard (high titer, anti-M2 mouse sera) and a negative control (anti-HBsAg mouse sera) were diluted in 2% dry milk/PBS/0.05% Tween-20® (Sigma) and incubated in the ELISA plates. Goat anti-mouse IgG (H+L) biotin conjugated antibody (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL) diluted 1:8000 in 2% dry milk/ PBS/0.05% Tween-20® and streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Southern Biotechnology) diluted 1:8000 in PBS/0.1% Tween-20 followed. Color was

developed using TMB substrate (BioFX, Owings Mills, MD). The reactions were stopped with 1M H_2SO_4 and the plates read at 450nm with an Emax precision microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). SoftMax Pro 4.1 software (Molecular Devices) was used to calculate endpoint titers using a four-parameter analysis. Titers were normalized to the standard serum, which had a pre-determined titer, to minimize assay-to-assay and plate-to-plate variation. Results are shown in Figure 7.

Analysis of Sera for Anti-HSV gD Antigen Antibodies

96-well Costar medium-binding ELISA plates (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) were coated with HSV gD (Viral Therapeutics, Ithaca, NY) protein at a concentration of 1ug/ml in PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) and incubated overnight at 4°C. The plates were washed three times with 10mM Tris (Sigma, St. Louis, MO)/150mM NaCl (Fisher Scientific)/0.1% Brij-35 (Sigma), then blocked with 5% dry milk (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) in PBS for 1 hour at room temperature. All subsequent incubations were at room temperature for one hour and washes between each incubation were as stated above. Sample mouse sera, a standard (high titer, anti-gD mouse sera) and a negative control (anti HBsAg mouse sera) were diluted in 2% dry milk/PBS/0.05% Tween-20 (Sigma) and incubated in the ELISA plates. Goat anti-mouse IgG (H+L) biotin conjugated antibody (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL) diluted 1:8000 in 2% dry milk/PBS/0.05% Tween-20 and streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Southern Biotechnology) diluted 1:8000 in PBS/0.1% Tween-20 followed. Color was developed using TMB substrate (BioFX, Owings Mills, MD). The reactions were stopped with 1M H_2SO_4 and the plates read at 450nm with an Emax precision microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). SoftMax Pro 4.1 software (Molecular Devices) was used to calculate endpoint titers using a four-parameter analysis. Titers were normalized to the standard serum, which had a pre-determined titer, to minimize assay-to-assay and plate-to-plate variation. Results are shown in Figure 7.

Example 15. Construction of Plasmid pPJV1671, Influenza DNA Vaccine Vector

Plasmid pPJV1671 was constructed which encodes and can express the Hemagglutinin (HA) antigen of influenza A/Panama/2007/99 (H3N2).

Construction of pPJV1671 is best described in three major stages:

(i) Cloning the expression gene;

(ii) Engineering the vector backbone; and

(iii) Engineering the final plasmid.

Cloning the Expression Gene

The coding sequence for influenza HA was obtained by a standard reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) cloning technique using a sample of A/Panama/2007/99 virus obtained from the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, GA) as a source of template ribonucleic acid (RNA).

The following steps were employed in cloning the expression gene, HA:

- RT-PCR production of dsDNA fragment of RNA segment 4 of A/Panama/2007/99 (H3N2);
- propagation of RNA segment 4 DNA clone in a standard pUC19-based vector in *E. coli*;
- sequence analysis of the H3 Panama HA coding sequence within the RNA segment 4 clone; and
- a second PCR reaction to generate a DNA fragment containing the H3 Panama HA coding sequence (without its ATG codon) with ends compatible with the pPJV7563 DNA vaccine "empty" vector (Nhe I and Bsp 120I).

Engineering the Vector Backbone, pPJV7563

The plasmid backbone for pPJV1671 is pPJV7563. The majority of the plasmid backbone sequences in pPJV7563 are also found in pWRG7128, a DNA vaccine vector that has been evaluated in several human clinical trials. This section provides a synopsis of the construction of pPJV7563. A detailed flowchart is

provided in Figure 14 of the construction of pPJV7563 and pPJV1671, and a tabular comparison below (Table 2) of key elements in plasmids pWRG7128 and pPJV1671 is provided. The map of pPJV1671 is shown in Figure 16.

Table 2

Comparison of Key Elements in Vector Backbones:

Plasmids WRG7128 (HBsAg) and pPJV1671 (Influenza HA)

Description of Change	Reason or Purpose for the Change	Biological Effect or Significance or Possible Effect of the Change
The kanamycin resistance gene fragment in pPJV1671 is 354 bases smaller than that used in pWRG7128.	To remove extraneous sequences from vector	No negative change to vaccine effectiveness or safety foreseen
The Sph1-Pst1 linker upstream of the CMV promoter in pWRG7128 was removed.	To remove extraneous sequences from vector. Allows these restriction sites to be more effectively utilized in constructing future vaccines.	No negative change to vaccine effectiveness or safety foreseen
The intron A from CMV was removed and in pPJV1671, the CMV exon1 has been fused to the remaining 9 bases of CMV exon2.	The CMV exons were fused to recreate 5'-UTR of spliced pWRG7128 transcript.	Fusion of the CMV exons should not change vaccine effectiveness or safety profile.
The intron A from the rat insulin gene has been inserted between the fused CMV exons and the 5'-UTR of HBsAg.	To replace the CMV intron A sequence with a functional alternative.	The addition of the rat insulin intron A to vaccine vectors has been shown to increase antigen expression and subsequent antibody responses.
The polyadenylation region has been changed from bovine growth hormone to rabbit beta-globin.	To employ an alternative polyadenylation signal	No negative change to vaccine effectiveness or safety foreseen.

Engineering the Final Plasmid, pPJV1671

Two major steps were involved in engineering the final plasmid, pPJV1671, from the backbone, pPJV7563 (as illustrated in Figure 14) these are:

- deletion of the Nhe1-Bgl II site from pPJV7563; and
- insertion of the H3 Panama HA coding sequence into pPJV7563 yielding the final pPJV1671, H3 Panama HA DNA vaccine vector.

A complete sequence analysis of pPJV1671 confirmed all vector backbone and HA coding sequences that are listed below in Table 3.

Comparison of pWRG7128 and pPJV1671

The major differences in the vector backbones between the clinically tested pWRG7128 encoding HBsAg and the influenza vaccine pPJV1671 vector encoding H3 Panama HA are shown above in Table 2. These include use of the rat insulin intron A in place of the human Cytomegalovirus (hCMV) intron A element and use of the rabbit β-globin polyadenylation sequence in place of the bovine growth hormone polyadenylation sequence. Extensive animal studies with pPJV1671 described have demonstrated good influenza DNA vaccine performance in both small and large animals. Plasmid pPJV1671 also performs well in humans following PMED of this DNA vaccine as discussed below in Example 16.

Feature and Functional Map of pPJV1671

The functional map of pPJV1671 is shown in Figure 16. The features of this map are listed in Table 3. Plasmid pPJV1671 employs the hCMV immediate early promoter and 5' noncoding sequences from exons 1 and 2. This promoter is linked to the rat insulin intron A and the 5' UTR of the HBV pre-S2 gene. Translation of the H3 Panama HA coding sequence begins at an ATG codon that is fixed in the vector in the context of a consensus Kozak translation initiation sequence. The HA coding sequence is followed by a transcriptional enhancer of HBV (HBVenh). Finally, transcription termination is facilitated by a rabbit β-globin polyadenylation site.

Because the natural ATG translation initiation codon of the HA gene of A/Panama/2007/99 (H3N2) does not conform to the Kozak consensus sequence for translation initiation, it was elected to use the ATG element supplied by pPJV7563

DNA vaccine vector for translation initiation. Antigen expression from DNA vaccine vectors is enhanced using ATG codons that conform to the Kozak consensus. Use of the vector-supplied ATG codon (via insertion at the Nhe I site) results in a minor 2-amino acid insertion at the amino terminus of the coding sequence of the HA gene as depicted in Figure 16.

Origin of Nucleotide Sequences in pPJV1671

The detailed construction history and sequencing reports for pPJV1671 allows for assignment of the origin of all nucleotide positions within this plasmid. BLAST alignments between vector component sequences and the GenBank database were performed to verify that correct component assignments have indeed been made.

Table 3

Identification of Components Comprising Plasmid pPJV1671

Base Numbers	Component Identification
1-896	Kanamycin resistance gene, flanked by tn903 sequences (Tn903, pUC4K remanants 1-44 and 861-896)
897-902	Sal 1 cloning site/pUC 19 MCS
903-1587	CMV promoter
1588-1718	CMV exon 1/ 2 fusion
1719-1724	BamH1/ Bgl2 fusion
1725-1857	Rat insulin intron A
1858-1863	BamH1 cloning site
1864-1984	Non-coding preS2 region of HbsAg
1985-1987	ATG initiation codon
1988-1993	Nhe1 cloning site
1994-3688	H3N2 HA coding sequence
3689-3691	Stop codon
3692	G nucleotide from H3 Panama 3' UTR
3693-3698	Bsp 120I cloning site
3699-4231	HBV enhancer
4232-4242	Cloning artifact. Unknown origin
4243-4373	Rabbit beta-globin polyadenylation region
4374-4379	EcoR1 cloning site
4380-5446	PUC19 vector

Sequence of pPJV1671 (Master Cell Bank)

Sequencing was performed by the PowderJect Research Department using Qiagen Megaprep DNA prepared from the newly constructed pPJV1671 plasmid. Actual sequence data were in 100% agreement with the theoretical sequence predicted for pPJV1671. Sequencing during the manufacturing process also showed that the plasmid sequence was also in 100% agreement with the theoretical and research sequences. The various plasmid elements and positions in the sequence are provided in Table 3 above.

Example 16. Nonclinical evaluation of pPJV1671: Immunogenicity of the Monovalent Influenza DNA Vaccine pPJV1671 in a Large Animal Model

The domestic pig model was used to investigate the immunogenicity of pPJV1671 the generation of which is described above in Example 15. Eight-week old domestic white pigs (barrows and gilts) were utilized in this study. Hemagluttination inhibition (HI) antibody titers were measured for candidate study animals and were <1:10 for all animals entered in the study.

Two groups of 8 animals each were vaccinated by PMED of the pPJV1671 DNA vaccine. Both groups received primary and booster immunizations spaced 4 weeks apart. Each immunization consisted of two side-by-side administrations to skin. The DNA vaccine dose for each administration was 1 μg DNA condensed onto the surface of 0.5 mg gold particles. The DNA vaccine was delivered with the XR-1 clinical and research devices operated at 500 psi helium pressure.

Pigs, were vaccinated on Day 0, boosted on Day 28 and bled on Day 42, two weeks after the booster vaccination. Sera were tested for HI antibody responses using a standard HI assay. Results of this study are shown in Figure 17 and demonstrate that the pPJV1671 DNA vaccine induced significant HI antibody titers in 100% of the test animals with mean HI antibody titers well in excess of the 1:40 surrogate HI antibody titer for protection against influenza in humans.

Example 17. Clinical trial assessing influenza DNA vaccine construct in humans

Introduction

A phase I dose escalating clinical study was carried out to evaluate safety and immunogenicity of the pPJV1671 DNA vaccine which is a monovalent PMED influenza DNA vaccine containing the HA (hemagglutinin) gene from A/Panama/2007/99 (H3N2). Safety was assessed by monitoring local and systemic adverse events from vaccination until study completion. Immunogenicity was assessed by measuring serum hemagglutination-inhibiting (HI) antibody levels.

Three groups of 12 healthy adult subjects received a single dose on day 0 of either 1, 2 or 4 μg of DNA vaccine, delivered as 1, 2 or 4 PMED administrations. The PMED influenza DNA vaccine elicited serum hemagglutination-inhibition (HI) antibody responses at all 3 dose levels, with the highest and most consistent responses in subjects vaccinated with the highest dose level. Antibody responses were greatest at the last time point tested, day 56. Treatment-related reactogenicity was limited to mild to moderate skin reactions at the vaccine site, which were primarily self-limiting. These results provide an indication of the safety and immunogenicity of the DNA vaccine for influenza generated.

Materials and Methods

Vaccine and delivery system

For the clinical plasmid, the HA coding sequence was obtained by a standard reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) cloning technique using a sample of A/Panama/2007/99 virus as a source of template RNA (virus was a gift of J. Katz, Centers for Disease Control and Prevention). The H3 Panama HA coding sequence was inserted into the pPJV7563 vector as described above in Example 15 yielding the final pPJV1671 H3 Panama HA DNA vaccine vector. Complete sequence analysis of pPJV1671 confirmed all vector backbone and HA coding sequences.

Plasmid pPJV1671 was manufactured under good manufacturing practices at Strathman GmbH (Hannover, Germany). The plasmid DNA was coated on 1 – 3 μm gold particles, and formulated for PMED using the PowderJect XR-1 device, using

previously described methods (Roy *et al.*, (2001) Vaccine 19:764-78). Each dose contained a nominal value of 1μg DNA coated on 0.5 mg gold. Vaccine quality parameters analyzed included quantity of gold and DNA, *in vitro* expression, immunopotency in mice, and absence of bioburden and endotoxin.

Patient population and setting

The clinical phase of the study was conducted at MDS Pharma Services, Lincoln, NE, and was approved by the local Institutional Review Board. Thirty-six (36) adult volunteers were enrolled (Table 4).

Table 4: Demographics of the study population

	Group 1	Group 2	Group 3
Number per group	12	12	12
Mean age (years)	31	31	32
Age range (years)	20-48	20-50	21-49
Male:Female	7:5	4:8	5:7
Prevaccination HAI GMT (range)	16 (5-40)	17 (5-40)	12 (5-40)

Subjects were considered eligible if they were healthy, age 19-50, not pregnant or lactating, able to provide written Informed Consent, and with prevaccination hemagglutination inhibition (HI) titers to influenza A/Panama of ≥10 and ≤ 40.

Reasons for exclusion included immunosuppressive therapy in the last 6 months, history of skin disease, scarring, moles, cuts or tattoos at the site of immunization, allergy to gold, history of chrysotherapy, receipt of influenza vaccine in the past 12 months, influenza-like symptoms or diagnosed influenza in the current season, or presence of any medical condition where influenza vaccination is not recommended.

All subjects completed the study and were evaluated for safety and immunogenicity, with the exception of two subjects. One subject was lost to follow-up and another subject was non-compliant. However, as all 36 subjects provided a

pre-vaccination sample, received vaccination, and were evaluated at least once post-vaccination for safety and immunogenicity, data were available for evaluation of safety and immunogenicity on all subjects. All study procedures were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975, with the latest amendments Edinburgh, Scotland (2000) and the International Conference on Harmonization guidelines on Good Clinical Practice (Step 4, 1 May 1996).

Clinical Study Design

Subjects were assigned to three treatment groups, 12 per group, on a sequential basis. Each PMED DNA vaccine administration delivered 1μg DNA, plasmid pPJV1671 (H3 Panama) on 0.5mg gold. The first group received a single vaccine administration on the inner aspect of the upper arm on day 0. Subjects in group 2 received two vaccine immunizations on day 0, for a total of 2 μg DNA, administered to adjacent sites on the inner upper arm. Subjects in group 3 received 4 administrations on day 4, for a total of 4 μg DNA. Vaccines were administered using the PowderJect XR-1 device at a helium pressure of 500 psi, a pressure shown to be well tolerated in earlier studies (Roy *et al.* (2001) *Supra*, Rottinghaus *et al.* (2003) Vaccine 21(31):4604-8 and Tacket *et al.* (1999) Vaccines 17(22):2826-9).

Clinical Safety and Immunogenicity Evaluations

Safety was assessed by monitoring vaccination site reactions and recording the incidence of local and systemic adverse events during the study. All subjects were evaluated for vaccine safety and local tolerability at the time of immunization, 1 hour and 2 hours post-immunization. Subjects were further evaluated for local tolerability on days 3, 7, 14, 21, 28, 56, and 180. Systemic adverse events were monitored by physical examination, vital signs, laboratory safety tests, and anti double-stranded DNA antibody testing. These tests were conducted prior to and after immunization.

Immunogenicity of each vaccine was determined by collecting blood samples on day 0 (pre-immunization), and at 14, 21, and 56 days post-immunization for determination of HAI titers against A/Panama/2007/99, using a modification of a previously described method (Kendal, *et al* (1982) Concepts and procedures for

laboratory-based influenza surveillance. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control: B17-35).

Clinical data analysis

Safety data were tabulated. Each HI titer was reported as the geometric mean (GMT) of two independent determinations, which usually yielded the same or similar results. A titer of 5 was assigned if the sample had a titer below 10, the detection limit of the assay. For each group, the GMT at each time point and 95% Confidence Interval (CI) were calculated using logarithmically transformed titers. For each time point, the GMT ratio from baseline for each dosage group was compared by chi-square test using procedure CATMOD in SAS. Differences in the GMT among the three groups were also compared.

Seroconversion rate (percent subjects with ≥4-fold increases in HAI titer over the pre-immunization titer), and the seroprotection rate (the proportion of subjects achieving a post-immunization titer ≥40) were calculated and compared between groups by chi-square test using procedure CATMOD in SAS for comparing % responder with logit response link function.

Results

Safety and Reactogenicity

Local reactions were assessed for all 84 vaccine administration sites (Figure 18). The local skin reaction scores from all three groups (84 total vaccination sites) were averaged. Skin reactions were scored according to the following criteria:

- Erythema: 0 = none; 1 = red blush; 2 = mild sunburn; 3 = beet red.
- Edema: 0 = none; 1 = barely thicker; 2 = notably thicker; 3 = large firm hive.
- Discoloration: 0 = none; 1 = barely seen; 2 = notably discolored; 3 = brownish shoe polish.
- Flaking: 0 = none; 1 = like fine white dandruff; 2 = peeling like sunburn; 3 = thicker, yellow, crusty.
- Itch/discomfort: 0 = none; 1 = mildly itchy or slightly sore upon touch; 2 = moderately itchy or sore

As expected based on previous studies (Roy *et al.* (2001), Rottinghaus *et al.* (2003) and Tacket *et al.* (1999) all *supra*), the subjects experienced local dermal reactions, however no local reactions in the severe (score = 3) range occurred. There was no recorded bleeding or skin damage. The typical local reaction was characterized by mild to moderate erythema, edema, and skin discoloration, and occasionally itch/discomfort, followed by mild superficial skin flaking.

Infrequent local reactions included petechiae (2/84 sites), minor bruising (2/84 sites) and small scabs (15/84 sites). While edema generally resolved by 14 days post-vaccination, erythema and skin discoloration persisted through 28 days. Of the 84 total vaccination sites, mild skin discoloration was still present in 30 at 56 days and 21 at 180 days post-vaccination. One subject also had detectable bruising at 2 sites at Day 180.

Systemic adverse events observed during the study were mild and considered unrelated to the treatment. Events reported from 7 to 56 days post-immunization included headache (11 events in 10 subjects), fatigue (4 events in 3 subjects), myalgia (3 events in 1 subject), fever (2 events in 2 subjects), cold feeling in the hand (2 events in 2 subjects), back pain (2 events in 1 subject) and nausea, arthralgia, muscle tightness, shivering, intermittent hypertension, and intermittent hypotension (1 event each in 1 subject). No anti-double stranded DNA antibodies were detected. Overall the local and systemic adverse event profile for all study groups provided an indication of the safety of influenza DNA vaccine delivered by PMED.

Antibody responses

Subjects were pre-screened for HI titer to Influenza A/Panama of ≥10 and ≤40, yet some subjects had titers of ≤10 on the day of vaccination. Baseline HI titers were all <40, and there were no significant differences in baseline titers among groups (p=0.439; see Table 4 above).

Immunization resulted in significant rises in the geometric mean titers (GMT) at all time points in all three groups (as shown in Table 5 below).

Table 5:

Serum antibody responses, seroconversion and seroprotection rate

Group	Day	Seroconversion[a] (%)	Seroprotection[b] (%)	Mean GMT increase (fold)
1	0	-	17 (2/12)	-
	14	8 (1/12)	42 (5/12)	1.4
	21	17 (2/12)	33 (4/12)	1.7
	56	33 (4/12)	58 (7/12)	**2.8**[c]
2	0	-	33 (4/12)	-
	14	17 (2/12)	50 (6/12)	1.7
	21	8 (1/12)	58 (7/12)	2.1
	56	**67 (8/12)**	**92 (11/12)**	**3.9**
3	0	-	8 (1/12)	-
	14	17 (2/12)	25 (3/12)	1.8
	21	33 (4/12)	67 (8/12)	**3.4**
	56	**64 (7/11)**	**100 (11/11)**	**8.1**

a Seroconversion is defined as either a negative pre-vaccination titer (≤10) to a post-vaccination titer ≥40, or a significant increase in antibody titer, i.e. at least a fourfold increase between pre-and post-vaccination titers where the pre-vaccination titer is ≥10

b Seroprotection rate is defined as the proportion of subjects achieving a post-immunization titer ≥40

c Values meeting CPMP criteria are bold

Although there was a trend toward higher HI titers and higher % seroconversion in a dose-response fashion, there were no statistical differences in GMT, % seroprotection or % seroconversion among the three groups. For all three vaccine dose levels, GMT, % seroconversion and % seroprotection increased as a function of time post-vaccination, with the highest titers on day 56 (see Table 5). In group 1, 33% of subjects had seroconverted by day 56, with 58% achieving seroprotective HAI titers, and a GMP increase of 2.8-fold. In group 2, the seroconversion rate at day 56 was 67%, with 92% of subjects seroprotected and a

GMT increase of 3.9-fold. The highest and most consistent titers were observed for group 3 at day 56, where 100% seroprotection was observed, and GMT increased 8.1 fold over baseline. In that group, seroconversion was less than 100%, because some seroprotected subjects did not show a ≥4 fold increase in titer, due to relatively high baseline HAI titers.

Discussion

The work described in the present Example provides the first successful generation of an anti-influenza antibody response that is predicted to be effective for influenza prophylaxis.

Immunological analysis demonstrated that all dose levels produced anti-influenza antibody responses. Comparison against the CPMP (Committee for Proprietary Medical Products) guidelines for licensing of annual flu vaccines showed that the 1μg dose group achieved the criteria on day 56 on Geometirc Mean Titre (GMT), the 2μg dose group achieved the criteria on day 56 on all three criteria (seroconversion, seroprotectio and GMT) and the 4μg dose group achieved the criteria on day 21 through GMT and on day 56 on all three criteria.

A total of 320 treatment-emergent adverse events (AEs), including the vaccine site reactions, were reported by 34 (94%) of the 36 subjects dosed. There was 1 SAE reported during the study – a foot fracture – considered unlikely to be related to study vaccine. Seven (7) subjects experienced FDA-reportable AEs that were all considered unlikely to be related to study vaccine. The majority (71%) of the AEs were mild in severity. The most common AE reported was headache (53% of all subjects). No subjects discontinued the study due to an AE. A total of 89 vaccination site-related AEs were reported by 27 of the 36 subjects dosed with mild application site pain being the most common local AE, reported by 12 subjects (33%). No measures of local reactogenicity were assessed as Grade 3 (severe) and therefore considered adverse events. Typical vaccination site reactions include redness/erythema, edema, flaking, discoloration and crust/scab formation.

In conclusion administration of pPJV1671 was well tolerated in all subjects, and elicited potent anti-influenza antibody responses. The top dose of 4μg met the criteria at 21 days laid down by the CPMP for licensing of annual flu vaccines.

Example 18. Non-clinical evaluation of trivalent DNA vaccine in pigs.

Three DNA vaccine vectors encoding the HA molecules of the three 2001-2002 influenza vaccine strains were constructed to evaluate the immunogenicity of a candidate human trivalent influenza DNA vaccine in a relevant animal model. Historically, the domestic pig has been used as a model for PMED DNA vaccines in humans due to the close similarities in the architectures of human and pig skin. The relevance of the pig model as a predictor of PMED DNA vaccine performance in humans has been demonstrated by a phase I human clinical trial of a hepatitis B surface antigen DNA vaccine in which good vaccine performance in pigs was mirrored in humans.

Samples of three 2001-2002 human influenza vaccine strains (A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), and B/Victoria/5/00) were obtained from the Centers for Disease Control (CDC) and used in reverse transcriptase / polymerase chain reaction (RT-PCR) experiments to generate DNA fragments encoding the corresponding HA antigens. The following steps were employed in developing the final three HA DNA vaccine vectors:

- RT-PCR production of dsDNA fragments of RNA segment #4 of A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), and B/Victoria/5/00.
- Propagation of RNA segment #4 DNA clones in a standard pUC19-based vector in E. coli.
- Sequence analysis of the HA coding sequence within the RNA segment #4 clones.
- A second series of PCR reactions (based on actual HA gene sequence data) to generate DNA fragments from each virus containing the HA coding sequence (without ATG codons) with ends compatible with the pPJV7563 DNA vaccine expression vector (Nhe I and Bsp 120I).
- Insertion of the three HA coding sequence fragments into the clinical DNA vaccine vector pPJV7563 yielding the final three DNA vaccine vectors.

- Sequence analysis of HA coding sequences in all three vectors confirming that no mutations had occurred.

The resultant vectors employ chimeric promoters of the invention. Thus, the vectors employ the human cytomegalovirus (hCMV) immediate early promoter and 5' noncoding sequences from immediate early exons 1 and 2. This promoter is linked to the rat insulin intron A and the 5' untranslated region (UTR) of the hepatitis B virus (HBV) pre-S2 gene. Translation of the HA coding sequence begins at an ATG codon that is fixed in the vector in the context of a consensus Kozak translation initiation sequence. The HA coding sequence is followed by a transcriptional enhancer of HBV (HBVenh). Finally, transcription termination is facilitated by a rabbit β-globin polyadenylation site.

As the natural ATG translation initiation codons of HA genes do not conform to the Kozak consensus sequence for translation initiation, the ATG element supplied by the pPJV7563 DNA vaccine vector was used for translation initiation. Antigen expression from DNA vaccine vectors is generally enhanced using ATG codons that conform to the Kozak consensus. Use of the vector-supplied ATG codon (via insertion at the Nhe I site) results in a minor two-amino acid insertion at the amino terminus of the coding sequence of the HA antigen.

The immunogenicity of these vectors was evaluated in a trivalent formulation in the domestic pig model. The three vectors were mixed 1:1:1 and formulated onto gold particles at a rate of 2 μg total DNA/mg gold, using 0.5 mg gold per administration. Each immunization consisted of two tandem PMED administrations totaling 2 μg DNA and 1 mg of gold. The vaccination regimen involved two such immunizations spaced four weeks apart. Influenza-naïve pigs were divided into two immunization groups based on the actual delivery device employed. One group of animals received trivalent influenza DNA vaccinations using the reusable "research" PMED device that has been successfully used to induce immune responses to numerous antigens in a variety of animals. The second group of animals received immunizations using the clinical device that was used to successfully vaccinate humans using an HBV DNA vaccine. This latter device differs from the research device in that it employs a "single shot" plastic disposable nozzle in place of the 12-shot reusable nozzle associated with the research device.

Two weeks following the second immunization, serum samples were collected and hemagglutination-inhibiting (HI) antibody titers specific for the homologous H3, H1 and B viruses were measured. These data are shown in Figure 19. 100% seroconversion was observed to the H3 and B antigens using both devices with geometric mean HI titers well in excess of the 1:40 surrogate level commonly believed to be required for immunogenicity to influenza. The data obtained indicates that this technology platform will be able to elicit significant responses in humans.

H1-specific immune responses were lower. This was later determined to be due to a rearrangement in the H1 HA gene that occurred in the H1 DNA vaccine vector during plasmid production. This rearrangement went undetected in the initial analysis of the DNA prior to formulation and vaccination, but would be detected by a more stringent analysis. Based on results using the H3 and B vectors, it is likely that H1-specific responses would have been markedly greater had a functional plasmid been utilized.

Example 19. Construction of plamid pPJV2012

The plasmid pPJV2012 was constructed. pPJV2012 expresses the A and B subunits of the heat labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Expression of functional LT toxin from pPJV2012 *in vivo* may be used to ehance the immune response to other proteins expressed from plasmids co-administered with pPJV2012.

LT is an 84 kD multimeric protein composed of a single A subunit and a pentamer of identical B subunits. LT is expressed and secreted from *E. coli* and binds to GM1 ganglioside on intestinal cells via the pentamer of B subunits. The toxin is internalised and the A subunit then activates production of excessive cAMP and disruption of electrolyte balance across the intestinal lumen (Tauschek, *et al* (2002) Proc Natl Acad Sci, USA 99: 7066-7071). Thus for biological activity of LT expressed *in vivo* the production of both A and B subunits are required together with signals to mediate secretion from expressing cells. Plasmid vectors encoding the LT A and B subunits have been shown to augment the immune response induced to several viral antigens when co-delivered using particular mediated epidermal delivery (Arrington *et al* (2002) J Virol 76 (9): 4536-46).

In addition to the coding sequences for the A and B subunits of LT toxin, pPJV2012 also incorporates the chimeric promoter sequences of the invention to ensure effective gene expression, a rabbit beta globin poly A sequence, signal sequences to mediate secretion from expressing cells, a kanamycin resistance gene and a bacterial origin of replication. The plasmid is shown in Figure 22.

The plasmid pPJV2012 was constructed via the following steps:

- PCR amplification of LT A coding sequence from *E. coli* genomic DNA and insertion into an intermediate plasmid;
- Excision of the LT A coding sequence and insertion into an "Acceptor" plasmid under the control of the CMV promoter.
- PCR amplification of the LT B coding sequence from *E. coli* genomic DNA and insertion into an intermediate plasmid under the control of a truncated CMV promoter.
- Excision the LT A expression cassette.

The resultant plasmid, pPJV2012, expression both subunits of LT in mammalian cells.

Promoter and enhancer sequences in pPJV2012

The LT A subunit is expressed from a CMV Immediate Early (IE) promoter. The LT B subunit is expressed from a truncated CMV IE promoter. Additional sequences are included for both genes to improve expression, specifically the HBV pre-S2 5' UTR (Moriarty *et al* (1981) Proc Natl Acad Sci USA 78: 2606-2610), CMV exon 1/2 (consisting of the first two CMV IE exons spliced together by deletion of the natural intron), rat insulin intron A (Lomedico *et al* (1979) Cell 2: 545-558) and rabbit beta globin poly A (rGpA). To ensure secretion from expressing cells the chicken lysozyme signal peptide (CLSP; Genbank accession number CR390743) has been inserted for both LT subunits. In addition, the HBV env enhancer (Vannice and Levinson (1988) J Virol. 62: 1305-1313) was inserted after the A subunit to improve expression.

Cloning of the LT A and B subunits

E. coli strain E078:H11 was obtained from ATCC (catalogue #35401), and the A and B subunits were amplified by separate PCR reactions using primers homologous to the 5' and 3' ends, designed by reference to the GenBank accession file AB011677. The coding sequences generated for both subunits do not include the sequences encoding the bacterial signal peptides found at the amino termini. The A and B subunit fragments were separately ligated into plasmid WRG7054.

Construction of pPJV2012

The LT A coding sequence was excised and ligated with the vector backbone of pPJV7592 and a fragment derived from pPJV7572 that included the CMV promoter, 5'-untranslated regions and CLSP. The resulting plasmid was designated A1. A1 was cut and ligated with a fragment from pPJV7592 to recreate a multiple cloning site, and the resulting plasmid was designated Acceptor; this provided the LT A component of pPJV2012.

The LT B coding sequence was excised and ligated with the vector backbone of pPJV7591 and to a fragment derived from pPJV7572 that contained the 3' end of the untranslated regions and the CLSP. The resulting plasmid was designated Donor and provided the LT B component of pPJV2012.

To generate pPJV2012 a fragment from Donor containing the LT B expression cassette was ligated with a vector fragment derived from Acceptor. The resulting plasmid expresses both LT A and B in mammalian cells.

Origin of Nucleotide Sequences in pPJV2012

pPJV2012 has been fully sequence and aligned with databases to assign the origin of each sequence. The derived sequences, shown in Table 6 below, were as expected.

Table 6: Identification of Components Comprising Plasmid pPJV2012

Base Numbers	Component Identification
1-905	pUC4K-derived sequences including kanamycin resistance gene
906-1038	Rabbit beta globin poly A
1039-1351	LT B subunit coding sequence
1352-1357	Linker sequence
1358-1417	Chicken lysozyme signal sequence
1418-1538	5' UTR of HBV pre-S2
1539-1544	Linker sequence
1545-1677	Rat intron A
1678-1683	Linker sequence
1684-1814	CMV exon 1 / 2
1815-1935	Truncated CMV IE promoter
1936-1947	Linker sequence
1948-2632	CMV promoter
2633-2763	CMV exon 1 / 2
2764-2769	Linker sequence
2770-2902	Rat insulin intron A
2903-2908	Linker sequence
2909-3029	5' UTR of HBV pre-S2
3030-3089	Chicken lysozyme signal peptide
3090-3095	Linker sequence
3096-3818	LT A coding sequence
3819-3830	Linker sequence
3831-4363	HBV env enhancer sequence
4364-4374	Unknown sequence
4375-4050	Rabbit beta globin poly A
4051-5578	pUC19-derived sequence

In addition a BLAST search was performed for sequence homologies to the entire human genome, looking for sequence similarities in stretches as short as 19 bases. There were "no significant similarities found"; the greatest degree of homology was with a sequence of 68 bases of rGpA, although the longest stretch of identical sequence was only 18 bases.

Comparison of pPJV2012 sequence to pPJV1671

The sequence of pPJV2012 has been compared to that of pPJV1671. The results are shown in Table 7 below.

Table 7: Comparison of the sequence of pPJV2012 with pPJV1671

Base numbers of sequence in pPJV2012	Sequence also present in pPJV1671 influenza DNA vaccine?
1-896	Yes
897-905	No
906-1038	Yes
1039-1351	No
1352-1357	Yes
1358-1417	No
1418-1538	Yes
1539-1544	Yes
1545-1677	Yes
1678-1683	Yes
1684-1814	Yes
1815-1935	Yes
1936-1947	Yes
1948-2632	Yes
2633-2763	Yes
2764-2769	Yes
2770-2902	Yes

Base numbers of sequence in pPJV2012	Sequence also present in pPJV1671 influenza DNA vaccine?
2903-2908	Yes
2909-3029	Yes
3030-3089	No
3090-3095	Yes
3096-3818	No
3819-3824	Yes
3825-3830	Yes
3831-4363	Yes
4364-4374	Yes
4375-4505	Yes
4512-5578	Yes

Analysis demonstrates that 4418 of the 5578 base pairs (79%) in pPJV2012 are also present in the pPJV1671 influenza DNA vaccine. Exclusive of the coding sequences for the LT A and B subunits, 4418 of the 4544 base pairs (97%) of pPJV2012 are also present in pPJV1671.

Note that pPJV1671 has undergone biodistribution/integration studies and in each case no evidence of integration was found.

Example 20 - Construction of the plasmid pPJV7788 a plasmid which expresses the *E.coli* LT Subunits in Mammalian Cells

The plasmid pPJV7788 was generated using the following plasmids:

pPJV7563 and pPJV7592 which are plasmids derived from pPJV7275, pPJV7284, pPJV7389, pPJV7586 and pPJV7293.

pPJV7590 which is a derivative of pPJV7389 that includes a multiple cloning site (MCS) immediately upstream of the CMV promoter.

pPJV7572 which is a derivative of pPJV7389 that contains the coding sequence for the chicken lysozyme signal peptide (CLSP) directly upstream of the encoded antigen. This allows for extracellular secretion of c-terminally fused antigens.

5

(i) Construction of pPJV7785 (LTA Acceptor Plasmid)

pPJV7563 was cut with Sal1, blunt ended, and cut with Nde1 to create a vector fragment. pPJV7590 was cut with Sph1, blunt ended, and cut with Nde1 to
10 create an insert fragment containing a MCS and the five-prime end of the CMV promoter. These fragments were ligated to generate pPJV7592.

pPJV7592 was cut with Nco1 and Bgl2 to create a vector fragment. pPJV7572 was cut with Nco1 and Nhe1 to create an insert fragment containing the 3'-end of the CMV promoter, 5'- untranslated regions, and the CLSP. pPJV2004 was
15 cut with Nhe1 and BamH1 to create an insert fragment containing the LTA subunit. These fragments were ligated to generate the plasmid pPJV7785.

(ii) Construction of pPJV7787 (LTB Donor Plasmid)

pPJV7389 was cut with Nco1 and EcoR1 to create a vector fragment.
20 pPJV7572 was cut with Nco11 and Nhe1 to create an insert fragment containing the 3'-end of the CMV promoter, 5'- untranslated regions, and the CLSP. pPJV2005 was cut with Nhe1 and BamH1 to create an insert fragment containing the LTB subunit. pPJV7586 was cut with Bgl2 and EcoR1 to create an insert fragment containing the rabbit beta-globin polyadenylation region. These fragments were ligated to generate
25 pPJV7787.

(iii) *Construction of pPJV7788*

pPJV7785 was cut with Xho1 and Mfe1to create a vector fragment containing the LTA expression cassette. pPJV7787 was cut with Xho1 and EcoR1 to create an
30 insert fragment containing the LTB expression cassette. These fragments were

ligated to generate pPJV7788 that will express the LTA and LTB subunits when introduced into mammalian cells.

Table 8 below provides the location of the various elements in the construct pPJV7788.

Table 8: Component ID for pPJV7788

Base Numbers	Component
1-44	Tn903, pUC4K Remnants
45-860	KanR (Tn903)
861-983	Tn903, pUC4K Remnants
984 –1001	pUC19 MCS
1002 -1686	CMV Pro
1687-1817	CMV Exon1/2
1818-1823	Bam/Bgl fusion
1824-1956	Rat Insulin Intron A
1857-1962	BamH1 site
1963-2083	5'-UTR of HBV pre-S2
2084-2143	Lysozyme SP
2144-2149	Nhe1 Site
2150-2462	LTB
2463-2593	RBGpA
2594-2623	Multiple Cloning Site
2624-3308	CMV Pro
3309-3439	CMV Exon1/2
3440-3445	Bam/Bgl fusion
3446-3578	Rat Ins IntA
3579-3584	BamH1
3585-3705	5'-UTR of HBV pre-S2
3706-3765	Lysozyme SP
3766-3671	Nhe1 site
3772-4494	LTA

4495-4506	Polylinker
4507-5039	HBVenh
5040-5050	Unknown origin.
5051-5181	rGlob pA
5182-5187	EcoR1 site
5188-6254	pUC19

Example 21 - Construction of pPML7789, a Plasmid That Expresses the H5/ VN1194 Hemagglutinin Protein in Mammalian Cells

A further construct, pPML7789, capable of expressing the H5/ VN1194 Hemagglutinin Protein utilizing a chimeric promoter of the invention was generated. The construct pPJV7563 described in Example 5 was used as the backbone for the construct pPML7789.

A plasmid harboring the coding sequence for H5/VN1194 HA gene was used as the template for PCR. PCR primers were designed with sites at the five and three-prime ends to allow insertion into pPJV7563. pPJV7563 was cut with Nhe1 and Bsp120I to generate a vector fragment. The PCR fragment amplified from the H5/VN1194 template was cut with the same enzymes to generate an insert fragment. These two fragments were ligated to produce pPML7789. The coding and flanking sequences were verified by sequencing.

The nucleotide positions of the various elements in pPML7789 are indicated in Table 9 below.

Table 9: Components of construct pPML7789

Nucleotide Position	Element
Start: 1 End: 44	Tn903, pUC4K Remnants
Start: 45 End: 860	KanR (Tn903)
Start: 861 End: 896	Tn903, pUC4K Remnants

Start: 897 End: 902	pUC19 MCS
Start: 903 End: 1587	CMV Pro
Start: 1588 End: 1718	CMV Exon1/2
Start: 1719 End: 1724	Bam/Bgl fusion
Start: 1725 End: 1857	Rat Ins IntA
Start: 1858 End: 1863	BamH1 site
Start: 1864 End: 1984	5'-UTR of HBV pre-S2
Start: 1985 End: 1993	ATG-Nhe
Start: 1994 End: 3699	VN1194H5
Start: 3700 End: 3705	Bsp120I site
Start: 3706 End: 4238	HBVenh
Start: 4239 End: 4249	Unknown linker sequence
Start: 4250 End: 4380	rGlob pA
Start: 4341 End: 4341	PolyA Site
Start: 4381 End: 4386	EcoR1 site
Start: 4387 End: 5453	pUC19

Example 22. Potent protective cellular immune responses generated by DNA immunisation with HSV-2 ICP27 and *E. coli* heat labile toxin

Materials and Methods

Viruses

HSV-2 viruses (MS strain, ATCC VR-540 and HG52 strain G gift from Nancy Sawtell, University of Cincinnati) were grown on VERO cells (ATCC CCL-81) and purified on sucrose gradients prior to use.

DNA vaccine and DEI vectors

The plasmid encoding HSV-2 ICP27 (Fig. 27) was generated by inserting a PCR fragment incorporating the entire ICP27 gene (UL54) into pTarget (Promega,

Madison WI). The PCR fragment was amplified from purified genomic DNA of the MS strain of HSV-2 using 5' (GCCACTCTCTTCCGACAC, SEQ ID NO:63) and 3' (CAAGAACATCACACGGAAC, SEQ ID NO:64) primers. The amplified sequences correspond to nucleotides 114,523 to 116,179 of the published genome sequence of the HG52 clone of HSV-2 (GenBank accession number NC_ 001798). The pICP27 was sequenced in its entirety by the DNA Sequencing Core Facility at the University of Wisconsin, Madison.

Plasmid PJV2012 encodes both the A and B subunits of LT from a single vector and is shown in Figure 22. The construction of pPJV2012 is described in Example 19. In pPJV2012, the LT A subunit gene is expressed from a transcription unit consisting of the following components: the human cytomegalovirus (hCMV) immediate early promoter, fused exons 1 and 2 from hCMV (non-coding), rat insulin intron A, 5' non-coding region of the hepatitis B virus (HBV) pre-S2 gene, ATG codon, lysozyme signal peptide coding sequence, LT A subunit coding sequence, 3' non-coding HBV transcriptional enhancer region, and the rabbit beta globin polyadenylation sequence.

pPJV2012 also encodes the LT B subunit product from a second transcription unit running in the opposite direction (Figure 22). The LT B transcription unit is similar to that encoding the LT A product but does not contain additional copies of the hCMV and HBV transcriptional enhancer elements. The hCMV and HBV enhancer elements located in the LT A transcription unit also serve the LT B transcription unit.

Plasmid PJV2013 (not shown) is similar to pPJV2012 but encodes both the A and B subunit products of cholera toxin from a single vector. The pPJV2013 functional map is identical to that shown for pPJV2012 in Figure 22.

DNA vaccination via particle-mediated epidermal delivery (PMED)

PMED DNA vaccination of 6 to 8 week old female Balb/c mice was as previously described (Arrington *et al*, J. Virol. 76, 4536-4546, 2002) except that each immunization consisted of a single PMED delivery to the ventral abdominal skin in which each delivery contained 0.5 mg of gold coated with a total of 0.5 μg of the DNA vaccine / DEI vector formulation. Two such "single shot" immunizations were

administered 4 weeks apart and animals were sacrificed or challenged 2 weeks following the second or "booster" immunization.

Peptide pools and peptides

The derived amino acid sequence for ICP27 from the MS strain virus was used as a template for the library. The ICP27 protein is highly conserved between the HG52 and MS sequence (see Figure 28 and SEQ ID NO:65) thus the library would be capable of detecting responses to both strains. A peptide library was synthesized (Mimotopes, Fisher Scientific) to span the entire sequence of ICP27 using peptides 18 amino acids in length that had an 11 amino acid overlap with the adjacent peptide. A total of 72 peptides were made.

To facilitate the identification of positive peptides the library was divided into peptide pools using the strategy described by Tobery *et al* J. Immunol. Methods 254, 59-66, 2001. Peptide pools were generated using the pattern shown in Table 10. There were 12 pools (named C1-C12) with 6 peptides per pool and 6 pools (R1-R6) with 12 peptides per pool. Pools containing peptides #45 and #46 are in bold type.

Table 10: Peptide Pool Compositions

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
R1	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
R2	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43
R3	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67
R4	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
R5	28	30	32	34	36	38	40	42	44	**46**
R6	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70

	C11	C12
R1	21	23
R2	**45**	47
R3	69	71
R4	24	26
R5	48	50
R6	72	2

ELISPOT assays

IFN-γ ELISPOT assays were performed on fresh splenocytes and lymph node cells as previously described except the antigens for stimulation were single peptides or peptide pools as defined for each experiment in the Results section. In some instances, prior to the ELISPOT assay, T-cell populations were depleted by magnetic beads (Dynal) following manufacturers instructions.

Cytometric bead array (CBA) assays

Fresh splenocytes were collected two weeks following the second immunization and resuspended at 1 x 10^7 cells per ml in SM (RPMI medium + 10% fetal bovine serum supplemented with MEM sodium pyruvate, non-essential amino acids, and 2-mercaptoethanol (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Cell samples were plated at 1 x 10^6 cells (100 µl) per well in 96-well flat-bottom plates. The splenocytes were treated with 100 µl aliquots of the ICP27 peptide in SM or medium-alone. The final peptide concentration was 10^{-8} M. Control splenocytes from naïve animals were also plated with and without peptide and with and without Con-A (2.5 mg/ml final concentration) to serve as negative and positive controls, respectively.

Plates were incubated at 37°C for 48 hours and then 160 µl of each sample was collected and stored at -20°C until assayed using the BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2 kit (BD Biosciences, San Jose, CA (cat. #551287)). Briefly, this kit uses 5 bead populations with distinct fluorescence intensities coated with capture antibodies specific for mouse IL-2, IL-4, IL-5, INF-γ, and TNF-α. The five bead populations are mixed together to form the array that is resolved on the FL3 channel of the BD FACSCalibur flow cytometer. Cytokine capture beads are mixed with the PE-conjugated detection antibodies and then incubated with standards or test samples to form sandwich complexes. BD CBA Analysis Software was used to generate results after sample acquisition. The sample intensity for each cytokine is compared to standard curves to facilitate quantification of cytokine concentrations. Samples were run neat or at a dilution of 1:10 according to the manufacturers instructions.

HSV-2 virus challenge

Anesthetized Balb/c mice were intranasally challenged with 30 µl of PBS containing approximately $50LD_{50}$ (2 x 10^6 PFU) of HSV strain MS. Mice were

followed for 20 days after infection and scored for morbidity and mortality. Morbidity was scored on a scale of 0 to 4 according to the following schedule: 4, healthy; 3, ruffled fur, sneezing; 2, sores on eyes or rump, reduced movement; 1, hunched, little movement; 0, dead. Mice that were treated with IFN-γ- (eBioscience, San Diego, CA (cat. # 16-7311) and/or TNF-α- (cat. # 16-7332) specific monoclonal antibodies around the time of challenge received intraperitoneal injections containing 90 μg of antibody on days –2, 0, 2, 4, 6, and 8 relative to virus challenge. In T-cell depletion experiments, mice received intraperitoneal injections containing 200 μg of antibody specific for either the CD4 or CD8 populations on days –2 and 0 relative to virus challenge (Functional Grade purified anti-mouse CD4, eBioscience Cat#: 16-0041; Functional Grade purified anti-mouse CD8, eBioscience; Cat#: 16-0081).

Results

Identification of a strong CD8 epitope in Balb/c mice.

To identify T-cell responses against the ICP27 protein, an IFN-γ ELISPOT assay was carried out on cells recovered from Balb/c and C57Bl/6 mice infected with an attenuated strain of HSV-2 (HG52 strain G). A peptide library composed of peptides spanning the entire length of the ICP27 coding sequence was used to stimulate the T-cells. The peptides were 18 amino acids in length and overlapped neighboring peptides by 11 amino acids. Peptide pools were composed of either 6 peptides (Pools C1-C12) or 12 peptides (Pools R1-R6) as described in Materials and Methods and Table 10, a configuration that facilitated identification of positive peptides within the library. Spleen and lymph node cells recovered from Balb/c mice 7 days after infection showed very strong responses to peptides within pools C10, C11, R2 and R5 (Figure 29A) with weaker responses in several other pools. Only weak responses were detected in cells recovered from C57Bl/6 mice. The pattern of positive responses was found to be similar in the assayed spleen and lymph node cell populations.

Based on the IFN-γ ELISPOT results, two adjacent peptides (#45, #46) were predicted to contain the dominant T-cell epitope. This was confirmed by testing each peptide individually (data not shown). Peptides 45 and 46 stimulated strong IFN-γ secretion and contained a homologous nine amino acid sequence HGPSLYRTF (Fig

29B, SEQ ID NO:68) that is predicted to bind the Dd allele. Interestingly, peptide 46 also contains a region that corresponds to an epitope previously described in Balb/c mice for ICP27 from HSV-1 (Banks *et al*, J. Virol. 67, 613-616, 1993). Comparison of ICP27 sequences in HSV-1 and HSV-2 showed that the region differs by a single amino acid; the alanine (A) residue in the HSV-2 ICP27 (LYRTFAANPRA, SEQ ID NO:69) is replaced by a glycine (G) in HSV-1 (LYRTFAGNPRA, SEQ ID NO:70). The region, however, is not present in peptide 45 even though this peptide stimulates an extremely strong response.

To determine the relative importance of the two potential epitopes in peptide 46 in the IFN-γ ELISPOT assay, the peptides LYRTFAANPRA and the HGPSLYRTF were synthesized and tested. Spleen cells isolated from infected mice responded strongly to the HGPSLYRTF peptide, but no response above background was detected to the LYRTFAANPRA sequence. Using magnetic beads to deplete T-cell populations prior to the IFN-γ ELISPOT assay, resulted in a strong CD8+ ICP27 response. The data indicates that a strong CD8 response is generated in Balb/c mice towards the HSV-2 ICP27 protein that is specific for the sequence HGPSLYRTF.

In vitro immune responses to ICP27 vaccine

A DNA vaccine, "pICP27", was generated using ICP27 sequences from the MS strain of HSV-2 (Fig. 27). The sequenced construct had only two nucleotide differences from the published HG52 ICP27 gene sequence (Figure 28). There was a G to A change at nucleotide 57 which would be silent, and an A to C change at 484 would change a lysine in the HG52 strain to an asparagine in the MS version. Thus, the MS strain ICP27 protein expressed from the DNA vaccine would be almost identical to the HG52 strain version of the protein with no difference in the region of the putative CD8 epitope.

The pICP27 DNA vaccine was used to immunize Balb/c and C57Bl/6 mice by PMED. Splenocytes and lymph node cells were tested in the IFN-γ ELISPOT assay against the panel of pools described in Figure 29. The pattern of positive responses to the ICP27 peptides found in DNA immunized mice were the same as those found in the infected mice (data not shown).

In vivo responses to ICP27 vaccine

The *in vivo* activity of immune responses generated by pICP27 DNA vaccination was studied in a prophylactic intranasal infection model in Balb/c mice. Infection with various doses of the MS strain of HSV-2 in 12-week-old Balb/c mice established an LD_{50} of approximately 3 x 10^4 PFU (data not shown). In DNA protection experiments, a virus challenge dose of 50 LD_{50} was used because this dose consistently resulted in 100% mortality in naïve animals.

A series of experiments showed that immunization with pICP27 DNA alone (prime and boost) had limited ability to protect mice. Therefore, to improve protection DEI vectors encoding cholera toxin (CT) or the heat labile toxin from E. coli (LT) were co-delivered with the ICP27 DNA vaccine. The A and B toxin subunits were expressed from the same plasmid for each of the two toxins.

Mice were immunized with the ICP27 DNA vaccine, either alone, or supplemented with CT or LT DEI vectors at a 9:1 ratio (0.45 μg antigen DNA + 0.05 μg DEI vector DNA). A total of 16 animals per immunization group were employed, half of which were challenged with virus and the other half sacrificed at the time of challenge for ICP27-specific cytokine production.

The results of this study are shown in Figure 31. The results show that immunization with the ICP27 + CT and ICP27-only formulations provided partial protection and no protection, respectively, whereas 100% protection was observed for the ICP27 + LT formulation (Figure 31A). These results confirm that co-delivery of DEI vectors with the ICP27 vector enhance protection and reinforce the superiority of LT over CT as an immunostimulator in DNA immunization. Quantification of cytokine production following *in vitro* stimulation with the CD8 epitope peptide using the CBA kit demonstrated a good correlation between challenge survival and the levels of both INF-γ (Figure 31B) and TNF-α production (Figure 31C).

The role of cytokines and T-cell populations

The role of ICP27-specific production of IFN-γ or TNF-α in the protection of challenged animals was evaluated. pICP27 + pPJV2012 (LT)-vaccinated animals were treated with INF-γ- and/or TNF-α-specific monoclonal antibodies for several days around the time of challenge to neutralize these cytokines *in vivo*. Morbidity

data is shown in Figure 32. As before, animals that received two ICP27 + LT DEI vaccinations were completely protected from the challenge and exhibited only a mild transient morbidity (fur ruffling in 1 of 4 animals) while 100% of naïve mice or mice immunized with the pICP27 vector alone succumbed to the challenge. In the group immunized with the ICP27 + LT DEI formulation and subsequently treated with anti-TNF-α, one death was observed immediately after intranasal challenge inoculation due to complications of anesthesia. Importantly, the three remaining mice showed only transient fur ruffling and fully recovered indicating that TNF-α production did not likely contribute significantly to protection. In contrast, the two groups of ICP27+LT DEI-immunized mice that received anti-IFN-γ or anti-IFN-γ + anti-TNF-α at the time of challenge became intensely morbid and 7 of 8 animals died, clearly demonstrating the importance of IFN-γ as an essential mediator of protection.

To examine the role of the CD4 and CD8 populations in protection, antibodies to CD4 or CD8 were used to deplete these populations prior to infectious challenge (Fig. 33). When mice were followed for mortality over 20 days an interesting pattern emerged. As expected, mice given pICP27 with empty vector were not significantly protected from infection. pICP27+LT DEI vaccination provided 100% survival, whereas, removal of both CD4 and CD8 cells from similarly immunized mice abrogated the protective effects of vaccination and made the mice susceptible to about the same level as naive mice. In mice immunized with the pICP27+LT DEI vaccine, depletion of the CD8 population prior to infection caused mice to succumb to infection indicating an important role of these cells in protection from infection or encephalitis. In the pICP27+LT DEI vaccinated mice, depletion of the CD4 population introduced a nine day delay (relative to naïve mice) before these mice also became ill and died, suggesting a role for CD4 T-cells for the long term survival.

Example 23: Immunogenicity of Influenza H5N1 DNA vaccine in mice

Materials and Methods

DNA plasmid pPML7789 (Example 21, Figure 20) encoding the HA of Influenza A/Vietnam/1194/2004 [H5N1] virus was precipitated onto gold particles

and delivered to mice by particle mediated epidermal delivery (PMED) using PowderMed's proprietary delivery technology. Delivery was effected with or without, as an adjuvant, an additional plasmid pPJV2012 (Example 19, Figure 22) encoding *E. coli* heat labile toxin subunits A and B. When pPJV2012 is present, this additional plasmid and the pPML7789 plasmid were precipitated onto the same gold particles. That was achieved by first premixing pPJV2012 and pPML7789 in liquid form at weight ratio of 1:9 and then co-precipitating the plasmids onto a population of gold particles. As a negative control, gold particles on which no plasmid has been precipitated were delivered by PMED. The mice were as follows:

Strain: Balb/C mice
Number: 36
Gender: Female
Weight Range: 15.0-19.6g (on the day of the first procedure)
Age: 42-49 days (on the day of arrival)
Diet: RM1 pelleted
Supplier: Charles River UK Ltd

The mice were divided into six groups as shown in Table 11 below. The procedures performed on the mice and the days on which the procedures took place are shown in Table 12 below. An HAI assay was carried out on the sera according to standard procedures.

Table 11: Treatment Group Assignment for Animals

Group #	Route of Admin	# of animals in each group	Treatment
1	Epidermally	6	Negative control 1 dose Bleed Day -1, bleed and cull Day 14
2	Epidermally	6	Negative control 2 doses Bleed Day –1 and 21, bleed and cull Day 36
3	Epidermally	6	pPML7789 1 dose Bleed Day –1, bleed and cull Day 14
4	Epidermally	6	pPML7789 2 doses Bleed Day –1 and 21, bleed and cull Day 36
5	Epidermally	6	pPML7789 + pPJV2012 1 dose Bleed Day –1, bleed and cull Day 14
6	Epidermally	6	pPML7789 + pPJV2012 2 doses Bleed Day –1 and 21, bleed and cull Day 36

Table 12: The Following Procedures were Performed on the Days Marked X

Day of Study	0	14	21	35
Transponder implantation	X			
Body weight	X	X	X[b]	X[b]
Vaccination	X		X[b]	
Health Score	X	X	X[b]	X[b]
Serum for antibody	X	X[a]	X[b]	X[b]
Harvest spleens		X[a]		X[b]
Culling		X[a]		X[b]

[a] Groups 1, 3 & 5 only

[b] Groups 2, 4 & 6 only

Results

HAI titres against NIBRG-14 [H5N1] virus were determinal

All controls were observed to be within acceptable limits. The negative control article (NIBRG-14 [H5N1] virus) was negative on all plates. The positive control article (turkey red blood cells) was positive on all plates. The second positive control article (serum containing antibodies to Influenza A/Chicken/Scotland/59 [H5N1] virus) ran on all plates to a geometric mean of 28, 40, 56 or 80HAIU (within acceptable limits of 40 HAIU +/- 2-fold).

All samples on days 0, 14 and 21 were <10HAIU (below the limit of detection) with the exception of ID:1074 (group 6) on Day 21 which could not be bled, and ID:1059 (group 4) on Day 21 for which there was insufficient serum obtained to perform the assay.

For the Day 35 bleeds, with the exception of ID:1074 (group 6) which could not be bled, the geometic mean titre of each sample was calculated, along with the group arithmetric mean, median and standard deviation for each group. These are shown in Table 13 below.

Table 13: HAI Titres for Groups 2, 4 & 6 of Serum obtained on Day 35

Group	Sample No.	GEO mean titre	Arithmetic mean	Median	SD
2	1047	<10	<10	<10	0
	1048	<10			
	1049	<10			
	1050	<10			
	1051	<10			
	1052	<10			
4	1059	28	28	24	10
	1060	40			
	1061	40			
	1062	20			
	1063	20			
	1064	20			
6	1071	160	164	160	40
	1072	226			
	1073	160			
	1074	*			
	1075	160			
	1076	113			

* Data unavailable due to the premature death of one animal

The results show that the pPML7789 plasmid is immunogenic in mice and that this immunogenicity is enhanced by the inclusion of pPJV2012.

Accordingly, novel nucleic acid constructs, compositions comprising various constructs, and nucleic acid immunization techniques using these constructs have been described. Although preferred embodiments of the subject invention have been described in some detail, it is understood that variations can be made without departing from the spirit and the scope of the invention.

CLAIMS

1. A nucleic acid construct suitable for delivery to a subject for inducing an immune response against influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, which construct comprises:

(iii) a chimeric promoter sequence comprising:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene;

(iv) a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment having at least 80% amino acid homology to said antigen or fragment;

(iii) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; and

(iv) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, which is in operable linkage with the chimeric promoter and which is downstream of coding sequence.

2. A nucleic acid construct according to claim 1, wherein the coding sequence encodes more one than said HA, fragment or immunogenic variant.

3. A nucleic acid construct according to claim 2, wherein the coding sequence encodes a said HA, fragment or variant of each of three to five different influenza strains.

4. A nucleic acid construct according to claim 3, wherein the coding sequence encodes a said HA, fragment or variant of each of three or four non-pandemic influenza strains.

5. A nucleic acid construct according to any one of the preceding claims, wherein the coding sequence encodes a said HA, fragment or variant of a pandemic influenza strain.

6. Carrier particles coated with a nucleic acid construct as defined in any one of the preceding claims.

7. Carrier particles coated with at least two different nucleic acid constructs as defined in claim 1, wherein each said construct encodes a said HA, fragment or variant of a different influenza strain.

8. Carrier particles according to claim 7, which are coated with three to five different said constructs.

9. Carrier particles according to claim 8, wherein three or four of said constructs encode a said HA, fragment or variant of different non-pandemic influenza strains.

10. Carrier particles according to any one of claims 7 to 9, which are coated with a said construct which encodes a said HA, fragment or variant of a pandemic influenza strain.

11. Carrier particles according to any one of claims 6 to 10, which are also coated with a nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence in operable linkage with the promoter, where the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology with said subunit or fragment.

12. Carrier particles according to claim 11, wherein the promoter sequence is a chimeric promoter sequence comprising:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

13. Carrier particles according to claim 11 or 12, wherein the ADP ribosylating bacterial toxin subunit is selected from cholera toxin subunit A, cholera toxin subunit B, *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B.

14. Carrier particles according to any one of claims 11 to 13, wherein the nucleic acid construct comprises two coding sequences which each comprise a different said subunit, fragment or variant.

15. Carrier particles according to claim 14, wherein the two coding sequences encode cholera toxin subunit A and cholera toxin subunit B respectively or *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B respectively.

16. Carrier particles according to any one of claims 11 to 15, wherein the nucleic acid construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; and

(b) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, which is in operable linkage with the chimeric promoter and which is downstream of the coding sequence.

17. Carrier particles according to any one of claims 6 to 16, which are gold particles.

18. A dosage receptacle for a particle mediated delivery device comprising coated particles as defined in any one of claims 6 to 17.

19. A particle mediated delivery device loaded with coated particles as defined in any one of claims 6 to 17.

20. A particle mediated delivery device according to claim 19 which is a needleless syringe.

21. A nucleic acid construct suitable for delivery to a subject for inducing an immune response against influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, which construct comprises:

(i) a chimeric promoter sequence comprising:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene; and

(iii) a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an influenza virus hemagglutinin (HA) antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment having at least 80% amino acid homology to said antigen or fragment.

22. A nucleic acid construct according to claim 21, which further comprises:

(iii) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; or

(iv) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, which is in operable linkage with the chimeric promoter and which is downstream of coding sequence.

23. A nucleic acid construct according to claim 21 or 22, wherein the coding sequence encodes more one than said HA, fragment or immunogenic variant.

24. A nucleic acid construct according to claim 23, wherein the coding sequence encodes a said HA, fragment or variant of each of three to five different influenza strains.

25. A nucleic acid construct according to claim 24, wherein the coding sequence encodes a said HA, fragment or variant of each of three or four non-pandemic influenza strains.

26. A nucleic acid construct according to any one of claims 21 to 25, wherein the coding sequence encodes a said HA, fragment or variant of a pandemic influenza strain.

27. Carrier particles coated with a nucleic acid construct as defined in any one of claims 21 to 26.

28. Carrier particles coated with at least two different nucleic acid constructs as defined in claim 21, wherein each said construct encodes a said HA, fragment or variant of a different influenza strain.

29. Carrier particles according to claim 28, which are coated with three to five different said constructs.

30. Carrier particles according to claim 29, wherein three or four of said constructs encode a said HA, fragment or variant of different non-pandemic influenza strains.

31. Carrier particles according to any one of claims 28 to 30, which are coated with a said construct which encodes a said HA, fragment or variant of a pandemic influenza strain.

32. Carrier particles according to any one of claims 27 to 31, which are also coated with a nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence in operable linkage with the promoter, where the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology with said subunit or fragment.

33. Carrier particles according to claim 32, wherein the promoter sequence is a chimeric promoter sequence comprising:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

34. Carrier particles according to claim 32 or 33, wherein the ADP ribosylating bacterial toxin subunit is selected from cholera toxin subunit A, cholera toxin subunit B, *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B.

35. Carrier particles according to any one of claims 32 to 34, wherein the nucleic acid construct comprises two coding sequences which each comprise a different said subunit, fragment or variant.

36. Carrier particles according to claim 35, wherein the two coding sequences encode cholera toxin subunit A and cholera toxin subunit B respectively or *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B respectively.

37. Carrier particles according to any one of claims 32 to 36, wherein the nucleic acid construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; and/or

(b) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, which is in operable linkage with the chimeric promoter and which is downstream of the coding sequence.

38. Carrier particles according to any one of claims 27 to 37, which are gold particles.

39. A dosage receptacle for a particle mediated delivery device comprising coated particles as defined in any one of claims 27 to 38.

40. A particle mediated delivery device loaded with coated particles as defined in any one of claims 27 to 38.

41. A particle mediated delivery device according to claim 40, which is a needleless syringe.

42. A nucleic acid construct comprising a chimeric promoter sequence and a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an influenza virus antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment having at least 80% amino acid

homology to said antigen or fragment and the chimeric promoter sequence comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

43. A nucleic acid construct according to claim 42 wherein the encoded antigen is influenza hemaglutinin (HA), an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant with at least 80% amino acid sequence homology to either.

44. A nucleic acid construct according to claim 42 wherein the encoded antigen is influenza neuraminidase (NA), M2, an immunogenic fragment of either or an immunogenic variant having at least 80% amino acid sequence homology to any of said NA, M2 or fragment.

45. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 44, wherein the influenza antigen, immunogenic fragment or variant is from a pandemic influenza strain.

46. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 45, wherein the construct encodes more than one influenza antigen, immunogenic fragment or immunogenic variant.

47. A nucleic acid construct according to claim 46, wherein the construct encodes a pandemic influenza antigen, immunogenic fragment thereof or immunogenic variant of said antigen or fragement and one or more non-pandemic influenza antigens, immunogenic fragment(s) thereof or immunogenic variant(s) of said antigen(s) or fragement(s).

48. A nucleic acid construct according to claim 46 or 47, wherein at least two of the different antigens, fragments or variants encoded are from the same influenza polypeptide from different strains of influenza virus.

49. A nucleic acid construct comprising a chimeric promoter sequence and a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology with said subunit or fragment and the chimeric promoter sequence comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

50. A nucleic acid construct according to claim 49, wherein the ADP ribosylating bacterial toxin subunit is selected from cholera toxin subunit A, cholera toxin subunit B, *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B.

51. A nucleic acid construct according to claim 49 or 50, wherein the nucleic acid construct comprises two coding sequences which each comprise a different said subunit, fragment or variant and each of which is operably linked to a said chimeric promoter.

52. A nucleic acid construct according to claim 51, wherein the two coding sequences encode cholera toxin subunit A and cholera toxin subunit B respectively or *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B respectively.

53. A nucleic acid construct according to claim 51 or 52, wherein the said two coding sequences are in inverse orientation.

54. A nucleic acid construct according to claim 51 or 52, wherein the said two coding sequences are in the same orientation.

55. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 54, wherein the hCMV immediate early promoter sequence (a) comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, nucleotides 903 to 1587 of SEQ ID NO:54, nucleotides 1815 to 1935 of SEQ ID NO:61, nucleotides 1948 to 2632 of SEQ ID No: 61, nucleotides 1002 to 1686 of SEQ ID No: 62 and/or nucleotides 2624 to 3308 of SEQ ID No:62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

56. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 55, wherein exon sequence (b) comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No.2, the nucleotide sequence of nucleotides 1588 to 1718 of SEQ ID No.54, nucleotides 1684 to 1814 of SEQ ID No: 61, nucleotides 2633 to 2763 of SEQ ID NO:61, nucleotides 1687 to 1817 of SEQ ID No: 62 and/or nucleotides 3309 to 3439 of SEQ ID No: 62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

57. A nucleic acid construct according to any one of the claims 42 to 56, wherein the heterologous intron (c) comprises a sequence selected from the rat insulin gene intron A sequence, chicken keratin gene intron A sequence, chicken cardiac actin gene intron A sequence, a functional fragment of any thereof or a functional variant of any of the preceding.

58. A nucleic acid construct according to claim 57, wherein the rat insulin gene intron A sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:3, the nucleotide sequence of nucleotides 1725 to 1857 of SEQ ID No. 54, nucleotides 1545 to 1677 of SEQ ID No: 61, nucleotides 2770 to 2902 of SEQ ID No: 61, nucleotides 1824 to 1956 of SEQ ID No:62 and/or nucleotides 3446 to 3578 of SEQ ID No:62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to one or more of the sequences of (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

59. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 58, wherein the chimeric promoter sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID No. 4 or the nucleotide sequence of nucleotides 903 to 1857 of SEQ ID No. 54;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

60. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 59, which further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter; and/or

(b) an enhancer sequence which is derived from a 3' untranslated region (UTR) of a HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence and which is in operable linkage with the chimeric promoter, wherein the enhancer sequence is downstream of the cloning site.

61. A nucleic acid construct according to claim 42, which comprises:

(i) the sequence of the vector pPJV7563 provided as SEQ ID No:14, or

(ii) a sequence with at least 60% sequence identity to the sequence of (i);

and the sequence encoding the said antigen, fragment or variant is provided in the said sequence (i) or (ii) so that it is operably linked to the chimeric promoter.

62. A nucleic acid construct according to claim 61, wherein the coding sequence enodes a HA antigen, an immunogenic variant thereof or or an immunogenic fragment of either.

63. A nucleic acid construct according to claim 42, which comprises the sequence of the vector pPJV1671 provided as SEQ ID No: 54 or a sequence with at least 60% sequence identity thereto.

64. A nucleic acid construct according to claim 42, which comprises the sequence of the vector pPML7789 provided as SEQ ID No: 59 or a sequence with at least 60% sequence identity thereto.

65. A nucleic acid construct according to claim 49, which comprises the sequence of the vector pPJV2012 provided by SEQ ID No: 61 or a sequence with at least 60% sequence identity thereto.

66. A nucleic acid construct according to claim 49, which comprises the sequence of the vector pPJV7788 provided by SEQ ID NO:62 or a sequence with at least 60% sequence identity thereto.

67. A nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence operably linked to the promoter, where the coding sequence encodes an influenza virus antigen, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment having at least 80% amino acid homology to said antigen or fragment and the construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen

sequence, which is in operable linkage with the coding sequence and promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence, where the enhancer sequence is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

68. A nucleic acid construct according to claim 67, wherein the encoded antigen is influenza hemaglutinin (HA), an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant with at least 80% amino acid sequence homology to either.

69. A nucleic acid construct according to claim 67, wherein the encoded antigen is influenza neuraminidase (NA) or M2, an immunogenic fragment of either or an immunogenic variant with at least 80% amino acid sequence homology to said NA, M2 or fragment.

70. A nucleic acid according to any one of claims 67 to 69, wherein the encoded influenza antigen, immunogenic fragment thereof, or immunogenic variant of either is from a pandemic influenza stain.

71. A nucleic acid construct according to any one of claims 67 to 70, wherein the construct encodes more than one influenza antigen, immunogenic fragment or immunogenic variant.

72. A nucleic acid construct according to claim 71, wherein the construct encodes an antigen of a pandemic influenza strain, an immunogenic fragment thereof or an immunogenic variant of said antigen or fragment and one or more antigen(s) of a non-pandemic influenza strain, immunogenic fragment(s) thereof or immunogenic variant(s) of said antigen(s) or fragment(s).

73. A nucleic acid construct according to claim 71 or 72, wherein at least two of the different antigens, fragments or variants are from the same influenza polypeptide from different strains of influenza virus.

74. A nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence operably linked to the promoter, where the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology with said subunit or fragment and the construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBVpreS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2gD antigen sequence, which is in operable linkage with the coding sequence and promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence, where the enhancer sequence is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

75. A nucleic acid construct according to claim 74, wherein the ADP ribosylating bacterial toxin subunit is selected from cholera toxin subunit A, cholera toxin subunit B, *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B.

76. A nucleic acid construct according to claim 74 or 75, wherein the nucleic acid construct comprises two coding sequences which each comprise a different said subunit, fragment or variant and each of which is linked to said chimeric promoter.

77. A nucleic acid construct according to claim 76, wherein the two coding sequences encode cholera toxin subunit A and cholera toxin subunit B respectively or *E. coli* heat labile toxin subunit A and *E. coli* heat labile subunit B respectively.

78. A nucleic acid construct according to claim 76 or 77, wherein the said two coding sequences are in inverse orientation.

79. A nucleic acid construct according to claim 76 or 77, wherein the said two coding sequences are in the same orientation.

80. A nucleic acid construct according to any one of claims 67 to 79, wherein the promoter is selected from the hCMV immediate early promoter sequence, Pseudorabies virus promoter sequence and Rous sarcoma virus promoter sequence.

81. A nucleic acid construct according to any one of claims 67 to 80, wherein the non-translated leader sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 or nucleotides 1864 to 1984 of SEQ ID NO:54;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

82. A nucleic acid construct according to any one of claims 67 to 81, wherein the enhancer sequence comprises:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, nucleotides 3699 to 4231 of SEQ ID NO:54, nucleotides 3831 to 4363 of SEQ ID NO:61 and/or 4507 to 5038 of SEQ ID NO:62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to a said sequence (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

83. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 82, which further comprises a polyadenylation sequence.

84. A nucleic acid construct according to claim 83, wherein the polyadenylation sequence is a polyadenylation sequence of a gene selected from rabbit beta-globin

gene, human papilloma virus (HPV) early or late genes, the HSV-2gB gene, a simian CMV immediate early gene and HSVgD late gene.

85. A nucleic acid construct according to claim 83, wherein the polyadenylation sequence is selected from:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, nucleotides 4243 to 4373 of SEQ ID No:54, nucleotides 906 to 1038 of SEQ ID No:61, nucleotides 4375 to 4050 of SEQ ID NO:61, or nucleotides 2463 to 2593 of SEQ ID NO:62;

(ii) a functional variant of (i) which has at least 80% nucleotide sequence homology to a said sequence (i); or

(iii) a functional fragment of (i) or (ii).

86. A nucleic acid construct according to claim 42 which comprises the sequence of SEQ ID NO:14.

87. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 86, which further comprises a nucleotide sequence encoding a signal peptide which is operably linked to the sequence encoding the antigen, exotoxin subunit, fragment or variant.

88. A nucleic acid construct according to claim 87, wherein the signal peptide is selected from the human tissue plasminogen activator signal peptide (hTPAsp), aprotinin signal peptide, tobacco extensin signal peptide and chicken lysozyme signal peptide.

89. A nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 88, which is a plasmid.

90. A population of nucleic acid constructs where the population comprises at least two different constructs according to any one of the claims 42 to 89.

91. A population of nucleic acid constructs where the population comprises at least two different constructs according to any one of claims 42 to 48, 61 to 64 and 67 to 73 which encode different influenza antigens, immunogenic fragments thereof or immunogenic variants of said antigens or fragments.

92. A population of nucleic acid constructs according to claim 91, which comprises at least three different constructs which each encode a different influenza antigen, immunogenic fragment or immunogenic variant.

93. A population of nucleic acid constructs according to claim 91 or 92, wherein at least two of the different antigens are from the same influenza polypeptide from different influenza strains.

94. A population of nucleic acid constructs according to any one of claims 91 to 93, wherein at least two of the different antigens, fragments or variants are from different influenza polypeptides from the same or a different influenza strain.

95. A population of nucleic acid constructs according to any one of claims 90 to 94, which comprises at least one construct according to any one of claims 49 to 54, 65, 66 and 74 to 79 encoding a said ADP ribosylating bacterial toxin subunit, fragment thereof or variant thereof.

96. A population of nucleic acid constructs where:

(i) at least one construct encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjvuant activity or a variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology to said subunit or fragment; and

(ii) at least one construct encodes a herpes simplex virus (HSV) antigen;

where the sequence encoding the said subunit, fragment or variant and/or the HSV antigen is operably linked to a chimeric promoter which comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene.

97. A population of nucleic acid constructs where:

(i) at least one construct encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology to said subunit or fragment; and

(ii) at least one construct encodes an HSV antigen,

where at least one of the said constructs further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence, which is in operable linkage with the coding sequence of the said construct and a promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence of the said construct, where the enhancer sequence is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

98. A population of nucleic acid constructs comprising:

(i) a first nucleic acid construct comprising a chimeric promoter sequence and a coding sequence in operable linkage with the chimeric promoter, where the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a

variant of either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology to said subunit or fragment and the chimeric promoter sequence comprises:

(a) a hCMV immediate early promoter sequence;

(b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and

(c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene; and

(ii) a second nucleic acid construct encoding at least one HSV antigen.

99. A population of nucleic acid constructs comprising:

(i) a first nucleic acid construct comprising a promoter sequence and a coding sequence operably linked to the promoter, where the coding sequence encodes an ADP ribosylating bacterial toxin subunit, a fragment thereof with adjuvant activity or a variant either thereof having adjuvant activity and having at least 80% amino acid homology to said subunit or fragment and the construct further comprises:

(a) a non-translated leader sequence which is derived from HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence, which is in operable linkage with the coding sequence and promoter which is heterologous to the coding sequence; and/or

(b) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence, where the enhancer is derived from a 3' UTR of an HBsAg sequence or of a simian CMV immediate early gene sequence, and the coding sequence is heterologous to the 3' enhancer sequence.

(ii) a second nucleic acid construct encoding at least one HSV antigen.

100. A population of nucleic acid constructs according to claim 99, comprising:

(i) a first nucleic acid construct which comprises the sequence of the vector pPJV2012 provided by SEQ ID NO:61 or a sequence with at least 60% sequence identity thereto; and

(ii) a second nucleic acid construct encoding an HSV antigen.

101. A purified isolated chimeric promoter sequence where the chimeric promoter sequence is a defined in any one of claims 42 and 55 to 57.

102. Coated particles which comprise carrier particles coated with a nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 89 or a population of nucleic acid constructs according to any one of claims 90 to 100.

103. Coated particles according to claim 102, wherein the carrier particles are gold particles.

104. A dosage receptacle for a particle mediated delivery device comprising coated particles as defined in claim 102 or 103.

105. A particle mediated delivery device loaded with coated particles as defined in claim 102 or 103.

106. A particle mediated delivery device according to claim 105 which is a needleless syringe.

107. A pharmaceutical composition comprising a nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 89 or a population of nucleic acid constructs according to any one of claims 90 to 100 together with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

108. A vaccine composition comprising a nucleic acid construct according to any one of claims 42 to 89 or a population of nucleic acid constructs according to any one of claims 90 to 100.

109. A vaccine composition according to claim 108, which is a multivalent vaccine comprising at least two different constructs according to any one of claims 42 to 48, 61 to 64, and 67 to 73 which encode different influenza antigens, immunogenic fragments thereof or immunogenic variants of either thereof.

110. A vaccine composition according to claim 109, which is a trivalent, tetravalent or pentavalent influenza vaccine.

111. Use of a nucleic acid construct as defined in any one of claims 42 to 89, of a population of nucleic acid constructs as defined in any one of claims 90 to 95 or of coated particles as defined in claims 102 or 103 in the manufacture of a medicament for the prevention of influenza.

112. Use according to claim 111, wherein the medicament is to be delivered by injection, transdermal particle delivery, inhalation, topically, orally, intranasally or transmucosally.

113. Use according to claim 111 or 112, wherein the medicament is to be delivered by needleless injection.

114. An *in vitro* method of obtaining expression in mammalian cells of a influenza polypeptide of interest, which method comprises transferring into said cells a nucleic acid construct as defined in any one of claims 42 to 89, of a population of nucleic acid constructs as defined in any one of claims 90 to 95 or coated particles as defined in claim 102 or 103.

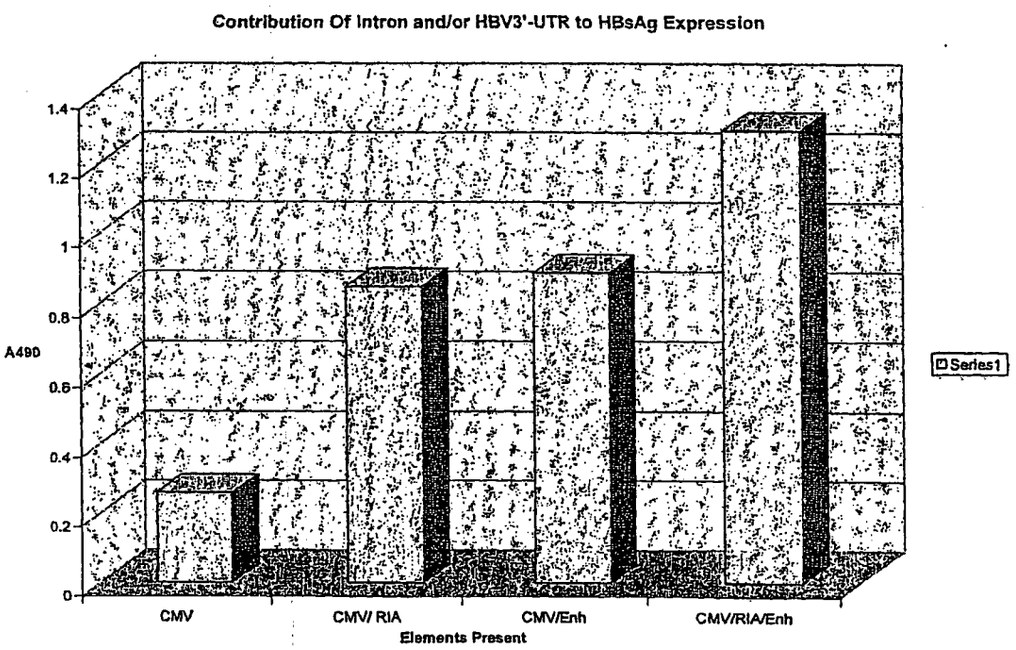

Contribution Of Intron and/or HBV3'-UTR to HBsAg Expression
A490
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CMV
CMV/ RIA
CMV/Enh
CMV/RIA/Enh
Elements Present
Series1

Figure 1

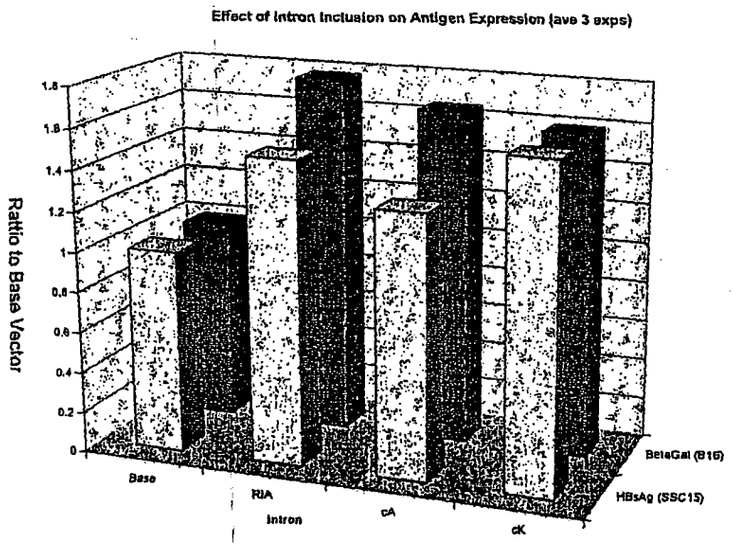

Effect of Intron Inclusion on Antigen Expression (ave 3 exps)
Ratio to Base Vector
1.6
1.8
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
RIA
Intron
cA
cK
BetaGal (B16)
HBsAg (SSC15)

Figure 2

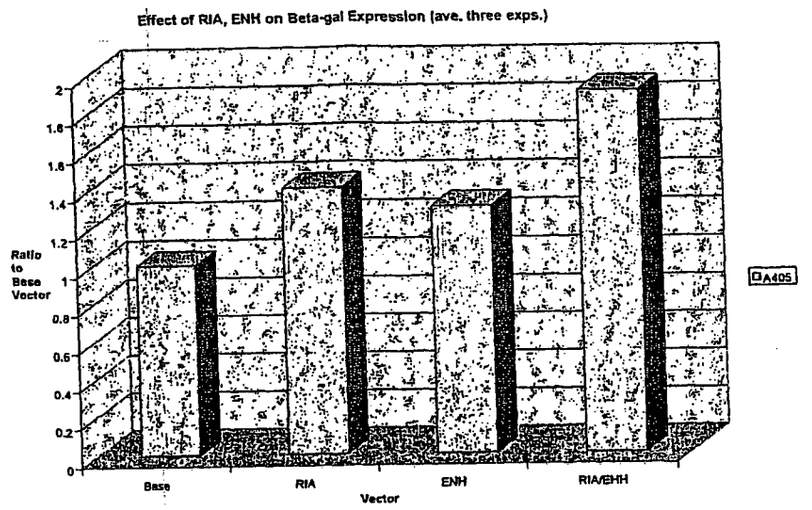

Effect of RIA, ENH on Beta-gal Expression (ave. three exps.)
Ratio to Base Vector
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
RIA
ENH
RIA/ENH
Vector
A405

Figure 3

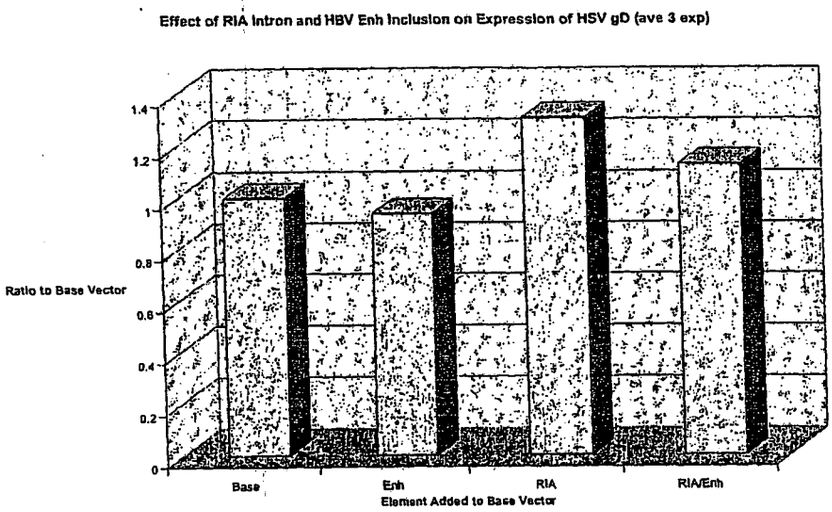

Effect of RIA Intron and HBV Enh Inclusion on Expression of HSV gD (ave 3 exp)
Ratio to Base Vector
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
Enh
RIA
RIA/Enh
Element Added to Base Vector

Figure 4

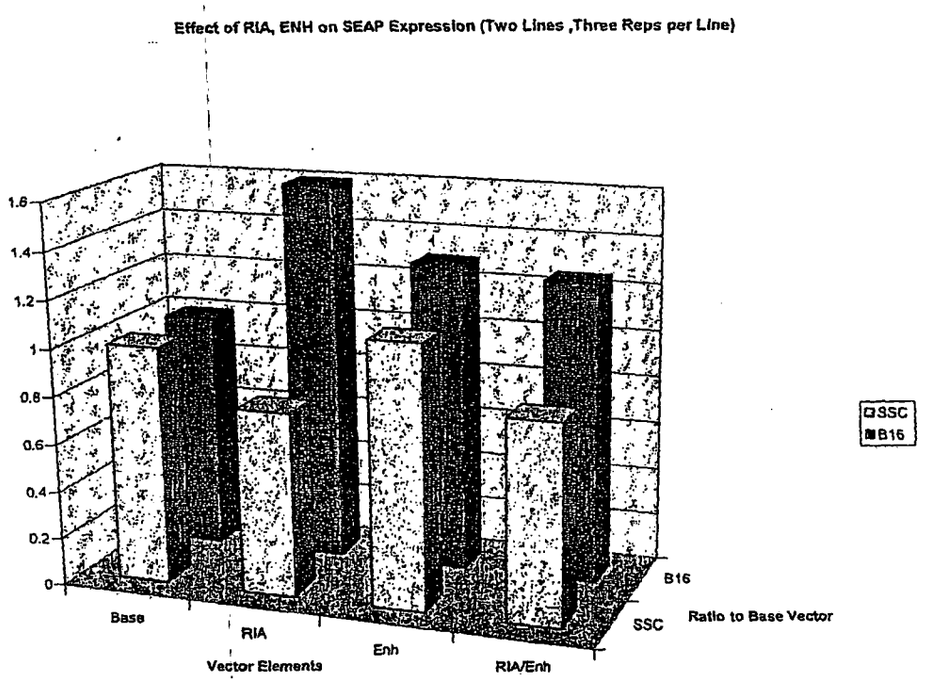

Effect of RIA, ENH on SEAP Expression (Two Lines ,Three Reps per Line)
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
RIA
Enh
RIA/Enh
Vector Elements
SSC
B16
Ratio to Base Vector
SSC
B16

Figure 5

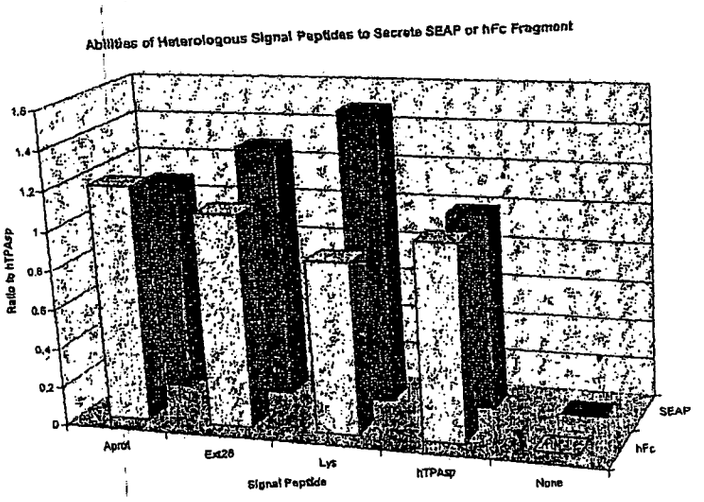

Abilities of Heterologous Signal Peptides to Secrete SEAP or hFc Fragment
Ratio to hTPAsp
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Aprot
Ext28
Lys
hTPAsp
None
Signal Peptide
SEAP
hFc

Figure 6

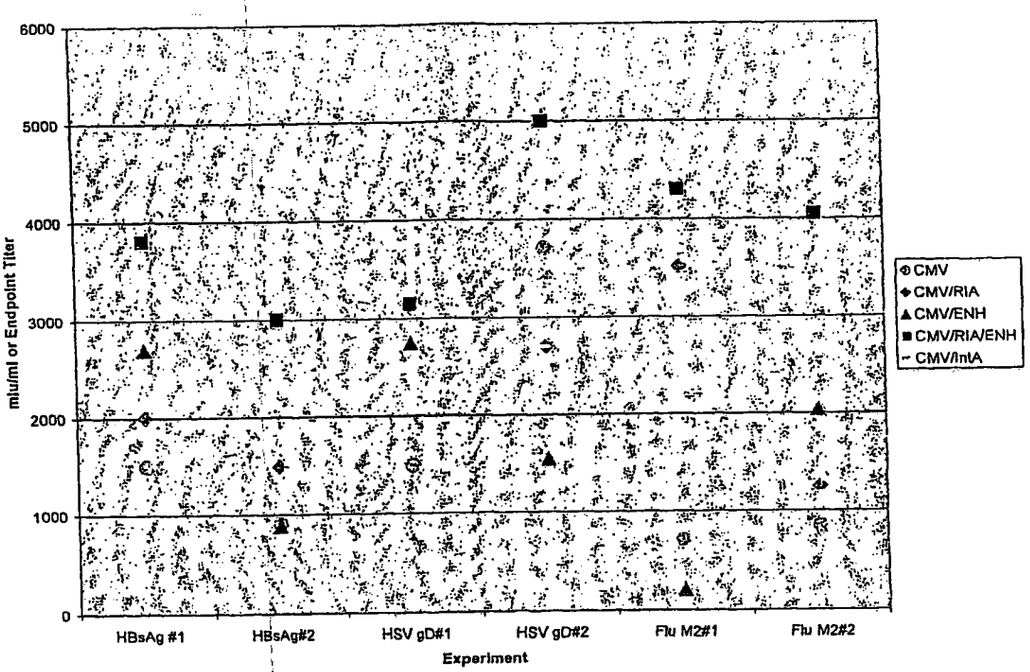

6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
miu/ml or Endpoint Titer
HBsAg #1
HBsAg#2
HSV gD#1
HSV gD#2
Flu M2#1
Flu M2#2
Experiment
CMV
CMV/RIA
CMV/ENH
CMV/RIA/ENH
CMV/IntA

Figure 7

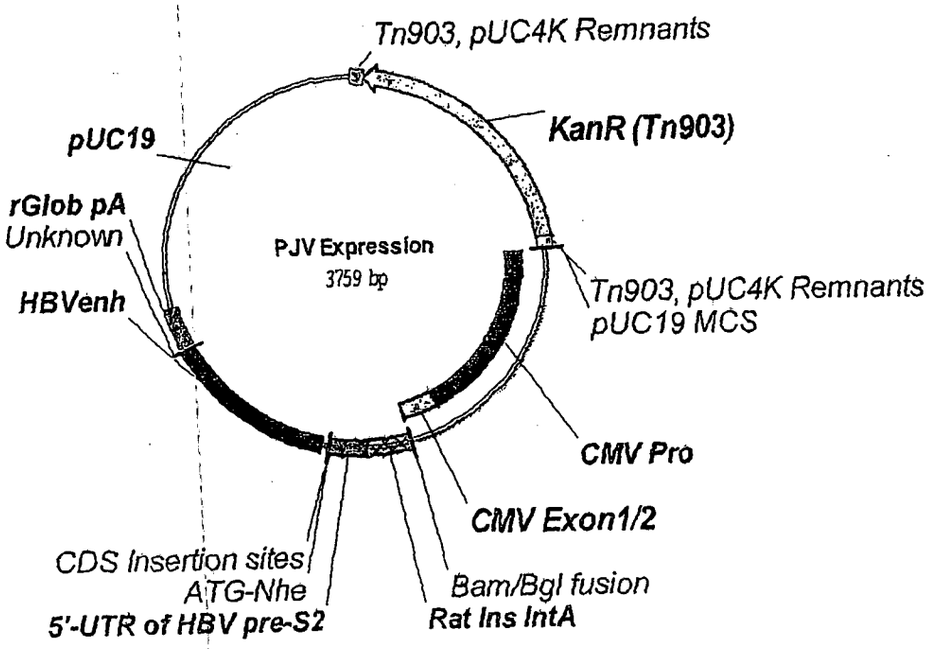

Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
pUC19
rGlob pA
Unknown
HBVenh
PJV Expression
3759 bp
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19 MCS
CMV Pro
CMV Exon1/2
CDS Insertion sites
ATG-Nhe
5'-UTR of HBV pre-S2
Bam/Bgl fusion
Rat Ins IntA

Figure 8

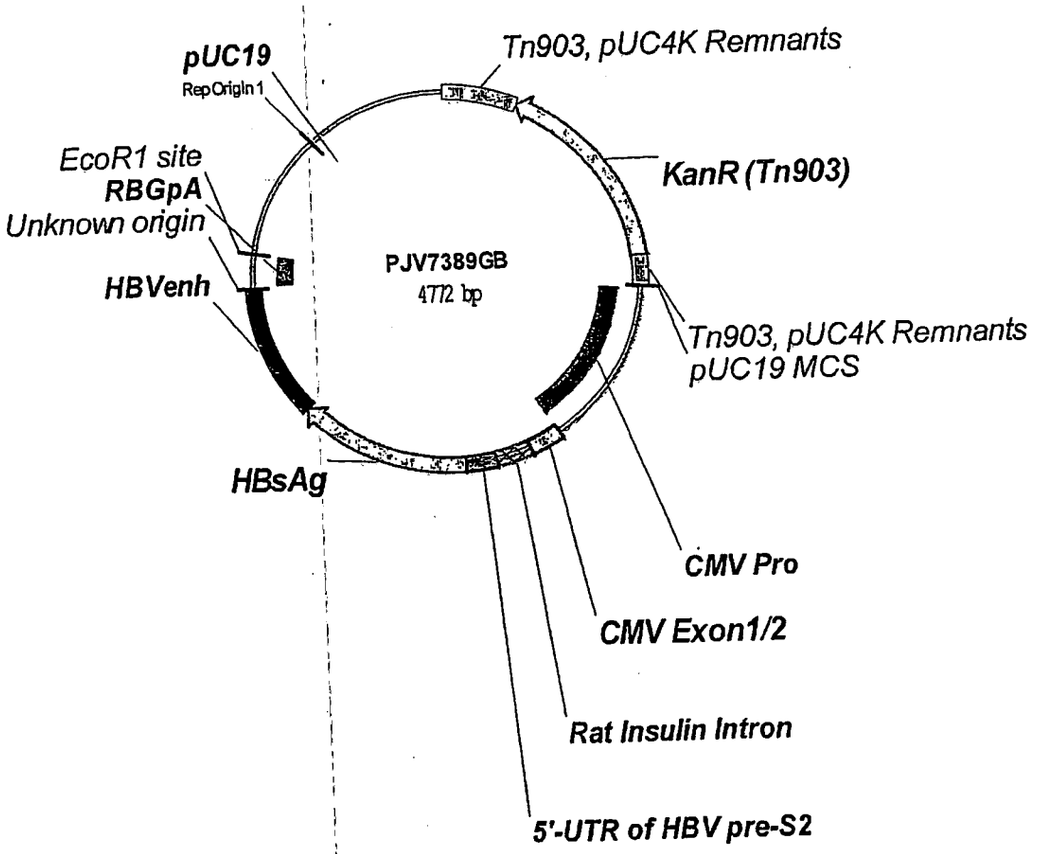

pUC19
RepOrigin1
Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
EcoR1 site
RBGpA
Unknown origin
HBVenh
PJV7389GB
4772 bp
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19 MCS
HBsAg
CMV Pro
CMV Exon1/2
Rat Insulin Intron
5'-UTR of HBV pre-S2

Figure 9

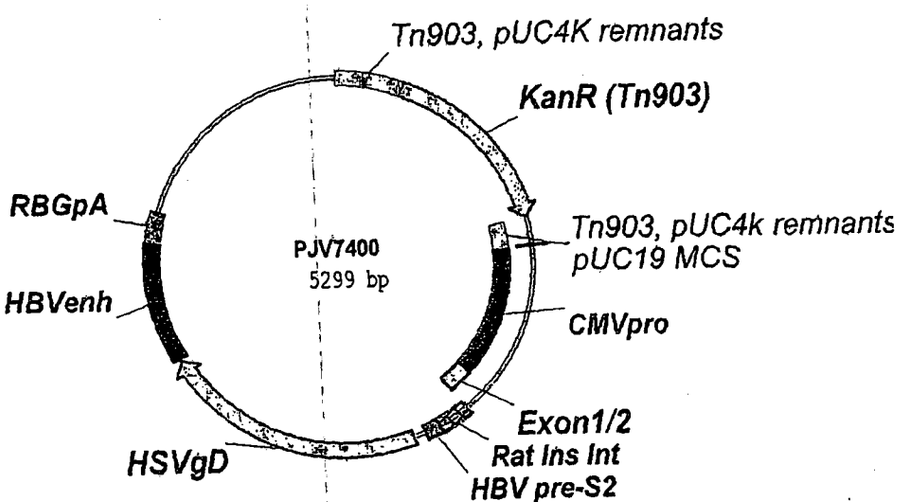

Tn903, pUC4K remnants
KanR (Tn903)
RBGpA
Tn903, pUC4k remnants
pUC19 MCS
PJV7400
5299 bp
HBVenh
CMVpro
Exon1/2
Rat Ins Int
HBV pre-S2
HSVgD

Figure 10

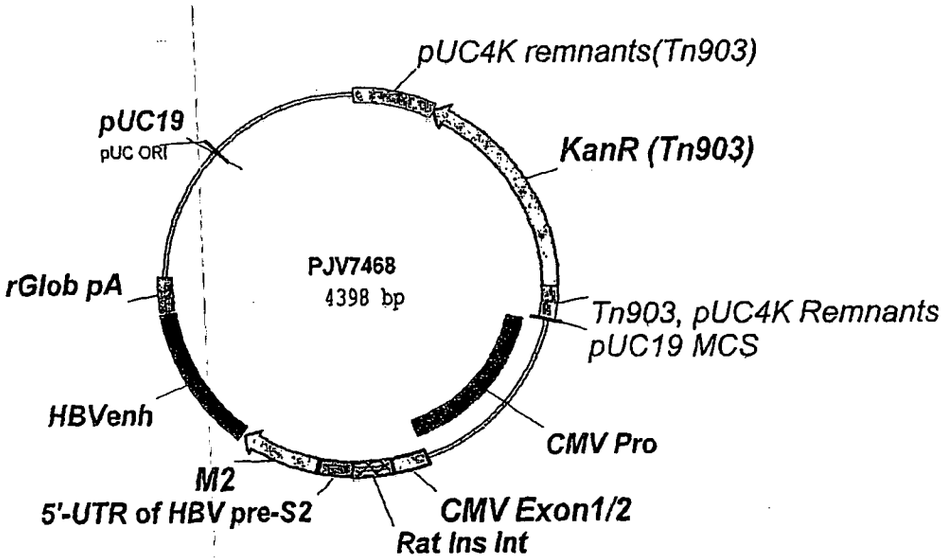

pUC4K remnants(Tn903)
pUC19
pUC ORI
KanR (Tn903)
PJV7468
4398 bp
rGlob pA
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19 MCS
HBVenh
CMV Pro
M2
5'-UTR of HBV pre-S2
CMV Exon1/2
Rat Ins Int

Figure 11

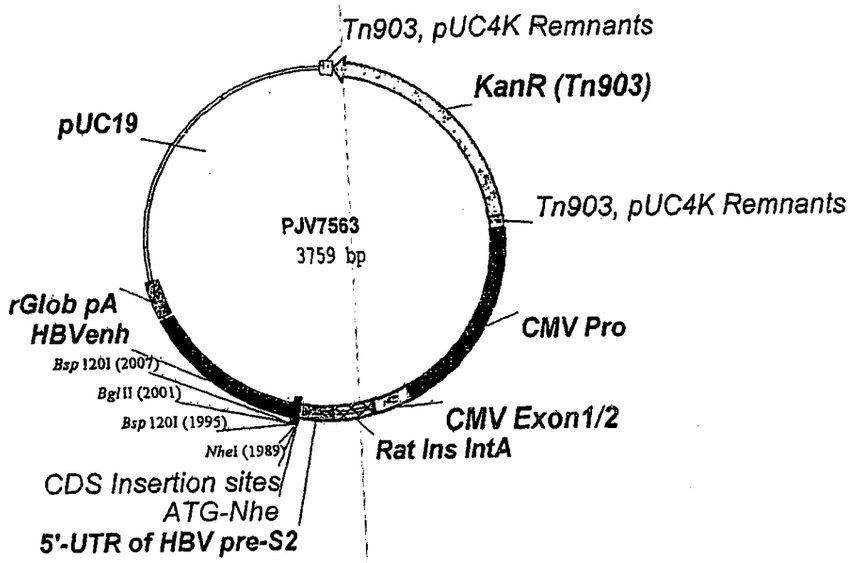

Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, pUC4K Remnants
PJV7563
3759 bp
rGlob pA
HBVenh
CMV Pro
Bsp 1201 (2007)
Bgl II (2001)
Bsp 1201 (1995)
CMV Exon1/2
Rat Ins IntA
NheI (1989)
CDS Insertion sites
ATG-Nhe
5'-UTR of HBV pre-S2

Figure 12

Figure 13

ggcgtaatgctctgccagtgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat
caggattatcaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcc
tggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatca
ccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagcttatgcatttctttccagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtc
atcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgctgttaaaaggacaa
ttacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaata
cctggaatgctgttttccccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagag
gcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctgg
cgcatcgggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcat
ccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacacccttgtattactgtttatgtaagcaga
caggtcgacaatattggctattggccattgcatacgttgtatctatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgcca
tgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataactta
cggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaata
gggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtccgcc
ccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttacgggactttcctacttggcagtacatct
acgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacaccaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttcca
agtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaataaccccgccccgtt
gacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgc
catccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggccgggaacggtgcattggaacgcggattc
cccgtgccaagagtgactcaccgtccggatctcagcaagcaggtatgtactctccagggtgggcctggcttccccagtcaagactc
cagggatttgagggacgctgtgggctcttctcttacatgtacctttgcttgcctcaaccctgactatcttccaggtcaggatcccagag
tcaggggtctgtattttcctgctggtggctccagttcaggaacagtaaaccctgctccgaatattgcctctcacatctcgtcaatctccg
cgaggactggggaccctgtgacgaacatggctagcgggcccagatctgggccctaacaaaacaaaaagatggggttattccctaa
acttcatgggttacgtaattggaagttgggggacattgccacaagatcatattgtacaaaagatcaaacactgttttagaaaacttcctg
taaacaggcctattgattggaaagtatgtcaaaggattgtgggtcttttgggctttgctgctccatttacacaatgtggatatcctgcctta
atgcctttgtatgcatgtatacaagctaaacaggctttcactttctcgccaacttacaaggcctttctaagtaaacagtacatgaacctta
ccccgttgctcggcaacggcctggtctgtgccaagtgtttgctgacgcaaccccccactggctggggcttggccataggccatcagc
gcatgcgtggaaccttgtggctcctctgccgatccatactgcggaactcctagccgcttgttttgctcgcagccggtctggagcaaa
gctcataggaactgacaattctgtcgtcctctcgcggaaatatacatcgtttcgatctacgtatgatcttttccctctgccaaaaattatg
gggacatcatgaagccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttattttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctct
cactcggaaggaattctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctc
actgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcagg
ggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaggccgcgttgctggcgttttcca
taggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataccca
ggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaa
gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
cgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc
cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaa
gaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgc
tggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtct
gacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaa
tgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatct
gtctatttcgttcatccatagttgcctgactc

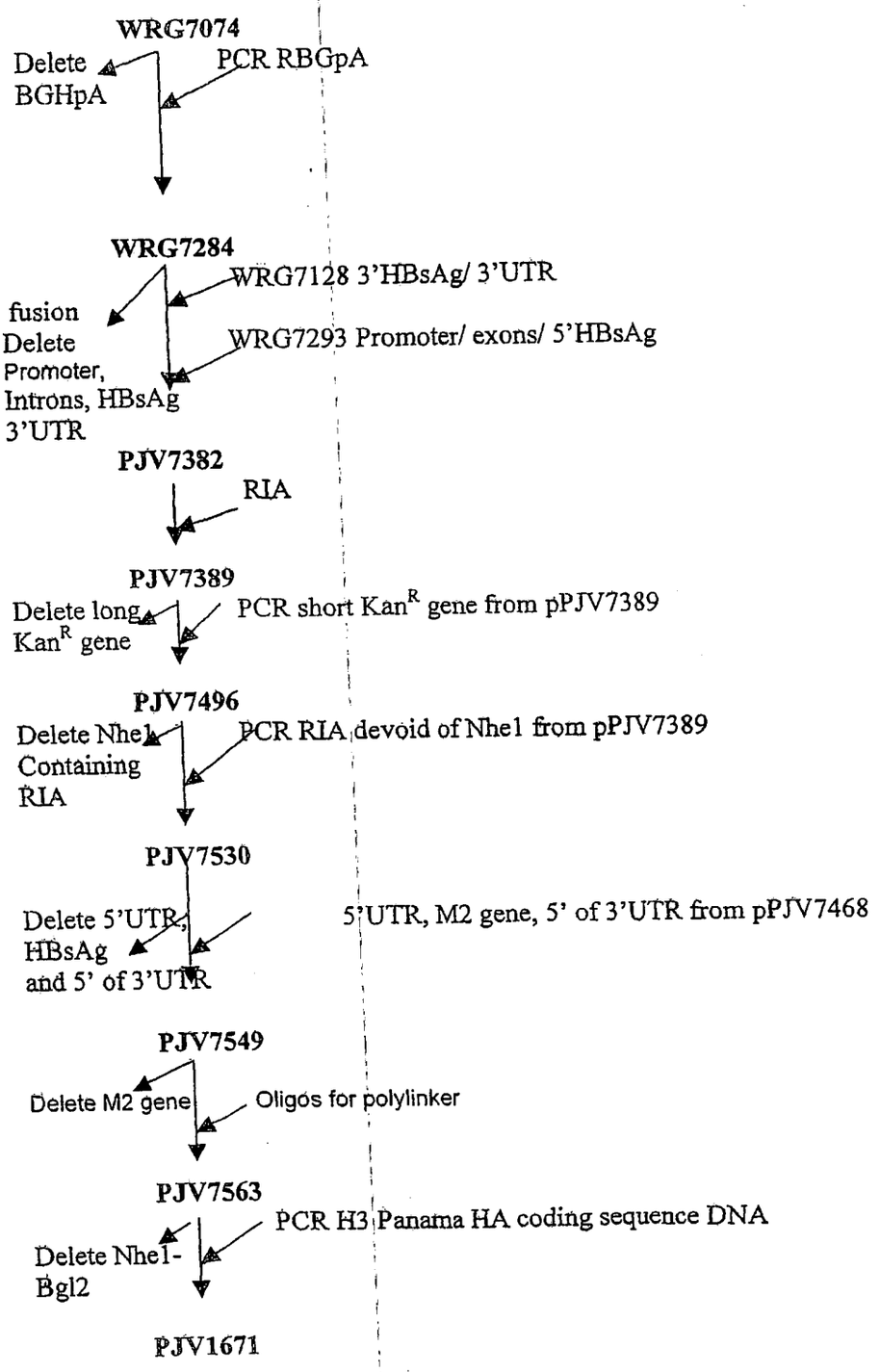

WRG7074
Delete BGHpA
PCR RBGpA
WRG7284
WRG7128 3'HBsAg/ 3'UTR
fusion
Delete Promoter, Introns, HBsAg 3'UTR
WRG7293 Promoter/ exons/ 5'HBsAg
PJV7382
RIA
PJV7389
Delete long Kan^R gene
PCR short Kan^R gene from pPJV7389
PJV7496
Delete Nhe1 Containing RIA
PCR RIA devoid of Nhe1 from pPJV7389
PJV7530
Delete 5'UTR, HBsAg and 5' of 3'UTR
5'UTR, M2 gene, 5' of 3'UTR from pPJV7468
PJV7549
Delete M2 gene
Oligos for polylinker
PJV7563
Delete Nhe1-Bgl2
PCR H3 Panama HA coding sequence DNA
PJV1671

Figure 14

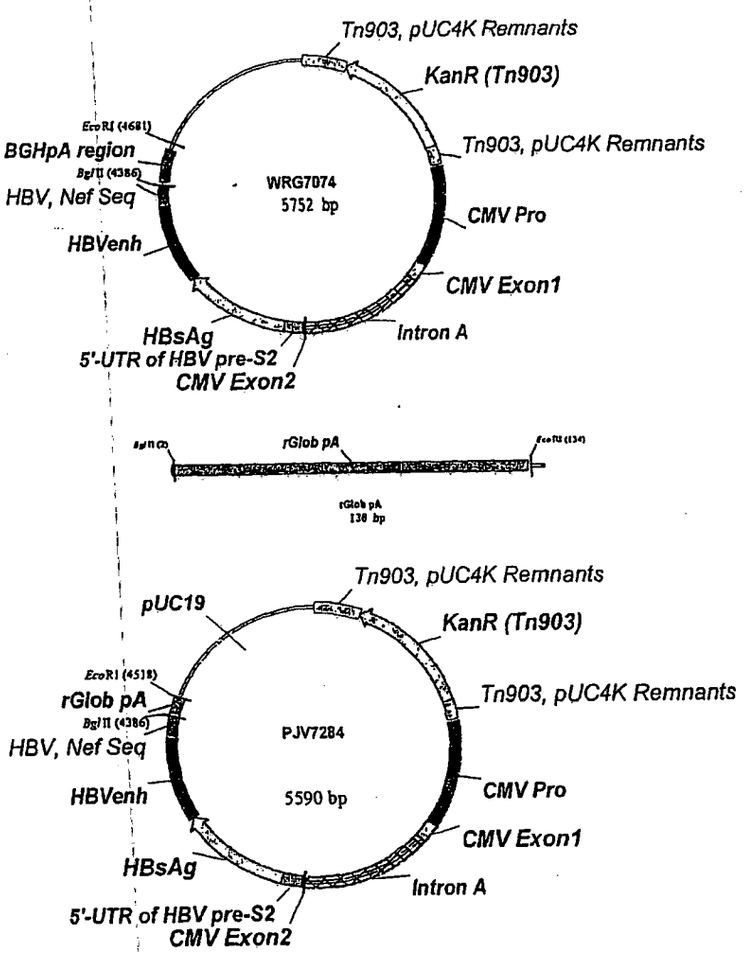

Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
EcoRI (4681)
BGHpA region
BglII (4386)
HBV, Nef Seq
WRG7074
5752 bp
Tn903, pUC4K Remnants
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1
HBsAg
Intron A
5'-UTR of HBV pre-S2
CMV Exon2
rGlob pA
rGlob pA
138 bp
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
EcoRI (4518)
rGlob pA
BglII (4386)
HBV, Nef Seq
PJV7284
5590 bp
Tn903, pUC4K Remnants
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1
HBsAg
Intron A
5'-UTR of HBV pre-S2
CMV Exon2

Figure 15(a)

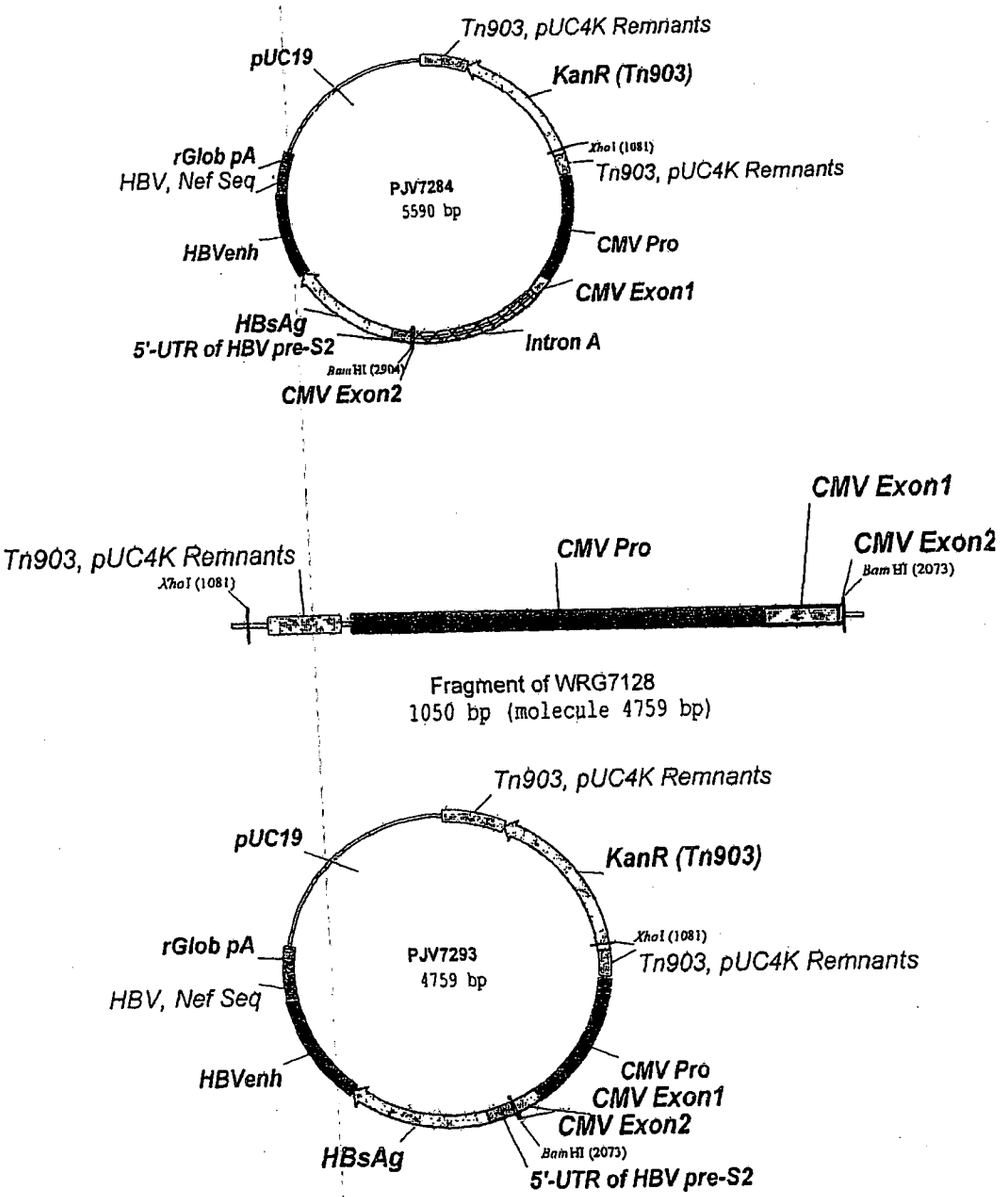

Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
XhoI (1081)
Tn903, pUC4K Remnants
rGlob pA
HBV, Nef Seq
PJV7284
5590 bp
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1
HBsAg
5'-UTR of HBV pre-S2
Intron A
BamHI (2904)
CMV Exon2
CMV Exon1
Tn903, pUC4K Remnants
CMV Pro
CMV Exon2
XhoI (1081)
BamHI (2073)
Fragment of WRG7128
1050 bp (molecule 4759 bp)
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
rGlob pA
XhoI (1081)
PJV7293
4759 bp
Tn903, pUC4K Remnants
HBV, Nef Seq
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1
CMV Exon2
HBsAg
BamHI (2073)
5'-UTR of HBV pre-S2

Figure 15(b)

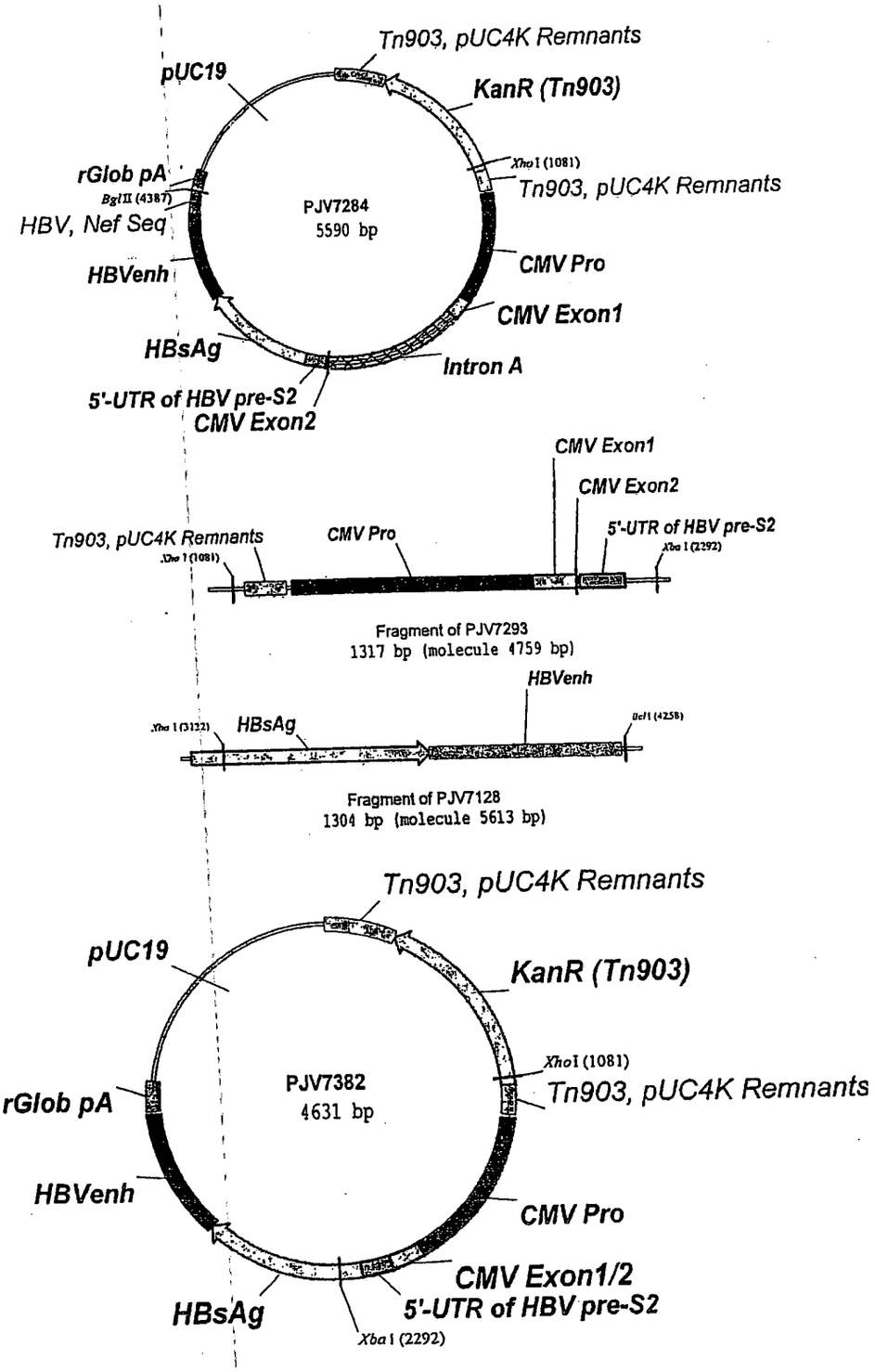

Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
XhoI (1081)
Tn903, pUC4K Remnants
rGlob pA
BglII (4387)
HBV, Nef Seq
PJV7284
5590 bp
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1
HBsAg
Intron A
5'-UTR of HBV pre-S2
CMV Exon2
CMV Exon1
CMV Exon2
Tn903, pUC4K Remnants
CMV Pro
5'-UTR of HBV pre-S2
XhoI (1081)
XbaI (2292)
Fragment of PJV7293
1317 bp (molecule 4759 bp)
HBVenh
XhoI (3122)
HBsAg
BclI (4258)
Fragment of PJV7128
1304 bp (molecule 5613 bp)
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
XhoI (1081)
PJV7382
4631 bp
Tn903, pUC4K Remnants
rGlob pA
HBVenh
CMV Pro
CMV Exon1/2
5'-UTR of HBV pre-S2
HBsAg
XbaI (2292)

Figure 15(c)

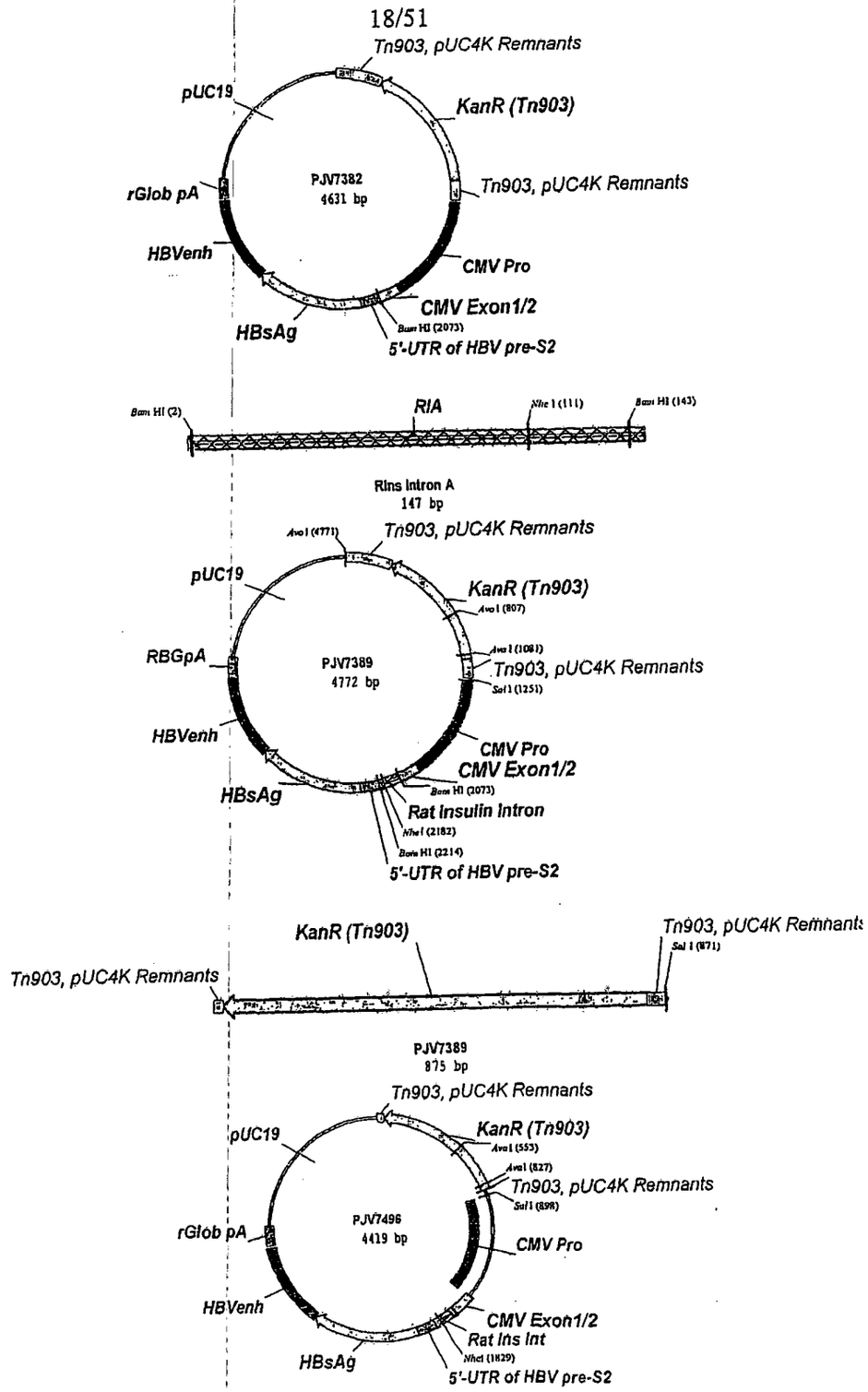

Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
PJV7382
4631 bp
rGlob pA
Tn903, pUC4K Remnants
HBVenh
CMV Pro
CMV Exon1/2
HBsAg
Bam HI (2073)
5'-UTR of HBV pre-S2
Bam HI (2)
RIA
Nhe I (111)
Bam HI (143)
RIns Intron A
147 bp
Ava I (4771)
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
Ava I (807)
RBGpA
PJV7389
4772 bp
Ava I (1081)
Tn903, pUC4K Remnants
Sal I (1251)
HBVenh
CMV Pro
CMV Exon1/2
HBsAg
Bam HI (2073)
Rat Insulin Intron
Nhe I (2182)
Bam HI (2214)
5'-UTR of HBV pre-S2
KanR (Tn903)
Tn903, pUC4K Remnants
Sal I (871)
Tn903, pUC4K Remnants
PJV7389
875 bp
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
Ava I (553)
Ava I (827)
Tn903, pUC4K Remnants
Sal I (898)
rGlob pA
PJV7496
4419 bp
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1/2
Rat Ins Int
HBsAg
Nhe I (1829)
5'-UTR of HBV pre-S2

Figure 15(d)

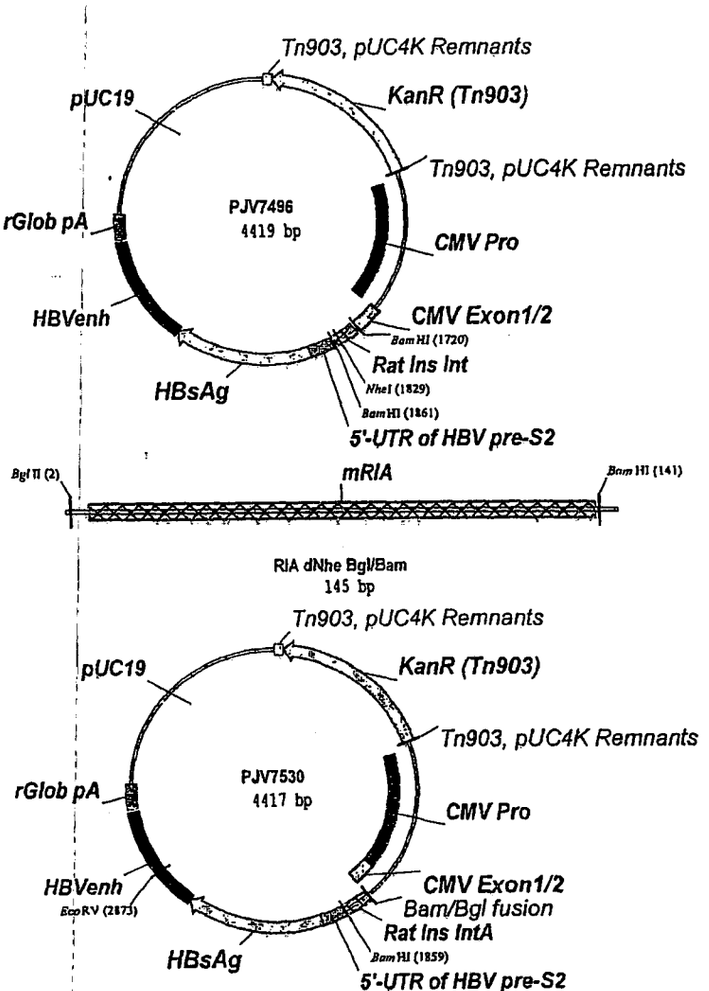

Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, pUC4K Remnants
PJV7496
4419 bp
rGlob pA
CMV Pro
HBVenh
CMV Exon1/2
BamHI (1720)
Rat Ins Int
NheI (1829)
HBsAg
BamHI (1861)
5'-UTR of HBV pre-S2
BglII (2)
mRIA
BamHI (141)
RIA dNhe Bgl/Bam
145 bp
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, pUC4K Remnants
PJV7530
4417 bp
rGlob pA
CMV Pro
HBVenh
EcoRV (2873)
CMV Exon1/2
Bam/Bgl fusion
Rat Ins IntA
HBsAg
BamHI (1859)
5'-UTR of HBV pre-S2

Figure 15(e)

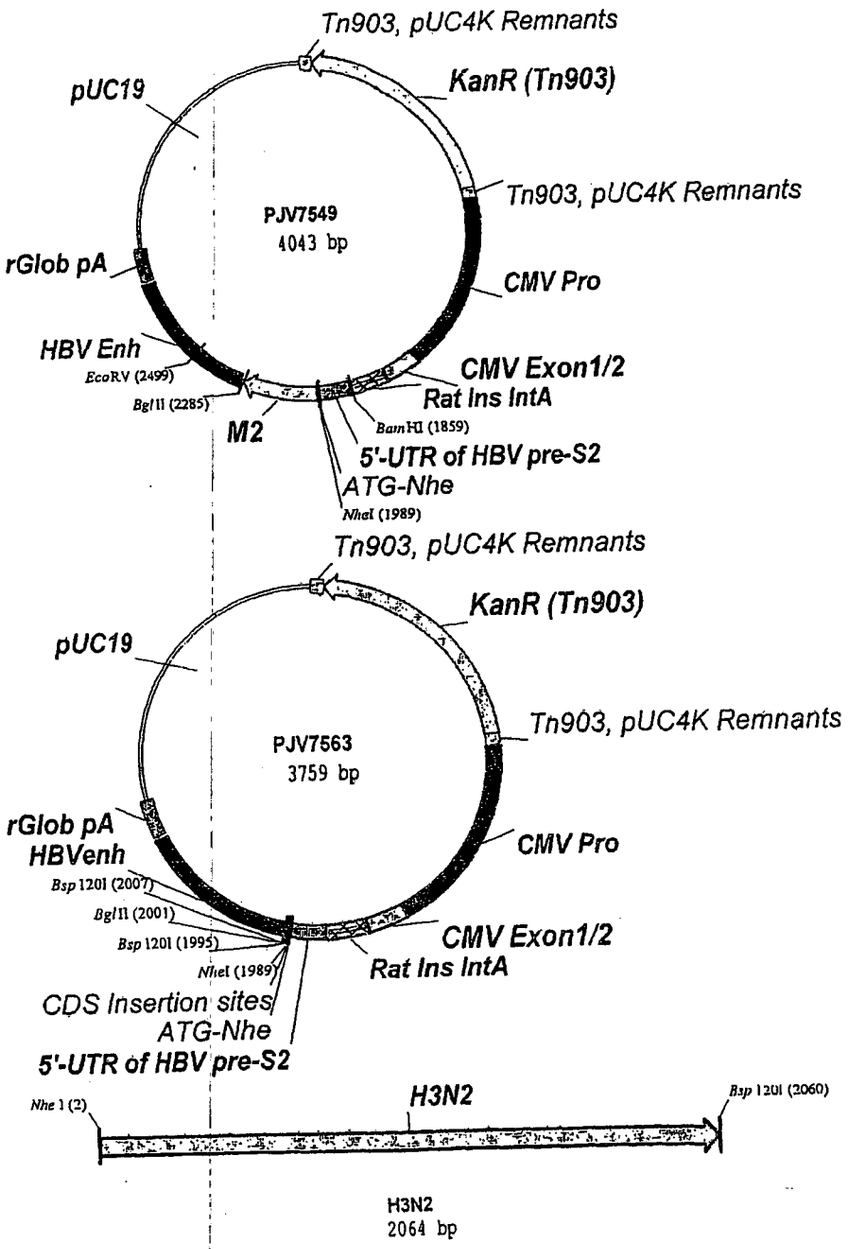
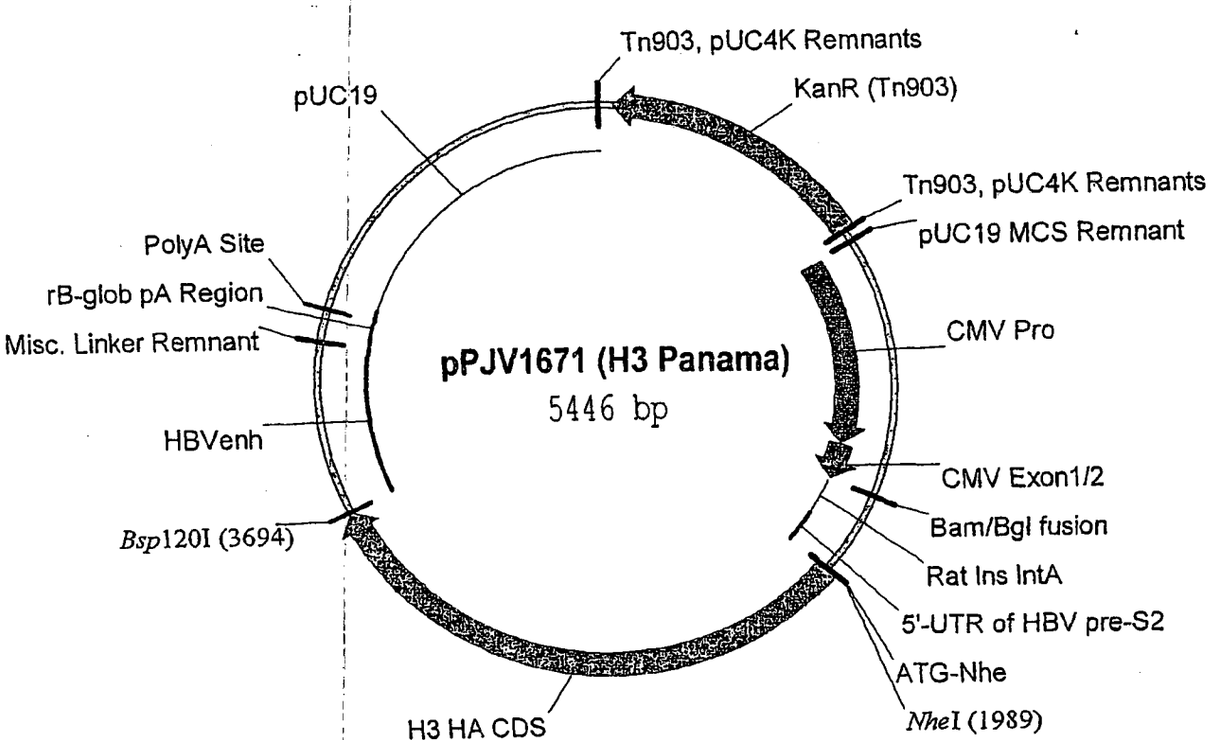

Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, pUC4K Remnants
PJV7549
4043 bp
rGlob pA
CMV Pro
HBV Enh
EcoRV (2499)
CMV Exon1/2
Bgl II (2285)
Rat Ins IntA
M2
BamHI (1859)
5'-UTR of HBV pre-S2
ATG-Nhe
NheI (1989)
Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, pUC4K Remnants
PJV7563
3759 bp
rGlob pA
HBVenh
CMV Pro
Bsp 1201 (2007)
Bgl II (2001)
CMV Exon1/2
Bsp 1201 (1995)
Rat Ins IntA
NheI (1989)
CDS Insertion sites
ATG-Nhe
5'-UTR of HBV pre-S2
H3N2
Nhe 1 (2)
Bsp 1201 (2060)
H3N2
2064 bp

Figure 15(f)




```
                                  (1) 1        10        20        30        40        50        65
H3 Panama HA Natural Sequence     (1) --MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSS
H3 Panama HA Encoded by pPJV1671  (1) MASKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSS
Consensus                         (1)    KTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSS
```

Figure 16

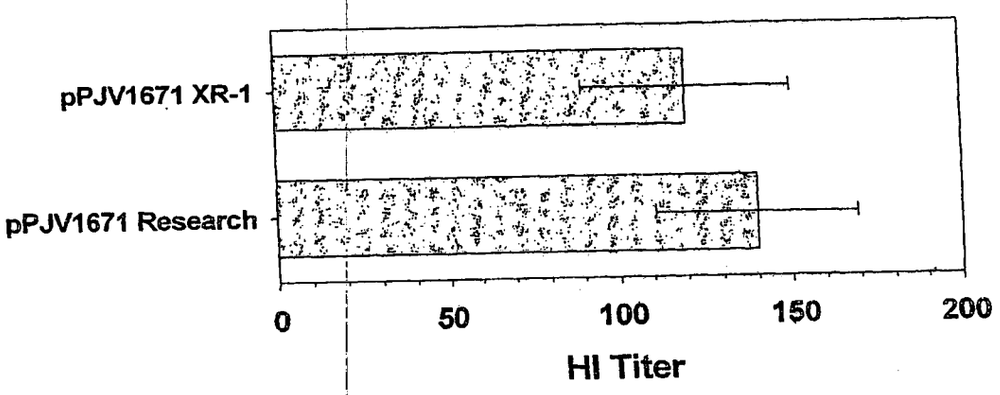


Figure 17

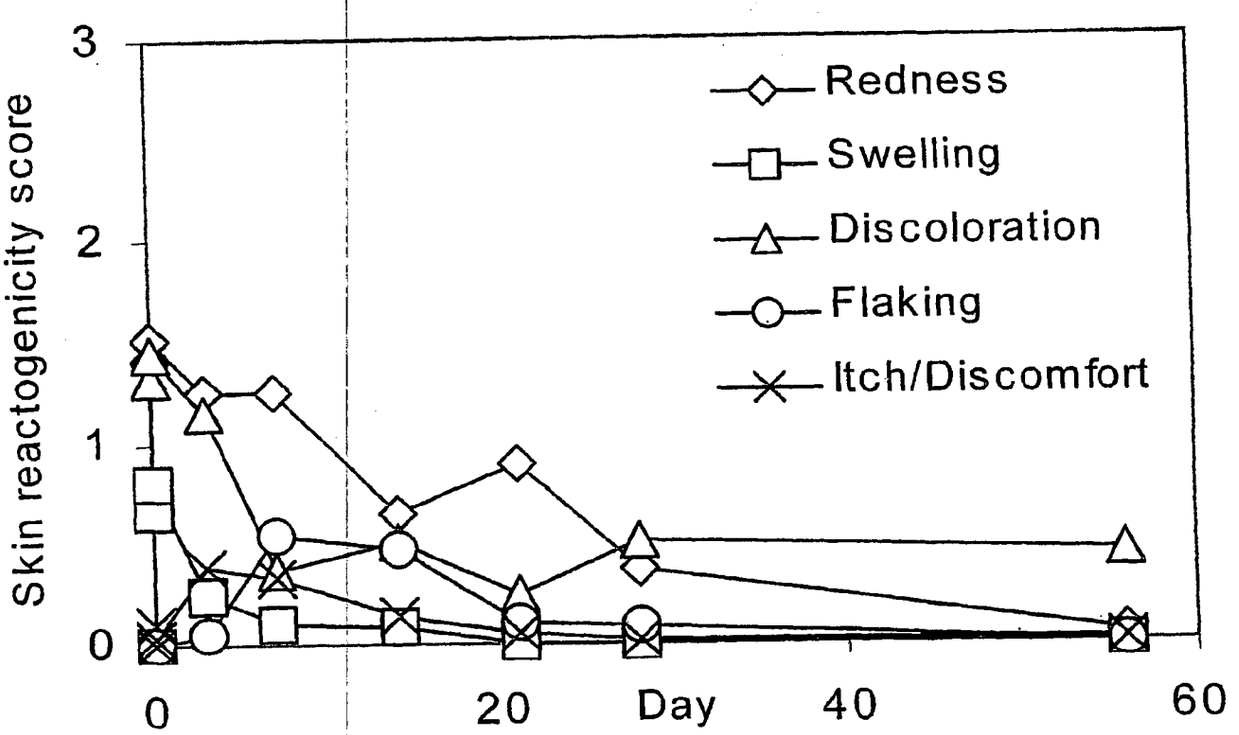

Skin reactogenicity score
3
2
1
0
0
20
Day
40
60
Redness
Swelling
Discoloration
Flaking
Itch/Discomfort

Figure 18

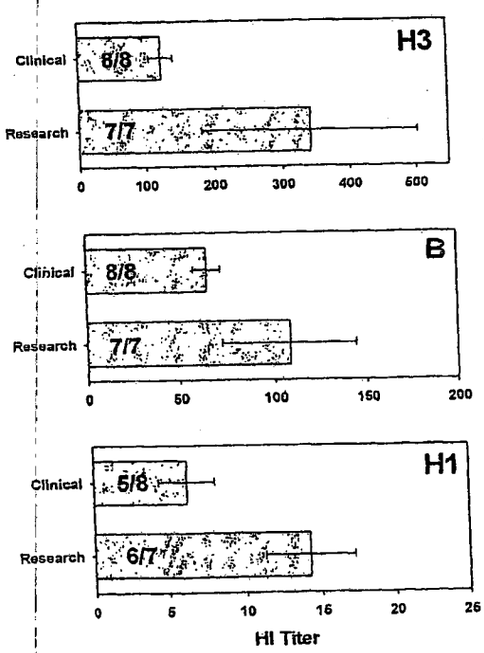

H3
Clinical
5/8
Research
7/7
0
100
200
300
400
500
B
Clinical
8/8
Research
7/7
0
50
100
150
200
H1
Clinical
5/8
Research
6/7
0
5
10
15
20
25
HI Titer

Figure 19

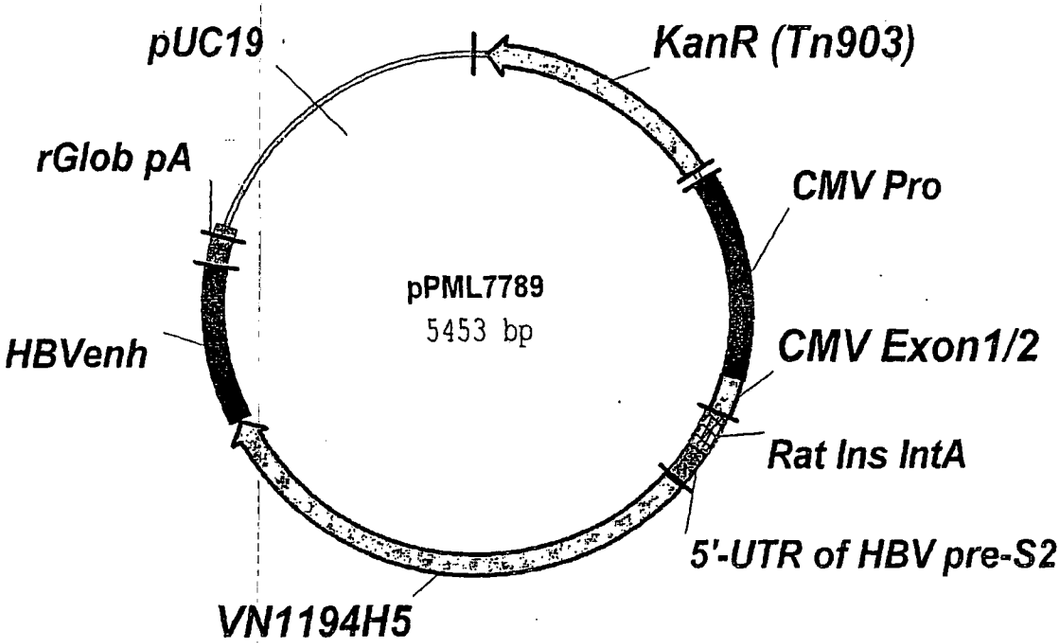

pUC19
KanR (Tn903)
rGlob pA
CMV Pro
pPML7789
5453 bp
HBVenh
CMV Exon1/2
Rat Ins IntA
5'-UTR of HBV pre-S2
VN1194H5

Figure 20

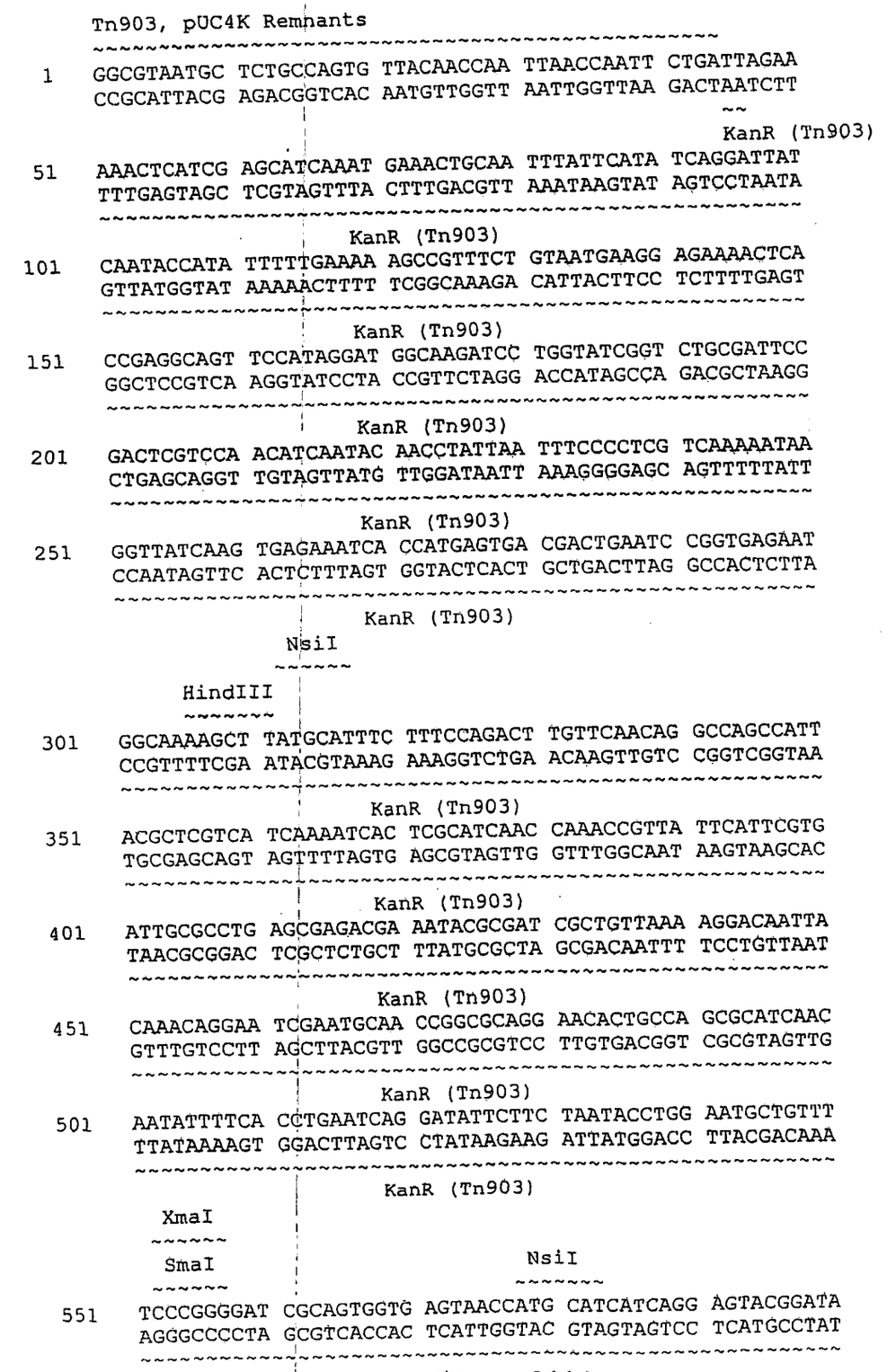

Tn903, pUC4K Remnants
1 GGCGTAATGC TCTGCCAGTG TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA
CCGCATTACG AGACGGTCAC AATGTTGGTT AATTGGTTAA GACTAATCTT
KanR (Tn903)
51 AAACTCATCG AGCATCAAAT GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT
TTTGAGTAGC TCGTAGTTTA CTTTGACGTT AAATAAGTAT AGTCCTAATA
KanR (Tn903)
101 CAATACCATA TTTTTGAAAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAAACTCA
GTTATGGTAT AAAAACTTTT TCGGCAAAGA CATTACTTCC TCTTTTGAGT
KanR (Tn903)
151 CCGAGGCAGT TCCATAGGAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC
GGCTCCGTCA AGGTATCCTA CCGTTCTAGG ACCATAGCCA GACGCTAAGG
KanR (Tn903)
201 GACTCGTCCA ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCCTCG TCAAAAATAA
CTGAGCAGGT TGTAGTTATG TTGGATAATT AAAGGGGAGC AGTTTTTATT
KanR (Tn903)
251 GGTTATCAAG TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CGGTGAGAAT
CCAATAGTTC ACTCTTTAGT GGTACTCACT GCTGACTTAG GCCACTCTTA
KanR (Tn903)
NsiI
HindIII
301 GGCAAAAGCT TATGCATTTC TTTCCAGACT TGTTCAACAG GCCAGCCATT
CCGTTTTCGA ATACGTAAAG AAAGGTCTGA ACAAGTTGTC CGGTCGGTAA
KanR (Tn903)
351 ACGCTCGTCA TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCGTG
TGCGAGCAGT AGTTTTAGTG AGCGTAGTTG GTTTGGCAAT AAGTAAGCAC
KanR (Tn903)
401 ATTGCGCCTG AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTTAAA AGGACAATTA
TAACGCGGAC TCGCTCTGCT TTATGCGCTA GCGACAATTT TCCTGTTAAT
KanR (Tn903)
451 CAAACAGGAA TCGAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC
GTTTGTCCTT AGCTTACGTT GGCCGCGTCC TTGTGACGGT CGCGTAGTTG
KanR (Tn903)
501 AATATTTTCA CCTGAATCAG GATATTCTTC TAATACCTGG AATGCTGTTT
TTATAAAAGT GGACTTAGTC CTATAAGAAG ATTATGGACC TTACGACAAA
KanR (Tn903)
XmaI
SmaI
NsiI
551 TCCCGGGGAT CGCAGTGGTG AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA
AGGGCCCCTA GCGTCACCAC TCATTGGTAC GTAGTAGTCC TCATGCCTAT

Figure 21(a)

```
                        KanR (Tn903)
601   AAATGCTTGA TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT
      TTTACGAACT ACCAGCCTTC TCCGTATTTA AGGCAGTCGG TCAAATCAGA
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                        KanR (Tn903)
651   GACCATCTCA TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA
      CTGGTAGAGT AGACATTGTA GTAACCGTTG CGATGGAAAC GGTACAAAGT
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                        KanR (Tn903)
701   GAAACAACTC TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCGCA
      CTTTGTTGAG ACCGCGTAGC CCGAAGGGTA TGTTAGCTAT CTAACAGCGT
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                        KanR (Tn903)
751   CCTGATTGCC CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC
      GGACTAACGG GCTGTAATAG CGCTCGGGTA AATATGGGTA TATTTAGTCG
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                        KanR (Tn903)
                                XhoI
                                ~~~~~~~
801   ATCCATGTTG GAATTTAATC GCGGCCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA
      TAGGTACAAC CTTAAATTAG CGCCGGAGCT CGTTCTGCAA AGGGCAACTT
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                        KanR (Tn903)
                                                        pUC19 MCS
                                                        ~~~~
                       Tn903, pUC4K Remnants
                     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                        SalI
                                                        ~~~~
                                                        AccI
                                                        ~~~~
851   TATGGCTCAT AACACCCCTT GTATTACTGT TTATGTAAGC AGACAGGTCG
      ATACCGAGTA TTGTGGGGAA CATAATGACA AATACATTCG TCTGTCCAGC
      ~~~~~~~~~~~~
      ..........
                           CMV Pro
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      pUC19 MCS
      ~~
      SalI
      ~~
      AccI
      ~~
901   ACAATATTGG CTATTGGCCA TTGCATACGT TGTATCTATA TCATAATATG
      TGTTATAACC GATAACCGGT AACGTATGCA ACATAGATAT AGTATTATAC
                           CMV Pro
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
951   TACATTTATA TTGGCTCATG TCCAATATGA CCGCCATGTT GACATTGATT
      ATGTAAATAT AACCGAGTAC AGGTTATACT GGCGGTACAA CTGTAACTAA
                           CMV Pro
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
           SpeI
           ~~~~~~~
1001  ATTGACTAGT TATTAATAGT AATCAATTAC GGGGTCATTA GTTCATAGCC
      TAACTGATCA ATAATTATCA TTAGTTAATG CCCCAGTAAT CAAGTATCGG
```

Figure 21(b)

```
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1051    CATATATGGA GTTCCGCGTT ACATAACTTA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC
        GTATATACCT CAAGGCGCAA TGTATTGAAT GCCATTTACC GGGCGGACCG
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1101    TGACCGCCCA ACGACCCCCG CCCATTGACG TCAATAATGA CGTATGTTCC
        ACTGGCGGGT TGCTGGGGGC GGGTAACTGC AGTTATTACT GCATACAAGG
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1151    CATAGTAACG CCAATAGGGA CTTTCCATTG ACGTCAATGG GTGGAGTATT
        GTATCATTGC GGTTATCCCT GAAAGGTAAC TGCAGTTACC CACCTCATAA
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    NdeI
                                                    ~~~~~~~
1201    TACGGTAAAC TGCCCACTTG GCAGTACATC AAGTGTATCA TATGCCAAGT
        ATGCCATTTG ACGGGTGAAC CGTCATGTAG TTCACATAGT ATACGGTTCA
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1251    CCGCCCCCTA TTGACGTCAA TGACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCATTATGC
        GGCGGGGGAT AACTGCAGTT ACTGCCATTT ACCGGGCGGA CCGTAATACG
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1301    CCAGTACATG ACCTTACGGG ACTTTCCTAC TTGGCAGTAC ATCTACGTAT
        GGTCATGTAC TGGAATGCCC TGAAAGGATG AACCGTCATG TAGATGCATA
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                      NcoI
                      ~~~~~~~
1351    TAGTCATCGC TATTACCATG GTGATGCGGT TTTGGCAGTA CACCAATGGG
        ATCAGTAGCG ATAATGGTAC CACTACGCCA AAACCGTCAT GTGGTTACCC
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1401    CGTGGATAGC GGTTTGACTC ACGGGGATTT CCAAGTCTCC ACCCCATTGA
        GCACCTATCG CCAAACTGAG TGCCCCTAAA GGTTCAGAGG TGGGGTAACT
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1451    CGTCAATGGG AGTTTGTTTT GGCACCAAAA TCAACGGGAC TTTCCAAAAT
        GCAGTTACCC TCAAACAAAA CCGTGGTTTT AGTTGCCCTG AAAGGTTTTA
                          CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1501    GTCGTAATAA CCCCGCCCCG TTGACGCAAA TGGGCGGTAG GCGTGTACGG
        CAGCATTATT GGGGCGGGGC AACTGCGTTT ACCCGCCATC CGCACATGCC
                                                    CMV Exon1/2
                                                    ~~~~~~~~~~~~~~~
                      CMV Pro
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                            SacI
                            ~~~~~~~
1551    TGGGAGGTCT ATATAAGCAG AGCTCGTTTA GTGAACCGTC AGATCGCCTG
        ACCCTCCAGA TATATTCGTC TCGAGCAAAT CACTTGGCAG TCTAGCGGAC
                          CMV Exon1/2
                ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
1601    GAGACGCCAT CCACGCTGTT TTGACCTCCA TAGAAGACAC CGGGACCGAT
        CTCTGCGGTA GGTGCGACAA AACTGGAGGT ATCTTCTGTG GCCCTGGCTA
```

Figure 21(c)

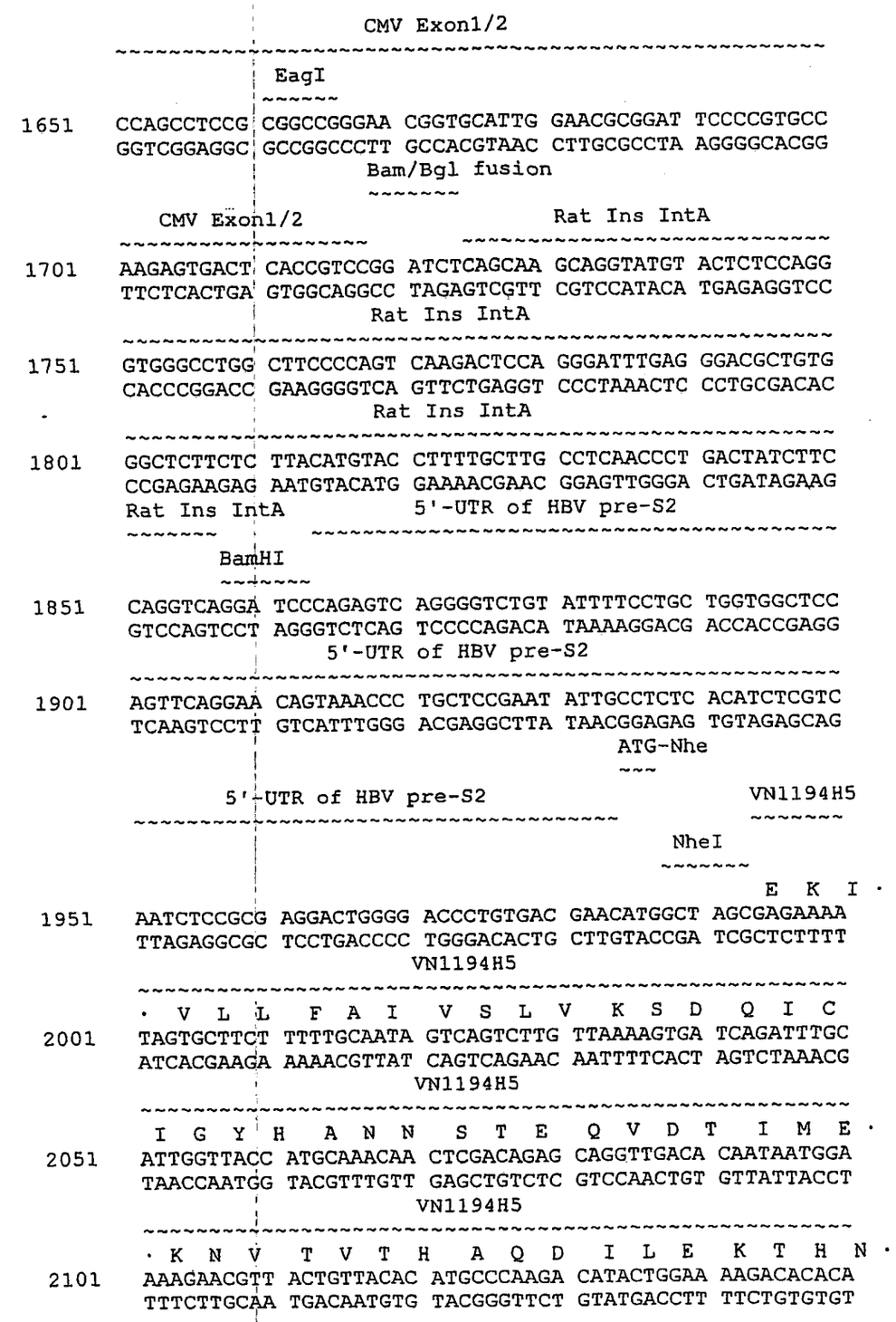

CMV Exon1/2
EagI
1651 CCAGCCTCCG CGGCCGGGAA CGGTGCATTG GAACGCGGAT TCCCCGTGCC
GGTCGGAGGC GCCGGCCCTT GCCACGTAAC CTTGCGCCTA AGGGGCACGG
Bam/Bgl fusion
CMV Exon1/2
Rat Ins IntA
1701 AAGAGTGACT CACCGTCCGG ATCTCAGCAA GCAGGTATGT ACTCTCCAGG
TTCTCACTGA GTGGCAGGCC TAGAGTCGTT CGTCCATACA TGAGAGGTCC
Rat Ins IntA
1751 GTGGGCCTGG CTTCCCCAGT CAAGACTCCA GGGATTTGAG GGACGCTGTG
CACCCGGACC GAAGGGGTCA GTTCTGAGGT CCCTAAACTC CCTGCGACAC
Rat Ins IntA
1801 GGCTCTTCTC TTACATGTAC CTTTTGCTTG CCTCAACCCT GACTATCTTC
CCGAGAAGAG AATGTACATG GAAAACGAAC GGAGTTGGGA CTGATAGAAG
Rat Ins IntA
5'-UTR of HBV pre-S2
BamHI
1851 CAGGTCAGGA TCCCAGAGTC AGGGGTCTGT ATTTTCCTGC TGGTGGCTCC
GTCCAGTCCT AGGGTCTCAG TCCCCAGACA TAAAAGGACG ACCACCGAGG
5'-UTR of HBV pre-S2
1901 AGTTCAGGAA CAGTAAACCC TGCTCCGAAT ATTGCCTCTC ACATCTCGTC
TCAAGTCCTT GTCATTTGGG ACGAGGCTTA TAACGGAGAG TGTAGAGCAG
ATG-Nhe
5'-UTR of HBV pre-S2
VN1194H5
NheI
E K I
1951 AATCTCCGCG AGGACTGGGG ACCCTGTGAC GAACATGGCT AGCGAGAAAA
TTAGAGGCGC TCCTGACCCC TGGGACACTG CTTGTACCGA TCGCTCTTTT
VN1194H5
V L L F A I V S L V K S D Q I C
2001 TAGTGCTTCT TTTTGCAATA GTCAGTCTTG TTAAAAGTGA TCAGATTTGC
ATCACGAAGA AAAACGTTAT CAGTCAGAAC AATTTTCACT AGTCTAAACG
VN1194H5
I G Y H A N N S T E Q V D T I M E
2051 ATTGGTTACC ATGCAAACAA CTCGACAGAG CAGGTTGACA CAATAATGGA
TAACCAATGG TACGTTTGTT GAGCTGTCTC GTCCAACTGT GTTATTACCT
VN1194H5
K N V T V T H A Q D I L E K T H N
2101 AAAGAACGTT ACTGTTACAC ATGCCCAAGA CATACTGGAA AAGACACACA
TTTCTTGCAA TGACAATGTG TACGGGTTCT GTATGACCTT TTCTGTGTGT

Figure 21(d)

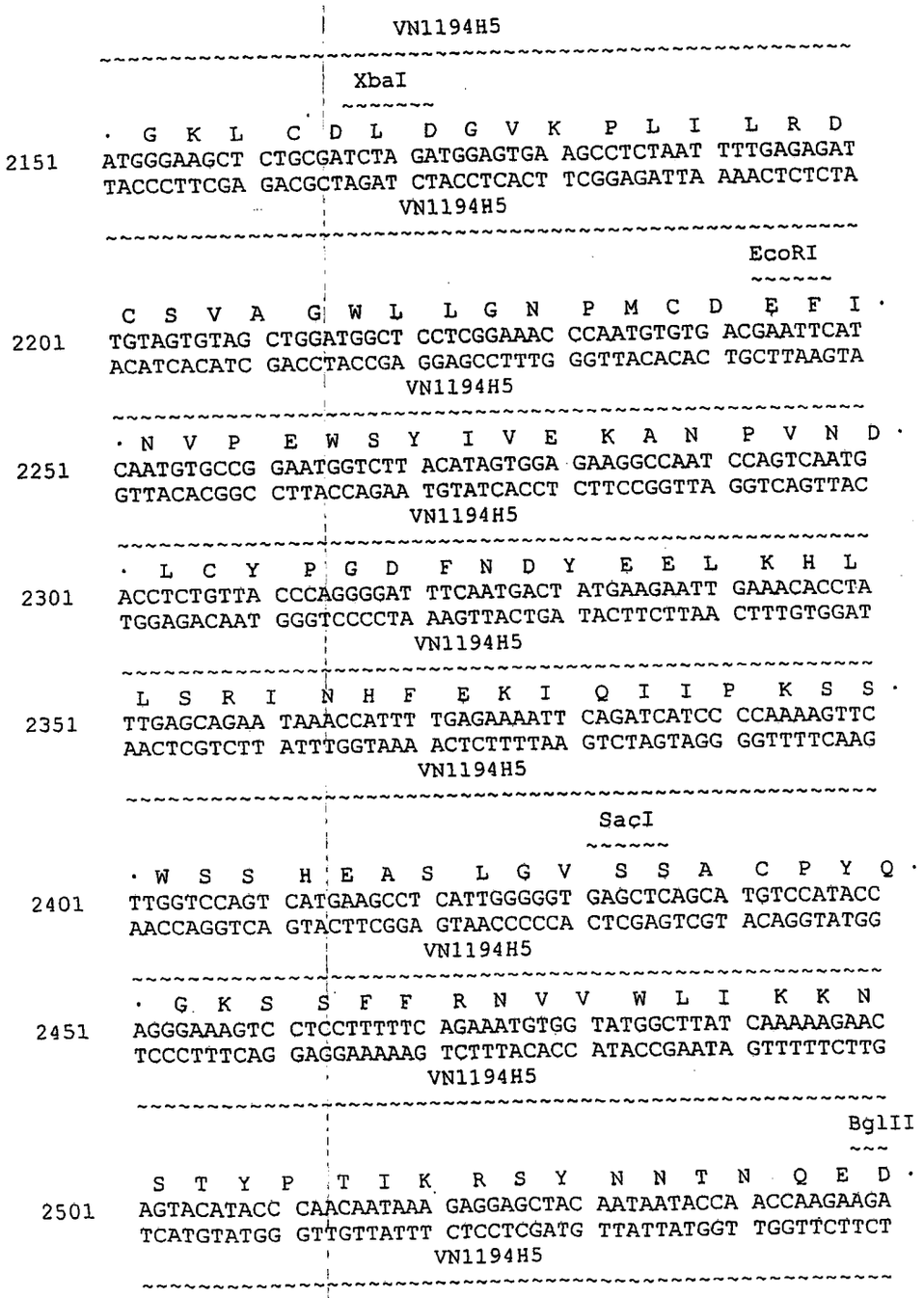

VN1194H5
XbaI
· G K L C D L D G V K P L I L R D
2151 ATGGGAAGCT CTGCGATCTA GATGGAGTGA AGCCTCTAAT TTTGAGAGAT
TACCCTTCGA GACGCTAGAT CTACCTCACT TCGGAGATTA AAACTCTCTA
VN1194H5
EcoRI
C S V A G W L L G N P M C D E F I ·
2201 TGTAGTGTAG CTGGATGGCT CCTCGGAAAC CCAATGTGTG ACGAATTCAT
ACATCACATC GACCTACCGA GGAGCCTTTG GGTTACACAC TGCTTAAGTA
VN1194H5
· N V P E W S Y I V E K A N P V N D ·
2251 CAATGTGCCG GAATGGTCTT ACATAGTGGA GAAGGCCAAT CCAGTCAATG
GTTACACGGC CTTACCAGAA TGTATCACCT CTTCCGGTTA GGTCAGTTAC
VN1194H5
· L C Y P G D F N D Y E E L K H L
2301 ACCTCTGTTA CCCAGGGGAT TTCAATGACT ATGAAGAATT GAAACACCTA
TGGAGACAAT GGGTCCCCTA AAGTTACTGA TACTTCTTAA CTTTGTGGAT
VN1194H5
L S R I N H F E K I Q I I P K S S ·
2351 TTGAGCAGAA TAAACCATTT TGAGAAAATT CAGATCATCC CCAAAAGTTC
AACTCGTCTT ATTTGGTAAA ACTCTTTTAA GTCTAGTAGG GGTTTTCAAG
VN1194H5
SacI
· W S S H E A S L G V S S A C P Y Q ·
2401 TTGGTCCAGT CATGAAGCCT CATTGGGGGT GAGCTCAGCA TGTCCATACC
AACCAGGTCA GTACTTCGGA GTAACCCCCA CTCGAGTCGT ACAGGTATGG
VN1194H5
· G K S S F F R N V V W L I K K N
2451 AGGGAAAGTC CTCCTTTTTC AGAAATGTGG TATGGCTTAT CAAAAAGAAC
TCCCTTTCAG GAGGAAAAAG TCTTTACACC ATACCGAATA GTTTTTCTTG
VN1194H5
BglII
S T Y P T I K R S Y N N T N Q E D ·
2501 AGTACATACC CAACAATAAA GAGGAGCTAC AATAATACCA ACCAAGAAGA
TCATGTATGG GTTGTTATTT CTCCTCGATG TTATTATGGT TGGTTCTTCT
VN1194H5

Figure 21(e)

```
      BglII
      ~~~
      · L  L  V   L  W  G  I   H  H  P   N  D  A   A  E  Q  T ·
2551  TCTTTTGGTA CTGTGGGGGA TTCACCATCC TAATGATGCG GCAGAGCAGA
      AGAAAACCAT GACACCCCCT AAGTGGTAGG ATTACTACGC CGTCTCGTCT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · K  L  Y   Q  N  P   T  T  Y  I   S  V  G   T  S  T
2601  CAAAGCTCTA TCAAAACCCA ACCACCTATA TTTCCGTTGG GACATCAACA
      GTTTCGAGAT AGTTTTGGGT TGGTGGATAT AAAGGCAACC CTGTAGTTGT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       L  N  Q  R   L  V  P   R  I  A   T  R  S  K   V  N  G ·
2651  CTAAACCAGA GATTGGTACC AAGAATAGCT ACTAGATCCA AAGTAAACGG
      GATTTGGTCT CTAACCATGG TTCTTATCGA TGATCTAGGT TTCATTTGCC
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · Q  S  G   R  M  E  F   F  W  T   I  L  K   P  N  D  A ·
2701  GCAAAGTGGA AGGATGGAGT TCTTCTGGAC AATTTTAAAA CCGAATGATG
      CGTTTCACCT TCCTACCTCA AGAAGACCTG TTAAAATTTT GGCTTACTAC
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    NsiI
                                                    ~~~~~~
      · I  N  F   E  S  N   G  N  F  I   A  P  E   Y  A  Y
2751  CAATCAACTT CGAGAGTAAT GGAAATTTCA TTGCTCCAGA ATATGCATAC
      GTTAGTTGAA GCTCTCATTA CCTTTAAAGT AACGAGGTCT TATACGTATG
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       K  I  V  K   K  G  D   S  T  I   M  K  S   E  L  E  Y ·
2801  AAAATTGTCA AGAAAGGGGA CTCAACAATT ATGAAAAGTG AATTGGAATA
      TTTTAACAGT TCTTTCCCCT GAGTTGTTAA TACTTTTCAC TTAACCTTAT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · G  N  C   N  T  K  C   Q  T  P   M  G  A   I  N  S  S ·
2851  TGGTAACTGC AACACCAAGT GTCAAACTCC AATGGGGGCG ATAAACTCTA
      ACCATTGACG TTGTGGTTCA CAGTTTGAGG TTACCCCCGC TATTTGAGAT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       SphI
       ~~~~~~
      · M  P  F   H  N  I   H  P  L  T   I  G  E   C  P  K
2901  GCATGCCATT CCACAATATA CACCCTCTCA CCATCGGGGA ATGCCCCAAA
      CGTACGGTAA GGTGTTATAT GTGGGAGAGT GGTAGCCCCT TACGGGGTTT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       Y  V  K  S   N  R  L   V  L  A   T  G  L   R  N  S  P ·
2951  TATGTGAAAT CAAACAGATT AGTCCTTGCG ACTGGGCTCA GAAATAGCCC
      ATACACTTTA GTTTGTCTAA TCAGGAACGC TGACCCGAGT CTTTATCGGG
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · Q  R  E   R  R  R  K   K  R  G   L  F  G   A  I  A  G ·
3001  TCAAAGAGAG AGAAGAAGAA AAAAGAGAGG ATTATTTGGA GCTATAGCAG
      AGTTTCTCTC TCTTCTTCTT TTTTCTCTCC TAATAAACCT CGATATCGTC
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
```

Figure 21(f)

```
        · F  I  E  G  G  W  Q  G  M  V  D  G  W  Y  G  Y
3051    GTTTTATAGA GGGAGGATGG CAGGGAATGG TAGATGGTTG GTATGGGTAC
        CAAAATATCT CCCTCCTACC GTCCCTTACC ATCTACCAAC CATACCCATG
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                PstI
                                                ~~~~~~
         H  H  S  N  E  Q  G  S  G  Y  A  A  D  K  E  S  T ·
3101    CACCATAGCA ACGAGCAGGG GAGTGGGTAC GCTGCAGACA AAGAATCCAC
        GTGGTATCGT TGCTCGTCCC CTCACCCATG CGACGTCTGT TTCTTAGGTG
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        · Q  K  A  I  D  G  V  T  N  K  V  N  S  I  I  D  K ·
3151    TCAAAAGGCA ATAGATGGAG TCACCAATAA GGTCAACTCG ATTATTGACA
        AGTTTTCCGT TATCTACCTC AGTGGTTATT CCAGTTGAGC TAATAACTGT
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        · M  N  T  Q  F  E  A  V  G  R  E  F  N  N  L  E
3201    AAATGAACAC TCAGTTTGAG GCCGTTGGAA GGGAATTTAA CAACTTAGAA
        TTTACTTGTG AGTCAAACTC CGGCAACCTT CCCTTAAATT GTTGAATCTT
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
         R  R  I  E  N  L  N  K  K  M  E  D  G  F  L  D  V ·
3251    AGGAGAATAG AGAATTTAAA CAAGAAGATG GAAGACGGGT TCCTAGATGT
        TCCTCTTATC TCTTAAATTT GTTCTTCTAC CTTCTGCCCA AGGATCTACA
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                        XbaI
                                                        ~~
        · W  T  Y  N  A  E  L  L  V  L  M  E  N  E  R  T  L ·
3301    CTGGACTTAT AATGCTGAAC TTCTAGTTCT CATGGAAAAC GAGAGAACTC
        GACCTGAATA TTACGACTTG AAGATCAAGA GTACCTTTTG CTCTCTTGAG
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        XbaI
        ~~~~
        · D  F  H  D  S  N  V  K  N  L  Y  D  K  V  R  L
3351    TAGACTTTCA TGACTCAAAT GTCAAGAACC TTTACGACAA GGTCCGACTA
        ATCTGAAAGT ACTGAGTTTA CAGTTCTTGG AAATGCTGTT CCAGGCTGAT
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
         Q  L  R  D  N  A  K  E  L  G  N  G  C  F  E  F  Y ·
3401    CAGCTTAGGG ATAATGCAAA GGAGCTGGGT AACGGTTGTT TCGAGTTCTA
        GTCGAATCCC TATTACGTTT CCTCGACCCA TTGCCAACAA AGCTCAAGAT
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        · H  K  C  D  N  E  C  M  E  S  V  R  N  G  T  Y  D ·
3451    TCATAAATGT GATAATGAAT GTATGGAAAG TGTAAGAAAC GGAACGTATG
        AGTATTTACA CTATTACTTA CATACCTTTC ACATTCTTTG CCTTGCATAC
                                VN1194H5
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
        · Y  P  Q  Y  S  E  E  A  R  L  K  R  E  E  I  S
3501    ACTACCCGCA GTATTCAGAA GAAGCAAGAC TAAAAAGAGA GGAAATAAGT
        TGATGGGCGT CATAAGTCTT CTTCGTTCTG ATTTTTCTCT CCTTTATTCA
                                VN1194H5
```

Figure 21(g)

```
                                                                  G  V  K  L    E  S  I    G  I  Y    Q  I  L  S    I  Y  S  ·
3551  GGAGTAAAAT TGGAATCAAT AGGAATTTAC CAAATATTGT CAATTTATTC
      CCTCATTTTA ACCTTAGTTA TCCTTAAATG GTTTATAACA GTTAAATAAG
                                  VN1194H5
                                                                  SacI
                                                                  ~~~~~~~
                                                                  ·  T  V  A    S  S  L  A    L  A  I    M  V  A    G  L  S  L  ·
3601  TACAGTGGCG AGCTCCCTAG CACTGGCAAT CATGGTAGCT GGTCTATCCT
      ATGTCACCGC TCGAGGGATC GTGACCGTTA GTACCATCGA CCAGATAGGA
                                  VN1194H5
                                                                                                                    Bspl20I
                                                                                                                    ~
                                                                  ·  W  M  C    S  N  G    S  L  Q  C    R  I  C    I
3651  TATGGATGTG CTCCAATGGG TCGTTACAAT GCAGAATTTG CATTTAAATG
      ATACCTACAC GAGGTTACCC AGCAATGTTA CGTCTTAAAC GTAAATTTAC
                                    HBVenh
                                                                  Bspl20I
                                                                  ~~~~~
3701  GGCCCTAACA AAACAAAAAG ATGGGGTTAT TCCCTAAACT TCATGGGTTA
      CCGGGATTGT TTTGTTTTTC TACCCCAATA AGGGATTTGA AGTACCCAAT
                                    HBVenh
3751  CGTAATTGGA AGTTGGGGGA CATTGCCACA AGATCATATT GTACAAAAGA
      GCATTAACCT TCAACCCCCT GTAACGGTGT TCTAGTATAA CATGTTTTCT
                                    HBVenh
3801  TCAAACACTG TTTTAGAAAA CTTCCTGTAA ACAGGCCTAT TGATTGGAAA
      AGTTTGTGAC AAAATCTTTT GAAGGACATT TGTCCGGATA ACTAACCTTT
                                    HBVenh
3851  GTATGTCAAA GGATTGTGGG TCTTTTGGGC TTTGCTGCTC CATTTACACA
      CATACAGTTT CCTAACACCC AGAAAACCCG AAACGACGAG GTAAATGTGT
                                    HBVenh
                                                                  NsiI
                                                                  ~~~~~~~
                EcoRV                                                                 AccI
                ~~~~~~~                                                               ~~~~~~~
3901  ATGTGGATAT CCTGCCTTAA TGCCTTTGTA TGCATGTATA CAAGCTAAAC
      TACACCTATA GGACGGAATT ACGGAAACAT ACGTACATAT GTTCGATTTG
                                    HBVenh
3951  AGGCTTTCAC TTTCTCGCCA ACTTACAAGG CCTTTCTAAG TAAACAGTAC
      TCCGAAAGTG AAAGAGCGGT TGAATGTTCC GGAAAGATTC ATTTGTCATG
                                    HBVenh
4001  ATGAACCTTT ACCCCGTTGC TCGGCAACGG CCTGGTCTGT GCCAAGTGTT
      TACTTGGAAA TGGGGCAACG AGCCGTTGCC GGACCAGACA CGGTTCACAA
```

Figure 21(h)

```
                                HBVenh
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                                      SphI
                                                                      ~~~
4051      TGCTGACGCA ACCCCCACTG GCTGGGGCTT GGCCATAGGC CATCAGCGCA
          ACGACTGCGT TGGGGGTGAC CGACCCCGAA CCGGTATCCG GTAGTCGCGT
                                HBVenh
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
          SphI
          ~~~
4101      TGCGTGGAAC CTTTGTGGCT CCTCTGCCGA TCCATACTGC GGAACTCCTA
          ACGCACCTTG GAAACACCGA GGAGACGGCT AGGTATGACG CCTTGAGGAT
                                HBVenh
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4151      GCCGCTTGTT TTGCTCGCAG CCGGTCTGGA GCAAAGCTCA TAGGAACTGA
          CGGCGAACAA AACGAGCGTC GGCCAGACCT CGTTTCGAGT ATCCTTGACT
                                                        Unknown
                                                        ~~~~~~~~~~~~~
                                                                      rGlob pA
                          HBVenh                                      ~
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4201      CAATTCTGTC GTCCTCTCGC GGAAATATAC ATCGTTTCGA TCTACGTATG
          GTTAAGACAG CAGGAGAGCG CCTTTATATG TAGCAAAGCT AGATGCATAC
                                rGlob pA
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4251      ATCTTTTTCC CTCTGCCAAA AATTATGGGG ACATCATGAA GCCCCTTGAG
          TAGAAAAAGG GAGACGGTTT TTAATACCCC TGTAGTACTT CGGGGAACTC
                                                        PolyA_Site_1
                                                        ~
                                rGlob pA
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4301      CATCTGACTT CTGGCTAATA AAGGAAATTT ATTTTCATTG CAATAGTGTG
          GTAGACTGAA GACCGATTAT TTCCTTTAAA TAAAAGTAAC GTTATCACAC
                          rGlob pA                        pUC19
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~     ~~~~~~~~~~~~~~~
                                                EcoRI
                                                ~~~~~~
4351      TTGGAATTTT TTGTGTCTCT CACTCGGAAG GAATTCTGCA TTAATGAATC
          AACCTTAAAA AACACAGAGA GTGAGCCTTC CTTAAGACGT AATTACTTAG
                                pUC19
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4401      GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC
          CCGGTTGCGC GCCCCTCTCC GCCAAACGCA TAACCCGCGA GAAGGCGAAG
                                pUC19
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4451      CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT
          GAGCGAGTGA CTGAGCGACG CGAGCCAGCA AGCCGACGCC GCTCGCCATA
                                pUC19
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4501      CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
          GTCGAGTGAG TTTCCGCCAT TATGCCAATA GGTGTCTTAG TCCCCTATTG
                                pUC19
          ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4551      GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA
          CGTCCTTTCT TGTACACTCG TTTTCCGGTC GTTTTCCGGT CCTTGGCATT
                                pUC19
```

Figure 21(i)

```
                                                            ~~~~~~~~~~
4601    AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
        TTTCCGGCGC AACGACCGCA AAAAGGTATC CGAGGCGGGG GGACTGCTCG
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4651    ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA
        TAGTGTTTTT AGCTGCGAGT TCAGTCTCCA CCGCTTTGGG CTGTCCTGAT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4701    TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT
        ATTTCTATGG TCCGCAAAGG GGGACCTTCG AGGGAGCACG CGAGAGGACA
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4751    TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA
        AGGCTGGGAC GGCGAATGGC CTATGGACAG GCGGAAAGAG GGAAGCCCTT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4801    GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
        CGCACCGCGA AAGAGTATCG AGTGCGACAT CCATAGAGTC AAGCCACATC
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4851    GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA
        CAGCAAGCGA GGTTCGACCC GACACACGTG CTTGGGGGGC AAGTCGGGCT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4901    CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
        GGCGACGCGG AATAGGCCAT TGATAGCAGA ACTCAGGTTG GGCCATTCTG
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4951    ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG
        TGCTGAATAG CGGTGACCGT CGTCGGTGAC CATTGTCCTA ATCGTCTCGC
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5001    AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG
        TCCATACATC CGCCACGATG TCTCAAGAAC TTCACCACCG GATTGATGCC
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5051    CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA
        GATGTGATCT TCTTGTCATA AACCATAGAC GCGAGACGAC TTCGGTCAAT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5101    CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
        GGAAGCCTTT TTCTCAACCA TCGAGAACTA GGCCGTTTGT TTGGTGGCGA
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5151    GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA
        CCATCGCCAC CAAAAAAACA AACGTTCGTC GTCTAATGCG CGTCTTTTTT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5201    AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
        TCCTAGAGTT CTTCTAGGAA ACTAGAAAAG ATGCCCCAGA CTGCGAGTCA
```

Figure 21(j)

```
                          pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5251    GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG
        CCTTGCTTTT GAGTGCAATT CCCTAAAACC AGTACTCTAA TAGTTTTTCC
                          pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5301    ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA
        TAGAAGTGGA TCTAGGAAAA TTTAATTTTT ACTTCAAAAT TTAGTTAGAT
                          pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5351    AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG
        TTCATATATA CTCATTTGAA CCAGACTGTC AATGGTTACG AATTAGTCAC
                          pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5401    AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGTTGCCTGA
        TCCGTGGATA GAGTCGCTAG ACAGATAAAG CAAGTAGGTA TCAACGGACT
        pUC19
        ~~~
5451    CTC
        GAG
```

Figure 21(k)

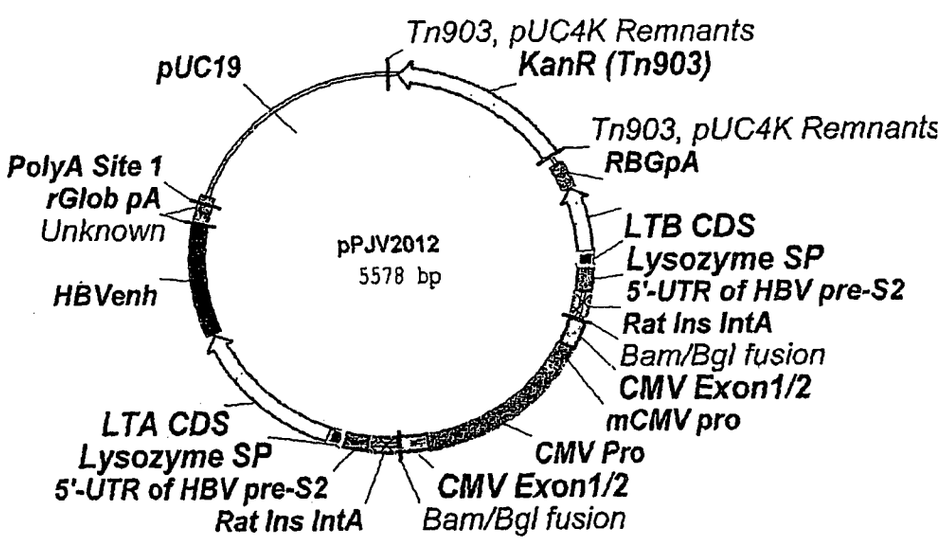

Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, pUC4K Remnants
RBGpA
PolyA Site 1
rGlob pA
Unknown
pPJV2012
5578 bp
LTB CDS
Lysozyme SP
5'-UTR of HBV pre-S2
Rat Ins IntA
Bam/Bgl fusion
CMV Exon1/2
mCMV pro
HBVenh
LTA CDS
Lysozyme SP
5'-UTR of HBV pre-S2
Rat Ins IntA
CMV Pro
CMV Exon1/2
Bam/Bgl fusion

Figure 22

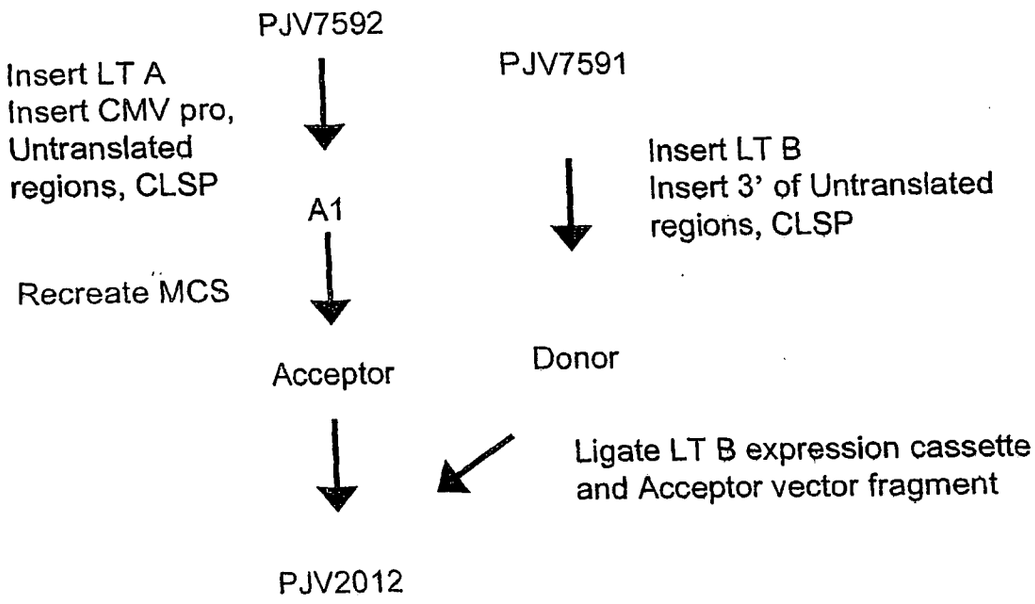

PJV7592
Insert LT A
Insert CMV pro,
Untranslated
regions, CLSP
A1
Recreate MCS
Acceptor
PJV7591
Insert LT B
Insert 3' of Untranslated
regions, CLSP
Donor
Ligate LT B expression cassette
and Acceptor vector fragment
PJV2012

Figure 23

```
1    GGCGTAATGC TCTGCCAGTG TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA AAACTCATCG AGCATCAAAT GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT
     CCGCATTACG AGACGGTCAC AATGTTGGTT AATTGGTTAA GACTAATCTT TTTGAGTAGC TCGTAGTTTA CTTTGACGTT AAATAAGTAT AGTCCTAATA
                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                                                KanR (Tn903)
101  CAATACCATA TTTTTGAAAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAAACTCA CCGAGGCAGT TCCATAGGAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC
     GTTATGGTAT AAAAACTTTT TCGGCAAAGA CATTACTTCC TCTTTTGAGT GGCTCCGTCA AGGTATCCTA CCGTTCTAGG ACCATAGCCA GACGCTAAGG
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
201  GACTCGTCCA ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCCTCG TCAAAAATAA GGTTATCAAG TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CGGTGAGAAT
     CTGAGCAGGT TGTAGTTATG TTGGATAATT AAAGGGGAGC AGTTTTTATT CCAATAGTTC ACTCTTTAGT GGTACTCACT GCTGACTTAG GCCACTCTTA
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)

          HindIII
          ~~~~~~~
301  GGCAAAAGCT TATGCATTTC TTTCCAGACT TGTTCAACAG GCCAGCCATT ACGCTCGTCA TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCGTG
     CCGTTTTCGA ATACGTAAAG AAAGGTCTGA ACAAGTTGTC CGGTCGGTAA TGCGAGCAGT AGTTTTAGTG AGCGTAGTTG GTTTGGCAAT AAGTAAGCAC
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
401  ATTGCGCCTG AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTTAAA AGGACAATTA CAAACAGGAA TCAAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC
     TAACGCGGAC TCGCTCTGCT TTATGCGCTA GCGACAATTT TCCTGTTAAT GTTTGTCCTT AGTTTACGTT GGCCGCGTCC TTGTGACGGT CGCGTAGTTG
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
501  AATATTTTCA CCTGAATCAG GATATTCTTC TAATACCTGG AATGCTGTTT TCCCGGGGAT CGCAGTGGTG AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA
     TTATAAAAGT GGACTTAGTC CTATAAGAAG ATTATGGACC TTACGACAAA AGGGCCCCTA GCGTCACCAC TCATTGGTAC GTAGTAGTCC TCATGCCTAT
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
601  AAATGCTTGA TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT GACCATCTCA TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA
     TTTACGAACT ACCAGCCTTC TCCGTATTTA AGGCAGTCGG TCAAATCAGA CTGGTAGAGT AGACATTGTA GTAACCGTTG CGATGGAAAC GGTACAAAGT
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
701  GAAACAACTC TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCGCA CCTGATTGCC CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC
     CTTTGTTGAG ACCGCGTAGC CCGAAGGGTA TGTTAGCTAT CTAACAGCGT GGACTAACGG GCTGTAATAG CGCTCGGGTA AATATGGGTA TATTTAGTCG
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
801  ATCCATGTTG GAATTTAATC GCGGCCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA TATGGCTCAT AACACCCCTT GTATTACTGT TTATGTAAGC AGACAGGTCG
     TAGGTACAAC CTTAAATTAG CGCCGGAGCT CGTTCTGCAA AGGGCAACTT ATACCGAGTA TTGTGGGGAA CATAATGACA AATACATTCG TCTGTCCAGC
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                  KanR (Tn903)
901  ACAATTCCTT CCGAGTGAGA GACACAAAAA ATTCCAACAC ACTATTGCAA TGAAAATAAA TTTCCTTTAT TAGCCAGAAG TCAGATGCTC AAGGGGCTTC
     TGTTAAGGAA GGCTCACTCT CTGTGTTTTT TAAGGTTGTG TGATAACGTT ACTTTTATTT AAAGGAAATA ATCGGTCTTC AGTCTACGAG TTCCCCGAAG
```

Figure 24 (a)

```
1001  ATGATGTCCC CATAATTTTT GGCAGAGGGA AAAAGATCCC TAGTTTTCCA TACTGATTGC CGCAATTGAA TTGGGGGTTT TATTATTCCA TACACATAAT
      TACTACAGGG GTATTAAAAA CCGTCTCCCT TTTTCTAGGG ATCAAAAGGT ATGACTAACG GCGTTAACTT AACCCCCAAA ATAATAAGGT ATGTGTATTA
                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

                                                                                  LTB CDS
1101  TTATCAATTT TGGTCTCGGT CAGATATGTG ATTCTTAATG TGTCCTTCAT CCTTTCAATG GCTTTTTTTT GGGAGTCTAT ATGTTGACTG CCCGGGACTT
      AATAGTTAAA ACCAGAGCCA GTCTATACAC TAAGAATTAC ACAGGAAGTA GGAAAGTTAC CGAAAAAAAA CCCTCAGATA TACAACTGAC GGGCCCTGAA
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

                                                 LTB CDS
1201  CGACCTGAAA TGTTGCGCCG CTCTTAAATG TAATGATAAC CATTTCTCTT TTGCCTGCCA TCGATTCCGT ATATGATAGT ATCTTGTCAT TTATCGTATA
      GCTGGACTTT ACAACGCGGC GAGAATTTAC ATTACTATTG GTAAAGAGAA AACGGACGGT AGCTAAGGCA TATACTATCA TAGAACAGTA AATAGCATAT
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

                                                 LTB CDS
                                                       NheI
                                                       ~~~~~~
1301  TATTTGTGTG TTGCGATATT CCGAACATAG TTCTGTAATA GACTGGGGAG CGCTAGCCCC CAGAGCAGCC AGGGGCAGGA AGCAAAGCAC CAAGATTAGC
      ATAAACACAC AACGCTATAA GGCTTGTATC AAGACATTAT CTGACCCCTC GCGATCGGGG GTCTCGTCGG TCCCCGTCCT TCGTTTCGTG GTTCTAATCG
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

                          LTB CDS
1401  AAAGACCTAC TAGCCATGTT CGTCACAGGG TCCCCAGTCC TCGCGGAGAT TGACGAGATG TGAGAGGCAA TATTCGGAGC AGGGTTTACT GTTCCTGAAC
      TTTCTGGATG ATCGGTACAA GCAGTGTCCC AGGGGTCAGG AGCGCCTCTA ACTGCTCTAC ACTCTCCGTT ATAAGCCTCG TCCCAAATGA CAAGGACTTG
                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

                                                  5'-UTR of HBV pre-S2
                                                 BamHI
                                                 ~~~~~~~
1501  TGGAGCCACC AGCAGGAAAA TACAGACCCC TGACTCTGGG ATCCTGACCT GGAAGATAGT CAGGGTTGAG GCAAGCAAAA GGTACATGTA AGAGAAGAGC
      ACCTCGGTGG TCGTCCTTTT ATGTCTGGGG ACTGAGACCC TAGGACTGGA CCTTCTATCA GTCCCAACTC CGTTCGTTTT CCATGTACAT TCTCTTCTCG
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~

            5'-UTR of HBV pre-S2
1601  CCACAGCGTC CCTCAAATCC CTGGAGTCTT GACTGGGGAA GCCAGGCCCA CCCTGGAGAG TACATACCTG CTTGCTGAGA TCCGGACGGT GAGTCACTCT
      GGTGTCGCAG GGAGTTTAGG GACCTCAGAA CTGACCCCTT CGGTCCGGGT GGGACCTCTC ATGTATGGAC GAACGACTCT AGGCCTGCCA CTCAGTGAGA
1701  TGGCACGGGG AATCCGCGTT CCAATGCACC GTTCCCGGCC GCGGAGGCTG GATCGGTCCC GGTGTCTTCT ATGGAGGTCA AAACAGCGTG GATGGCGTCT
      ACCGTGCCCC TTAGGCGCAA GGTTACGTGG CAAGGGCCGG CGCCTCCGAC CTAGCCAGGG CCACAGAAGA TACCTCCAGT TTTGTCGCAC CTACCGCAGA
1801  CCAGGCGATC TGACGGTTCA CTAAACGAGC TCTGCTTATA TAGACCTCCC ACCGTACACG CCTACCGCCC ATTTGCGTCA ACGGGGCGGG GTTATTACGA
      GGTCCGCTAG ACTGCCAAGT GATTTGCTCG AGACGAATAT ATCTGGAGGG TGGCATGTGC GGATGGCGGG TAAACGCAGT TGCCCCGCCC CAATAATGCT
                                                 PstI
                                                 ~~~~~~~
1901  CATTTTGGAA AGTCCCGTTG ATTTTGGTGC TCGACCTGCA GGTCGACAAT ATTGGCTATT GGCCATTGCA TACGTTGTAT CTATATCATA ATATGTACAT
      GTAAAACCTT TCAGGGCAAC TAAAACCACG AGCTGGACGT CCAGCTGTTA TAACCGATAA CCGGTAACGT ATGCAACATA GATATAGTAT TATACATGTA
2001  TTATATTGGC TCATGTCCAA TATGACCGCC ATGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
      AATATAACCG AGTACAGGTT ATACTGGCGG TACAACTGTA ACTAATAACT GATCAATAAT TATCATTAGT TAATGCCCCA GTAATCAAGT ATCGGGTATA
```

Figure 24 (b)

```
2101  ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
      TACCTCAAGG CGCAATGTAT TGAATGCCAT TTACCGGGCG GACCGACTGG CGGGTTGCTG GGGGCGGGTA ACTGCAGTTA TTACTGCATA CAAGGGTATC
2201  TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTCCGCC
      ATTGCGGTTA TCCCTGAAAG GTAACTGCAG TTACCCACCT CATAAATGCC ATTTGACGGG TGAACCGTCA TGTAGTTCAC ATAGTATACG GTTCAGGCGG
2301  CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ACGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
      GGGATAACTG CAGTTACTGC CATTTACCGG GCGGACCGTA ATACGGGTCA TGTACTGGAA TGCCCTGAAA GGATGAACCG TCATGTAGAT GCATAATCAG
2401  ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACACCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
      TAGCGATAAT GGTACCACTA CGCCAAAACC GTCATGTGGT TACCCGCACC TATCGCCAAA CTGAGTGCCC CTAAAGGTTC AGAGGTGGGG TAACTGCAGT
2501  ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT AATAACCCCG CCCCGTTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
      TACCCTCAAA CAAAACCGTG GTTTTAGTTG CCCTGAAAGG TTTTACAGCA TTATTGGGGC GGGGCAACTG CGTTTACCCG CCATCCGCAC ATGCCACCCT
2601  GGTCTATATA AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC GCCTGGAGAC GCCATCCACG CTGTTTTGAC CTCCATAGAA GACACCGGGA CCGATCCAGC
      CCAGATATAT TCGTCTCGAG CAAATCACTT GGCAGTCTAG CGGACCTCTG CGGTAGGTGC GACAAAACTG GAGGTATCTT CTGTGGCCCT GGCTAGGTCG
2701  CTCCGCGGCC GGGAACGGTG CATTGGAACG CGGATTCCCC GTGCCAAGAG TGACTCACCG TCCGGATCTC AGCAAGCAGG TATGTACTCT CCAGGGTGGG
      GAGGCGCCGG CCCTTGCCAC GTAACCTTGC GCCTAAGGGG CACGGTTCTC ACTGAGTGGC AGGCCTAGAG TCGTTCGTCC ATACATGAGA GGTCCCACCC
2801  CCTGGCTTCC CCAGTCAAGA CTCCAGGGAT TTGAGGGACG CTGTGGGCTC TTCTCTTACA TGTACCTTTT GCTTGCCTCA ACCCTGACTA TCTTCCAGGT
      GGACCGAAGG GGTCAGTTCT GAGGTCCCTA AACTCCCTGC GACACCCGAG AAGAGAATGT ACATGGAAAA CGAACGGAGT TGGGACTGAT AGAAGGTCCA
                                              5'-UTR of HBV pre-S2
            ~~~
```

```
3301  CTCACTTAGC AGGACAGTCT ATATTATCAG GATATTCCAC TTACTATATA TATGTTATAG CGACAGCACC AAATATGTTT AATGTTAATG ATGTATTAGG
      GAGTGAATCG TCCTGTCAGA TATAATAGTC CTATAAGGTG AATGATATAT ATACAATATC GCTGTCGTGG TTTATACAAA TTACAATTAC TACATAATCC
                                                 LTA CDS
      ~~~
```

```
4401  TGGGGACATC ATGAAGCCCC TTGAGCATCT GACTTCTGGC TAATAAAGGA AATTTATTTT CATTGCAATA GTGTGTTGGA ATTTTTTGTG TCTCTCACTC
      ACCCCTGTAG TACTTCGGGG AACTCGTAGA CTGAAGACCG ATTATTTCCT TTAAATAAAA GTAACGTTAT CACACAACCT TAAAAAACAC AGAGAGTGAG
            EcoRI
            -------
4501  GGAAGGAATT CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGGCGGTT TGCGTATTGG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
      CCTTCCTTAA GACGTAATTA CTTAGCCGGT TGCGCGCCCC TCTCCGCCAA ACGCATAACC CGCGAGAAGG CGAAGGAGCG AGTGACTGAG CGACGCGAGC
4601  GTCGTTCGGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
      CAGCAAGCCG ACGCCGCTCG CCATAGTCGA GTGAGTTTCC GCCATTATGC CAATAGGTGT CTTAGTCCCC TATTGCGTCC TTTCTTGTAC ACTCGTTTTC
4701  GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
      CGGTCGTTTT CCGGTCCTTG GCATTTTTCC GGCGCAACGA CCGCAAAAAG GTATCCGAGG CGGGGGGACT GCTCGTAGTG TTTTTAGCTG CGAGTTCAGT
4801  GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
      CTCCACCGCT TTGGGCTGTC CTGATATTTC TATGGTCCGC AAAGGGGGAC CTTCGAGGGA GCACGCGAGA GGACAAGGCT GGGACGGCGA ATGGCCTATG
4901  CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
      GACAGGCGGA AAGAGGGAAG CCCTTCGCAC CGCGAAAGAG TATCGAGTGC GACATCCATA GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGGTTC GACCCGACAC
5001  TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
      ACGTGCTTGG GGGCCAAGTC GGGCTGGCGA CGCGGAATAG GCCATTGATA GCAGAACTCA GGTTGGGCCA TTCTGTGCTG CTAGAAGAAC AGTATTTGGT
5101  CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CACCGGAAGT ATGCCGATGT GATCTTCTTG TCATAAACCA
      GTGACCATTG TCCTAATCGT CTCGCTCCAT ACATCCGCCA CGATGTCTCA AGAACTTCAC CACCGGATTG AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA
5201  ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA
      TAGACGCGAG ACGACTTCGG TCAATGGAAG CCTTTTTCTC AACCATCGAG AACTAGGCCG TTTGTTTGGT GGCGACCATC GCCACCAAAA AAACAAACGT
5301  AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
      TCGTCGTCTA ATGCGCGTCT TTTTTTCCTA GAGTTCTTCT AGGAAACTAG AAAAGATGCC CCAGACTGCG AGTCACCTTG CTTTTGAGTG CAATTCCCTA
5401  TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
      AAACCAGTAC TCTAATAGTT TTTCCTAGAA GTGGATCTAG GAAAATTTAA TTTTTACTTC AAAATTTAGT TAGATTTCAT ATATACTCAT TTGAACCAGA
5501  GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTC
      CTGTCAATGG TTACGAATTA GTCACTCCGT GGATAGAGTC GCTAGACAGA TAAAGCAAGT AGGTATCAAC GGACTGAG
```

Figure 24 (e)

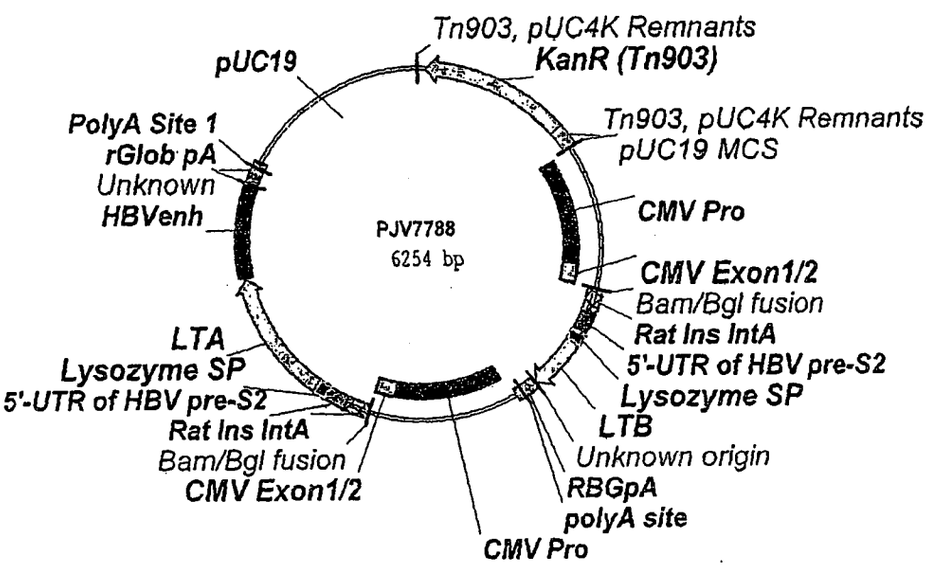

Tn903, pUC4K Remnants
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19 MCS
PolyA Site 1
rGlob pA
Unknown
HBVenh
CMV Pro
PJV7788
6254 bp
CMV Exon1/2
Bam/Bgl fusion
Rat Ins IntA
5'-UTR of HBV pre-S2
Lysozyme SP
LTB
Unknown origin
RBGpA
polyA site
CMV Pro
LTA
Lysozyme SP
5'-UTR of HBV pre-S2
Rat Ins IntA
Bam/Bgl fusion
CMV Exon1/2

Figure 25

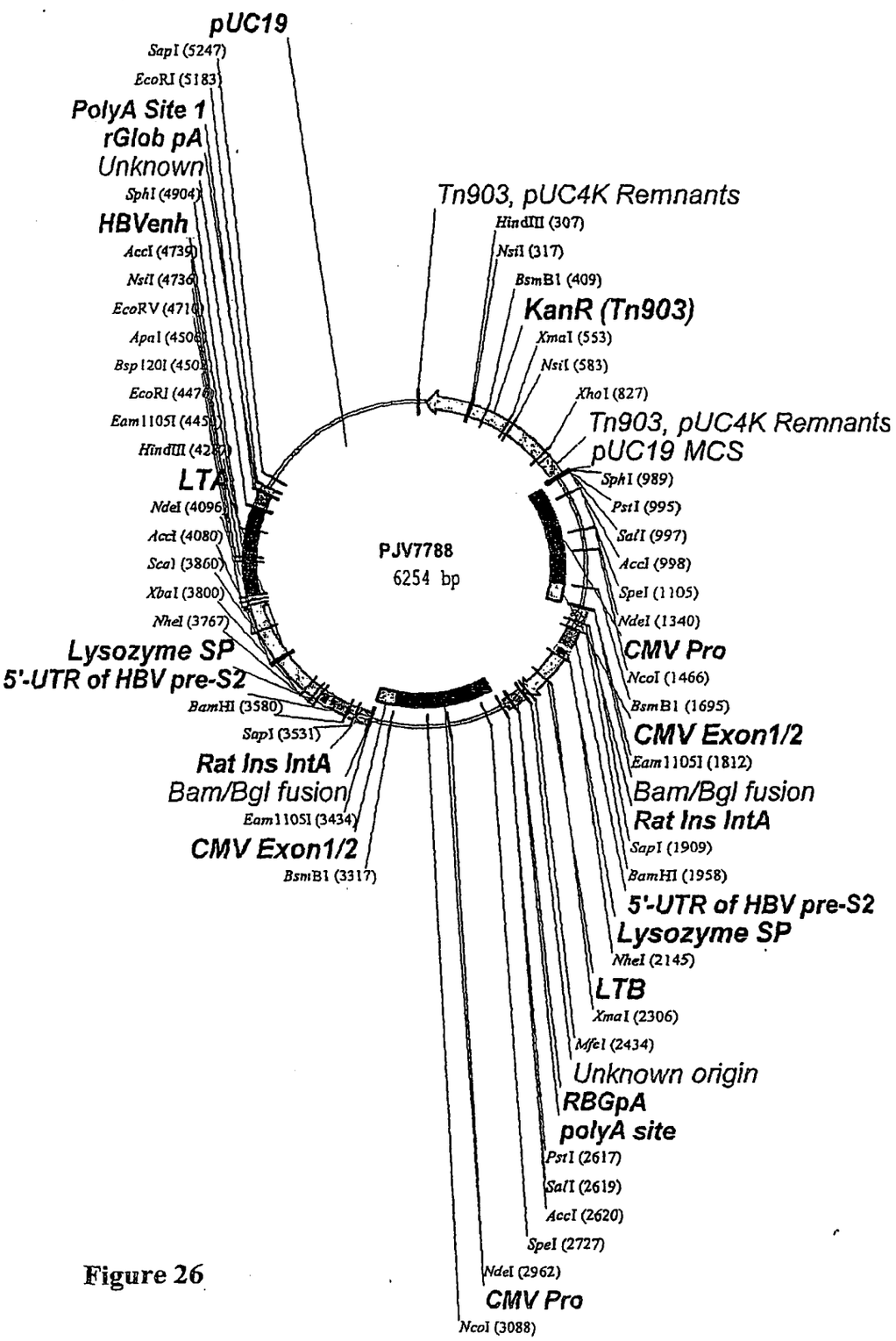

pUC19
SapI (5247)
EcoRI (5183)
PolyA Site 1
rGlob pA
Unknown
SphI (4904)
HBVenh
AccI (4739)
NsiI (4736)
EcoRV (4710)
ApaI (4506)
Bsp120I (4502)
EcoRI (4476)
Eam1105I (4457)
HindIII (4287)
LTA
NdeI (4096)
AccI (4080)
ScaI (3860)
XbaI (3800)
NheI (3767)
Lysozyme SP
5'-UTR of HBV pre-S2
BamHI (3580)
SapI (3531)
Rat Ins IntA
Bam/Bgl fusion
Eam1105I (3434)
CMV Exon1/2
BsmBI (3317)
Tn903, pUC4K Remnants
HindIII (307)
NsiI (317)
BsmBI (409)
KanR (Tn903)
XmaI (553)
NsiI (583)
XhoI (827)
Tn903, pUC4K Remnants
pUC19 MCS
SphI (989)
PstI (995)
SalI (997)
AccI (998)
SpeI (1105)
NdeI (1340)
CMV Pro
NcoI (1466)
BsmBI (1695)
CMV Exon1/2
Eam1105I (1812)
Bam/Bgl fusion
Rat Ins IntA
SapI (1909)
BamHI (1958)
5'-UTR of HBV pre-S2
Lysozyme SP
NheI (2145)
LTB
XmaI (2306)
MfeI (2434)
Unknown origin
RBGpA
polyA site
PstI (2617)
SalI (2619)
AccI (2620)
SpeI (2727)
NdeI (2962)
CMV Pro
NcoI (3088)
PJV7788
6254 bp

Figure 26

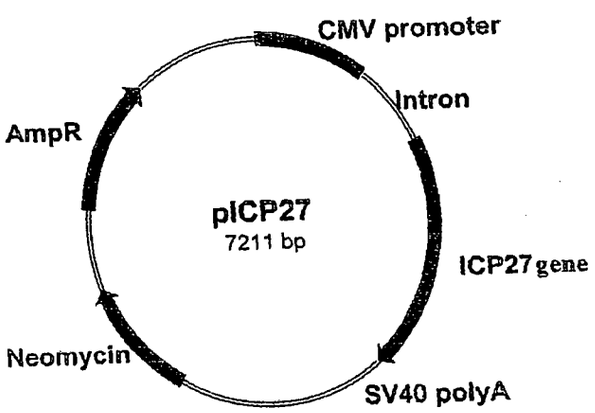
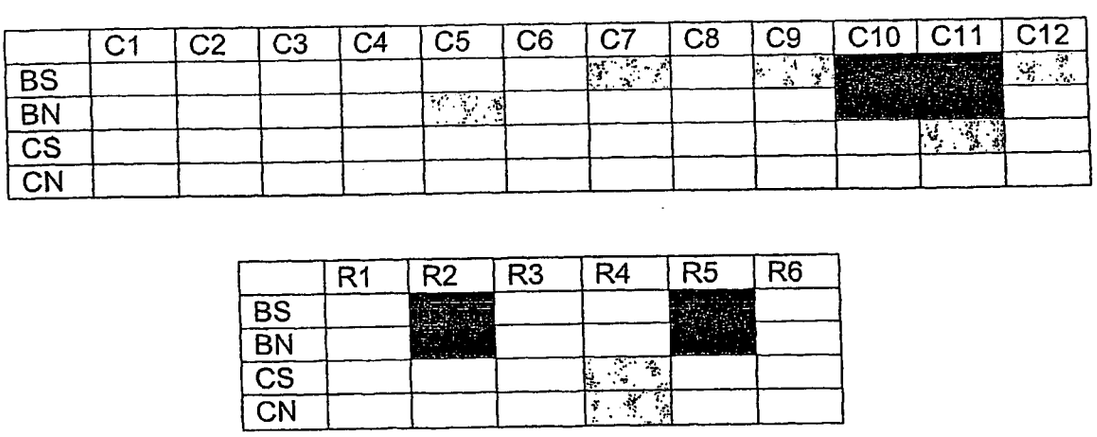

CMV promoter
Intron
AmpR
pICP27
7211 bp
ICP27 gene
Neomycin
SV40 polyA

Figure 27

MATDIDMLID LGLDLSDSEL EEDALERDEE GRRDDPESDS SGECSSSDED
MEDPCGDGGA EAIDAAIPKG PPARPEDAGT PEASTPRPAA RRGADDPPPA
TTGVWSRLGT RRSASPREPH GGKVARIQPP STKAPHPRGG RRGRRRGRGR
YGPGGADSTP NPRRRVSRNA HNQGGRHPAS ARTDGPGATH GEARRGGEQL
DVSGGPRPRG TRQAPPPLMA LSLTPPHADG RAPVPERKAP SADTIDPAVR
AVLRSISERA AVERISESFG RSALVMQDPF GGMPFPAANS PWAPVLATQA
GGFDAETRRV SWETLVAHGP SLYRTFAANP RAASTAKAMR DCVLRQENLI
EALASADETL AWCKMCIHHN LPLRPQDPII GTAAAVLENL ATRLRPFLQC
YLKARGLCGL DDLCSRRRLS DIKDIASFVL VILARLANRV ERGVSEIDYT
TVGVGAGETM HFYIPGACMA GLIEILDTHR QECSSRVCEL TASHTIAPLY
VHGKYFYCNS LF

Figure 28

A



B

#45 RVSWETLVA**HGPSLYRTF** (SEQ ID NO:66)
#46 VA**HGPSLYRTF**AANPRAA (SEQ ID NO:67)

Figure 29

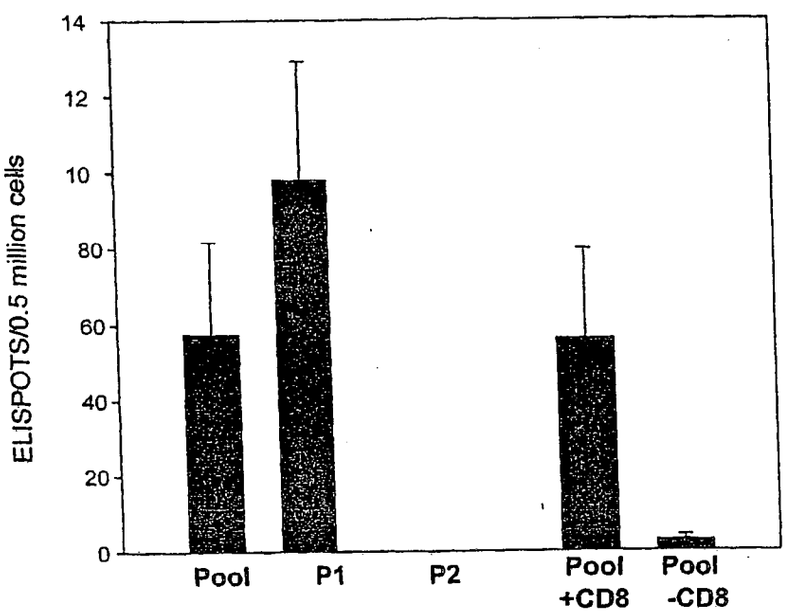

ELISPOTS/0.5 million cells
14
12
10
80
60
40
20
0
Pool
P1
P2
Pool +CD8
Pool -CD8

Figure 30

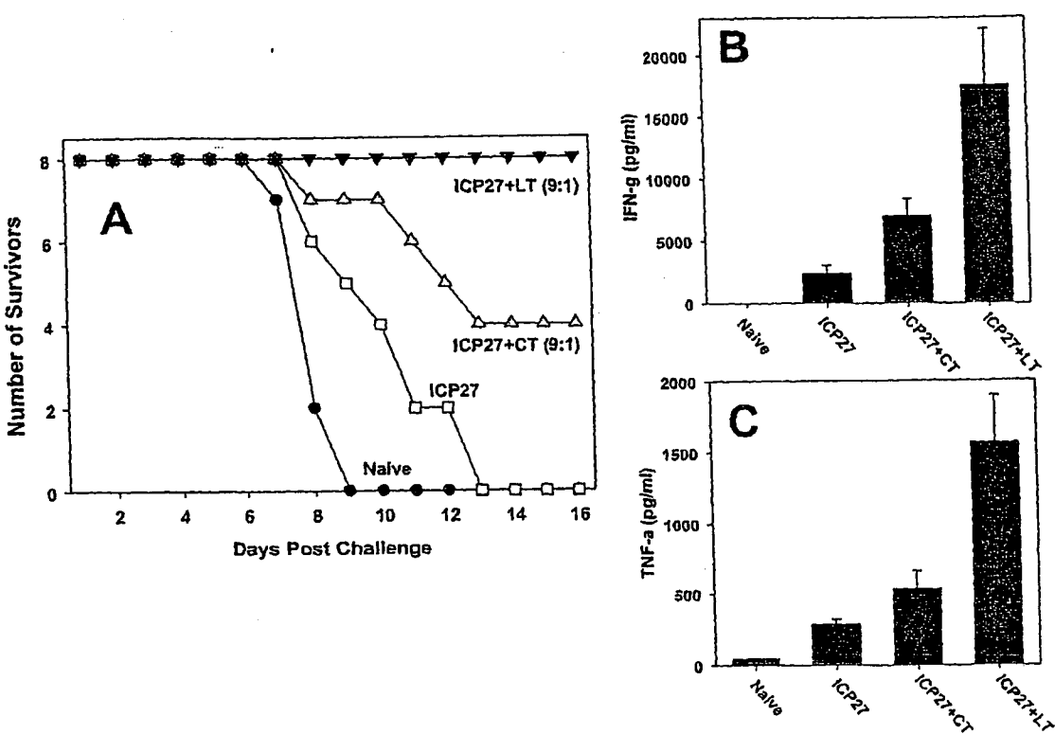

A
Number of Survivors
Days Post Challenge
ICP27+LT (9:1)
ICP27+CT (9:1)
ICP27
Naive
B
IFN-g (pg/ml)
C
TNF-a (pg/ml)
Naive
ICP27
ICP27+CT
ICP27+LT

Figure 31

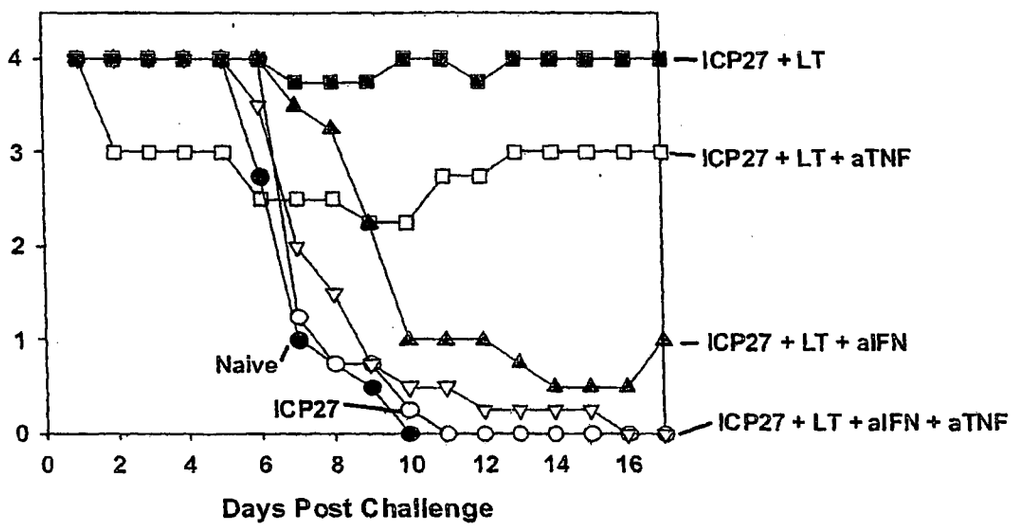

4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Days Post Challenge
ICP27 + LT
ICP27 + LT + aTNF
ICP27 + LT + aIFN
ICP27 + LT + aIFN + aTNF
Naive
ICP27

Figure 32

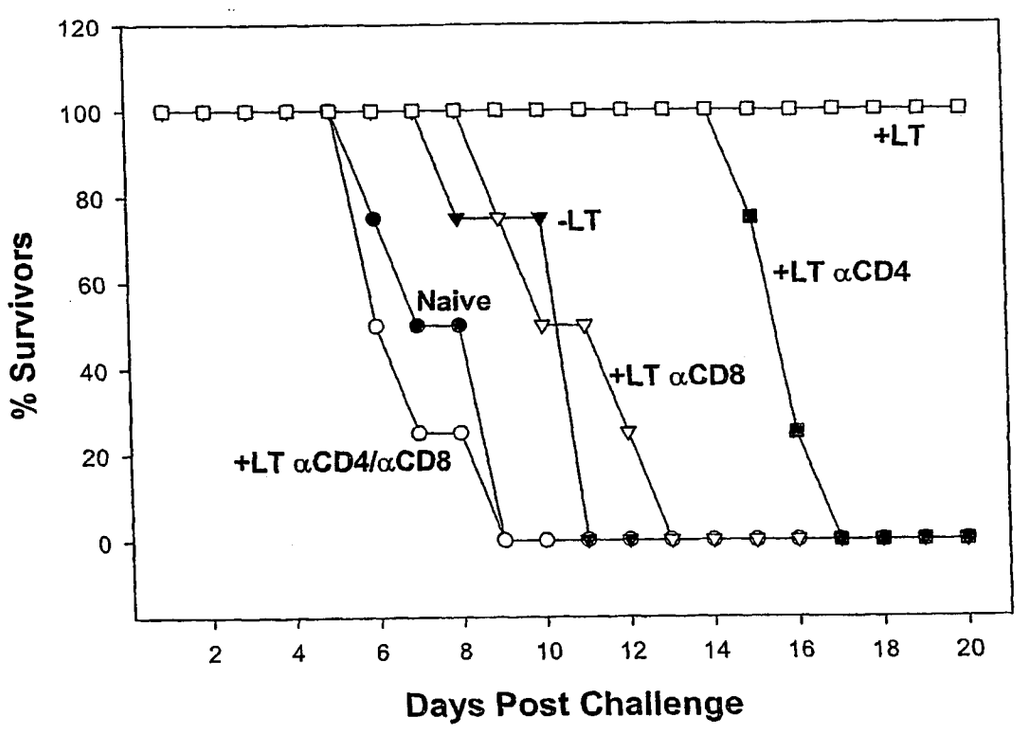

120
100
80
60
40
20
0
% Survivors
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Days Post Challenge
+LT
-LT
+LT αCD4
Naive
+LT αCD8
+LT αCD4/αCD8

Figure 33

SEQUENCE LISTING

<110> POWDERJECT VACCINES, INC;
POWDERMED LIMITED

<120> NUCLEIC ACID CONSTRUCTS

<130> N93730C GCW

<150> UK 0507997.5
<151> 2005-04-20

<150> US 60/672,479
<151> 2005-04-19

<150> US 60/648,382
<151> 2005-02-01

<160> 70

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 685
<212> DNA
<213> Human cytomegalovirus

<400> 1
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc ataatatgta catttatatt 60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 180
gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 300
cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gccccctatt 360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac 420
tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt 480
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac 540
cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 600
cgtaataacc ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat 660
ataagcagag ctcgtttagt gaacc 685

<210> 2
<211> 131
<212> DNA
<213> Human cytomegalovirus

<400> 2
gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgggacc 60
gatccagcct ccgcggccgg gaacggtgca ttggaacgcg gattccccgt gccaagagtg 120
actcaccgtc c 131

<210> 3
<211> 135
<212> DNA
<213> Rattus rattus

<400> 3
atcagcaagc aggtatgtac tctccagggt gggcctggct tccccagtca agactccagg 60
gatttgaggg acgctgtggg ctcttctctt acatgtacct tttgctagcc tcaaccctga 120

ctatcttcca ggtca 135

<210> 4
<211> 955
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Chimeric promoter sequence

<400> 4
aatattggct attggccatt gcatacgttg tatctatatc ataatatgta catttatatt 60
ggctcatgtc caatatgacc gccatgttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa 120
tcaattacgg ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg 180
gtaaatggcc cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg 240
tatgttccca tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta 300
cggtaaactg cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtcc gcccccctatt 360
gacgtcaatg acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttacgggac 420
tttcctactt ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt 480
tggcagtaca ccaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac 540
cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 600
cgtaataacc ccgccccgtt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat 660
ataagcagag ctcgtttagt gaaccgtcag atcgcctgga gacgccatcc acgctgtttt 720
gacctccata gaagacaccg ggaccgatcc agcctccgcg gccgggaacg gtgcattgga 780
acgcggattc cccgtgccaa gagtgactca ccgtccggat ctcagcaagc aggtatgtac 840
tctccagggt gggcctggct tccccagtca agactccagg gatttgaggg acgctgtggg 900
ctcttctctt acatgtacct tttgcttgcc tcaaccctga ctatcttcca ggtca 955

<210> 5
<211> 121
<212> DNA
<213> Hepatitis B virus

<400> 5
cagagtcagg ggtctgtatt ttcctgctgg tggctccagt tcaggaacag taaaccctgc 60
tccgaatatt gcctctcaca tctcgtcaat ctccgcgagg actggggacc ctgtgacgaa 120
c 121

<210> 6
<211> 57
<212> DNA
<213> Herpes simplex virus
<400> 6
ataagctgca ttgcgaacca ctagtcgccg tttttcgtgt gcatcgcgta tcacggc 57

<210> 7
<211> 48
<212> DNA
<213> Hepatitis B virus

<400> 7
ctttgtacta ggaggctgta ggcataaatt ggtctgttca ccagcacc 48

<210> 8
<211> 533
<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<400> 8
taacaaaaca aaaagatggg gttattccct aaacttcatg ggttacgtaa ttggaagttg 60
ggggacattg ccacaagatc atattgtaca aaagatcaaa cactgtttta gaaaacttcc 120
tgtaaacagg cctattgatt ggaaagtatg tcaaaggatt gtgggtcttt tgggctttgc 180
tgctccattt acacaatgtg gatatcctgc cttaatgcct ttgtatgcat gtatacaagc 240
taaacaggct ttcactttct cgccaactta caaggccttt ctaagtaaac agtacatgaa 300
cctttacccc gttgctcggc aacggcctgg tctgtgccaa gtgtttgctg acgcaacccc 360
cactggctgg ggcttggcca taggccatca gcgcatgcgt ggaacctttg tggctcctct 420
gccgatccat actgcggaac tcctagccgc ttgttttgct cgcagccggt ctggagcaaa 480
gctcatagga actgacaatt ctgtcgtcct ctcgcggaaa tatacatcgt ttc 533

<210> 9
<211> 158
<212> DNA
<213> Simian cytomegalovirus

<400> 9
gtcagacaga cagacagtta tatgggctgg tccctataac tctgccattg taaccccata 60
tagccagaca gttagcattg catctattga tgatgtacta atgtattgta acccccccta 120
tgccattgtc taactgtact aatgtatgat attatacc 158

<210> 10
<211> 131
<212> DNA
<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 10
gatcttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agcccccttga gcatctgact 60
tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120
tcactcggaa g 131

<210> 11
<211> 204
<212> DNA
<213> Simian cytomegalovirus

<400> 11
atatatactc tatgttatac tctatgatat acaatatata ctcatgaaca ctatgtactt 60
ggtgtatgac tcattattgt ctgggacttg gttgggactt ggttggttgg gaagaatgtt 120
gtgcctgtac ttgtgctgtg ctgtggatct caataaatgt gactatgttc aaaacactaa 180
gtgccccccgt gtcttcttta acta 204

<210> 12
<211> 163
<212> DNA
<213> Herpes simplex virus 2

<400> 12
gaagacgagc tctaagggag gggaggggag ctgggcttgt gtataaataa aaagacaccg 60
atgttcaaaa atacacatga cttctggtat tgttttgcct tggtttttat ttgggggggg 120
gggggcgtgt gactagaaaa acaaatgcag acatgtgcta acg 163

<210> 13
<211> 191

<212> DNA
<213> Human papillomavirus type 16

<400> 13
aattgttaca tataattgtt gtataccata acttactatt ttttcttttt tattttcata 60
tataattttt ttttttgttt gtttgtttgt tttttaataa actgttatta cttaacaatg 12
cgacacaaac gttctgcaaa acgcacaaaa cgtgcatcgg ctacccaact ttataaaaca 180
tgcaaacagg c 191

<210> 14
<211> 3759
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> pJV expression vector

<220>
<221> Intron
<222> (1725)..(1857)
<223> Rat Ins IntA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(44)
<223> Tn903, pUC4K Remnants

<220>
<221> misc_feature
<222> (861)..(896)
<223> Tn903, pUC4K Remnants

<220>
<221> misc_feature
<222> (897)..(902)
<223> pUC19 MCS

<220>
<221> polyA_signal
<222> (2556)..(2686)
<223> rGLOB pA

<220>
<221> polyA_site
<222> (2647)..(2647)
<223> PolyA_Site_1

<220>
<221> promoter
<222> (903)..(1587)
<223> CMV Pro

<220>
<221> 3'UTR
<222> (2012)..(2544)
<223> HBVenh

<220>
<221> 5'UTR
<222> (1864)..(1984)

<223> 5'-UTR of HBV pre-S2

<220>
<221> misc_feature
<222> (1719)..(1724)
<223> Bam/Bgl fusion
<220>
<221> misc_feature
<222> (1985)..(1987)
<223> ATG-Nhe

<220>
<221> misc_feature
<222> (1988)..(2011)
<223> CDS insertion site

<220>
<221> misc_feature
<222> (2545)..(2555)
<223> unknown

<220>
<221> exon
<222> (1588)..(1718)
<223> CMV Exon 1/2

<220>
<221> misc_feature
<222> (2693)..(3759)
<223> pUC19

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)..(860)
<223> KanR (Tn903) complement

<400> 14
ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120
agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 240
tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat 300
ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga 420
aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg 480
aacactgcca gcgcatcaac aatattttca ccctgaatcag gatattcttc taatacctgg 540
aatgctgttt tccccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600
aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg 720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt 840
tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggtcg 900
acaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata 960
ttggctcatg tccaatatga ccgccatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt 1020
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta 1080
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga 1140
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt 1200
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgccccta 1260
ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg 1320

```
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt   1380
tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc   1440
accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat   1500
gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct   1560
atataagcag agctcgttta gtgaacc gtc aga tcg cct gga gac gcc atc cac   1614
                            Val Arg Ser Pro Gly Asp Ala Ile His
                            1               5

gct gtt ttg acc tcc ata gaa gac acc ggg acc gat cca gcc tcc gcg     1662
Ala Val Leu Thr Ser Ile Glu Asp Thr Gly Thr Asp Pro Ala Ser Ala
10                  15                  20                  25

gcc ggg aac ggt gca ttg gaa cgc gga ttc ccc gtg cca aga gtg act     1710
Ala Gly Asn Gly Ala Leu Glu Arg Gly Phe Pro Val Pro Arg Val Thr
                30                  35                  40

cac cgt cc ggatctcagc aagcaggtat gtactctcca gggtgggcct ggcttcccca   1768
His Arg

gtcaagactc cagggatttg agggacgctg tgggctcttc tcttacatgt acctttgct    1828
tgcctcaacc ctgactatct tccaggtcag gatcccagag tcaggggtct gtattttcct    1888
gctggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgctccga atattgcctc tcacatctcg    1948
tcaatctccg cgaggactgg ggaccctgtg acgaacatgg ctagcgggcc cagatctggg    2008
ccctaacaaa acaaaaagat ggggttattc cctaaacttc atgggttacg taattggaag    2068
ttgggggaca ttgccacaag atcatattgt acaaaagatc aaacactgtt ttagaaaact    2128
tcctgtaaac aggcctattg attggaaagt atgtcaaagg attgtgggtc ttttgggctt    2188
tgctgctcca tttacacaat gtggatatcc tgccttaatg cctttgtatg catgtataca    2248
agctaaacag gctttcactt tctcgccaac ttacaaggcc tttctaagta aacagtacat    2308
gaacctttac cccgttgctc ggcaacggcc tggtctgtgc caagtgtttg ctgacgcaac    2368
ccccactggc tggggcttgg ccataggcca tcagcgcatg cgtggaacct ttgtggctcc    2428
tctgccgatc catactgcgg aactcctagc cgcttgtttt gctcgcagcc ggtctggagc    2488
aaagctcata ggaactgaca attctgtcgt cctctcgcgg aaatatacat cgtttcgatc    2548
tacgtatgat ctttttccct ctgccaaaaa ttatggggac atcatgaagc cccttgagca    2608
tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt    2668
gtgtctctca ctcggaagga attctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg    2728
gtttgcgtat tgggcgctct tccgcttcct cgctcactga ctcgctgcgc tcggtcgttc    2788
ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag    2848
gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa    2908
aggccgcgtt gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc    2968
gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc    3028
ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg    3088
cctttctccc ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt    3148
cggtgtaggt cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc     3208
gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc    3268
cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag    3328
agttcttgaa gtggtggcct aactacggct acactagaag aacagtattt ggtatctgcg    3388
ctctgctgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaacaaa    3448
ccaccgctgg tagcggtggt ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag    3508
gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact    3568
cacgttaagg gattttggtc atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa    3628
attaaaaatg aagttttaaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt    3688
accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttcgt tcatccatag    3748
ttgcctgact c                                                        3759
```

<210> 15
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 15
ggaggatccg gacggtgagt cactcttggc acggggaatc cg 42

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 16
ggtgaatatg gctcataaca c 21

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 17
ccgccgaaca tggagaacat cgc 23

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 18
cacagatctt ttgttagggt ttaaatgtat acc 33

<210> 19
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 19
ggaggatcct gacctggaag atagtcacc 29

<210> 20
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Primer

<400> 20
ggaggatcca tcagcaagca ggtatg 26

<210> 21
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 21
ggagctagcg ggcgtttgac ctccggcgtc ggg 33

<210> 22
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 22
ggagaattca gatctcctct agtaaaacaa tggctgg 37

<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 23
ggagctagcc ttctaaccga ggtcg 25

<210> 24
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 24
ggaagatctc cttactccag ctctatgctg 30

<210> 25
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 25
ggcgaattcc ttccgagtga gagacac 27

<210> 26
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 26
ggagtataca tttaaagggc cctaacaaaa caaaaagatg ggg 43

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 27
ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g 31

<210> 28
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 28
ggaagatctc cttatttttg acaccagacc aactgg 36

<210> 29
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 29
ggagtcgacc tgtctgctta cataaacag 29

<210> 30
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 30
cgtaatgctc tgccagtgtt acaacc 26

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 31
gaaagatctc agcaagcagg 20

<210> 32
<211> 47
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 32
ggaggatcct gacctggaag atagtcaggg ttgaggcaag caaaagg 47

<210> 33
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 33
ctagcgggcc ca 12

<210> 34
<211> 12
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 34
gatctgggcc cg 12

<210> 35
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 35

ggagctagca tcatcccagt tgaggagg 28

<210> 36
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 36
ggtagatctc ctcatgtctg ctcgaagc 28

<210> 37
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 37
ccaagctagc gacaaaactc acacatgcc 29

<210> 38
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 38
ggaagatctc gtttacccct gtcatttacc cggagacagg gagag 45

<210> 39
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 39
aagatgtcca gactctgtct ctccgtggcc ctcctcgtgc tcctcgggac actcgcc 57

<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 40
ggaactagta agatgtccag actc 24

<210> 41
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 41
ggaagctagc ggcgagtgtc ccgag 25

<210> 42
<211> 75
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 42
ggaaagatgg ccagcctctt tgccacattt ctcgtggtgc tcgtgagcct cagcctcgcc 60
agcgaaagca gcgcc 75

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 43
ggaactagtg gaaagatggc cagc 24

<210> 44
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 44
ggaagctagc ggcgctgctt tcgctg 26

<210> 45
<211> 51
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Oligonucleotide

<400> 45
aggtctttgc taatcttggt gctttgcttc ctgcccctgg ctgctctggg g 51

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 46
ggaactagta ggtctttgct aatc 24

<210> 47
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 47
ggaagctagc ccccagagca gccag 25

<210> 48
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 48
ggagctagct cgtttacttt gaccaagaac g 31

<210> 49
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 49
ggaagatctc cggtgagtgg tgctg 25

<210> 50
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 50
gcaggatcca gtagacctgg agagaggaca ag 32

<210> 51
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Primer

<400> 51
ggaagatcta caaggtgagc tgctgtggc 29

<210> 52
<211> 490
<212> DNA
<213> Pseudo rabies virus

<400> 52
tggccgcaga gcgggccggg catgcaaatc agaggcgcgc gggagacgcc tccgcgcgcc 60
cattggcccg ggcgagccga gatggccgcc gcgggggccg gacatgcaaa gtagacgcga 120
gaggaagtag ggagagaaat cccattggcc gtcgaggggc caagatggcg ccctcggggc 180
cggacatgca aagtagacgc gagaggaagt gggcgagaga aatcccattg gccgtcgatg 240
gggcaagatg gccgccgcgg gggccgggca tgcaaatggt cctcgcgagg aagttcctcg 300
cgaaatccca ttggccggcg gccgccatct tgggccgggc atgcaaagca gacggcagag 360
gaagcgggcg agaaaaatcc cattggccgg ccgtcgggga agtccgcggc gaaaatcggc 420
cattggtccg cttacctggg ggcgggctct cctcggggcg cttataagcg cggtctccat 480
cgtagcactt 490

<210> 53
<211> 495
<212> DNA
<213> Rous sarcoma virus

<400> 53
ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagctaca 60
acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc ttagggttag gcgttttgcg 120
ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgtatctgag gggactaggg tgtgtttagg 180
cgaaaagcgg ggcttcggtt gtacgcggtt aggagttccc tcaggatata gtagtttcgc 240
ttttgcatag ggagggggaa atgtagtctt atgcaataca cttgtagtct tgcaacatgg 300
taacgatgag ttagcaacat gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg 360
tggaagtaag gtggtacgat cgtgccttat taggaaggca acagacaggt ctgacatgga 420
ttggacgaac cactgaattc cgcattgcag agataattgt atttaagtgc ctagctcgat 480
acaataaacg ccatt 495

<210> 54
<211> 5446
<212> DNA
<213> Artficial sequence

<220>
<221> Kanamycin resistance gene flanked by Tn903 sequences
<222> (1)..(896)

<220>
<221> Sal I cloning site
<222> (897)..(902)

<220>
<221> CMV promoter

<222> (903)..(1587)

<220>
<221> CMV exon 1/2 fusion
<222> (1588)..(1718)

<220>
<221> Bam H1/Bgl2 fusion
<222> (1719)..(1724)

<220>
<221> Rat Insulin intron A
<222> (1725)..(1857)

<220>
<221> Bam H1 cloning site
<222> (1858)..(1863)

<220>
<221> pre S2 region of HBsAgNon-coding
<222> (1864)..(1984)

<220>
<221> CDS
<222> (1985)..(3691)

<220>
<221> G nucleotide from H3 Panama 3" UTR
<222> (3692)..(3692)

<220>
<221> Bsp1201 cloning site
<222> (3693)..(3698)

<220>
<221> HBV enhancer
<222> (3699)..(4231)

<220>
<221> Rabbit beta globin polyadenylation region
<222> (4243)..(4373)

<220>
<221> Eco RI cloning site
<222> (4374)..(4379)

<220>
<221> PUC 19 vector backbone sequences
<222> (4380)..(5446)

<400> 54
ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120
agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 240
tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat 300
ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga 420
aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcaaatgcaa ccggcgcagg 480
aacactgcca gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 540
aatgctgttt tccccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600

```
aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca    660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg    720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat    780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt    840
tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggtcg    900
acaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata    960
ttggctcatg tccaatatga ccgccatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt   1020
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta   1080
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga   1140
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt   1200
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgcccccta   1260
ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg   1320
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt   1380
tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc   1440
accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat   1500
gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct   1560
atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt   1620
ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cggtgcattg   1680
gaacgcggat tccccgtgcc aagagtgact caccgtccgg atctcagcaa gcaggtatgt   1740
actctccagg gtgggcctgg cttccccagt caagactcca gggatttgag ggacgctgtg   1800
ggctcttctc ttacatgtac cttttgcttg cctcaaccct gactatcttc caggtcagga   1860
tcccagagtc aggggtctgt attttcctgc tggtggctcc agttcaggaa cagtaaaccc   1920
tgctccgaat attgcctctc acatctcgtc aatctccgcg aggactgggg accctgtgac   1980
gaac atg gct agc aag act atc att gct ttg agc tac att tta tgt ctg      2029
     Met Ala Ser Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu
     1               5                  10                  15
gtt ttc gct caa aaa ctt ccc gga aat gac aac agc acg gca acg ctg      2077
Val Phe Ala Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu
                20                  25                  30
tgc ctg ggg cac cat gca gtg tca aac gga acg cta gtg aaa aca atc      2125
Cys Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile
            35                  40                  45
acg aat gac caa att gaa gtg act aat gct act gag ctg gtt cag agt      2173
Thr Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser
        50                  55                  60
tcc tca aca ggt aga ata tgc gac agt cct cac caa atc ctt gat gga      2221
Ser Ser Thr Gly Arg Ile Cys Asp Ser Pro His Gln Ile Leu Asp Gly
    65                  70                  75
gaa aac tgc aca cta ata gat gct cta ttg gga gac cct cat tgt gat      2269
Glu Asn Cys Thr Leu Ile Asp Ala Leu Leu Gly Asp Pro His Cys Asp
80                  85                  90                  95
ggc ttc caa aat aag gaa tgg gac ctt ttt gtt gaa cgc agc aaa gcc      2317
Gly Phe Gln Asn Lys Glu Trp Asp Leu Phe Val Glu Arg Ser Lys Ala
                100                 105                 110
tac agc aac tgt tac cct tat gat gtg ccg gat tat gcc tcc ctt agg      2365
Tyr Ser Asn Cys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Ser Leu Arg
            115                 120                 125
tca cta gtt gcc tca tcc ggc aca ctg gag ttt aac aat gaa agc ttc      2413
Ser Leu Val Ala Ser Ser Gly Thr Leu Glu Phe Asn Asn Glu Ser Phe
        130                 135                 140
aat tgg act gga gtc gct cag aat gga aca agc tct gct tgc aaa agg      2461
Asn Trp Thr Gly Val Ala Gln Asn Gly Thr Ser Ser Ala Cys Lys Arg
    145                 150                 155
aga tct aat aaa agt ttc ttt agt aga ttg aat tgg ttg cac caa tta      2509
Arg Ser Asn Lys Ser Phe Phe Ser Arg Leu Asn Trp Leu His Gln Leu
160                 165                 170                 175
aaa tac aaa tat cca gca ctg aac gtg act atg cca aac aat gaa aaa      2557
Lys Tyr Lys Tyr Pro Ala Leu Asn Val Thr Met Pro Asn Asn Glu Lys
                180                 185                 190
ttt gac aaa ttg tac att tgg ggg gtt ctc cac ccg agt acg gac agt      2605
Phe Asp Lys Leu Tyr Ile Trp Gly Val Leu His Pro Ser Thr Asp Ser
```

```
          195                 200                 205
gac caa atc agc cta tat gct caa gca tca ggg aga gtc aca gtc tct      2653
Asp Gln Ile Ser Leu Tyr Ala Gln Ala Ser Gly Arg Val Thr Val Ser
        210                 215                 220
acc aaa aga agc caa caa act gta atc ccg aat atc gga tct aga ccc      2701
Thr Lys Arg Ser Gln Gln Thr Val Ile Pro Asn Ile Gly Ser Arg Pro
    225                 230                 235
tgg gta agg ggt gtc tcc agc aga ata agc atc tat tgg aca ata gta      2749
Trp Val Arg Gly Val Ser Ser Arg Ile Ser Ile Tyr Trp Thr Ile Val
240                 245                 250                 255
aaa ccg gga gac ata ctt ttg att aac agc aca ggg aat cta att gct      2797
Lys Pro Gly Asp Ile Leu Leu Ile Asn Ser Thr Gly Asn Leu Ile Ala
                260                 265                 270
cct cgg ggt tac ttc aaa ata cga agt ggg aaa agc tca ata atg agg      2845
Pro Arg Gly Tyr Phe Lys Ile Arg Ser Gly Lys Ser Ser Ile Met Arg
            275                 280                 285
tca gat gca ccc att ggc aaa tgc aat tct gaa tgc atc act cca aat      2893
Ser Asp Ala Pro Ile Gly Lys Cys Asn Ser Glu Cys Ile Thr Pro Asn
        290                 295                 300
gga agc att ccc aat gac aaa cca ttt caa aat gta aac agg atc aca      2941
Gly Ser Ile Pro Asn Asp Lys Pro Phe Gln Asn Val Asn Arg Ile Thr
    305                 310                 315
tat ggg gcc tgt ccc aga tat gtt aag caa aac act ctg aaa ttg gca      2989
Tyr Gly Ala Cys Pro Arg Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala
320                 325                 330                 335
aca ggg atg cgg aat gta cca gag aaa caa act aga ggc ata ttc ggc      3037
Thr Gly Met Arg Asn Val Pro Glu Lys Gln Thr Arg Gly Ile Phe Gly
                340                 345                 350
gca atc gcg ggt ttc ata gaa aat ggt tgg gag gga atg gtg gac ggt      3085
Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly Met Val Asp Gly
            355                 360                 365
tgg tac ggt ttc agg cat caa aat tct gag ggc aca gga caa gca gca      3133
Trp Tyr Gly Phe Arg His Gln Asn Ser Glu Gly Thr Gly Gln Ala Ala
        370                 375                 380
gat ctt aaa agc act caa gca gca atc aac caa atc aac ggg aaa ctg      3181
Asp Leu Lys Ser Thr Gln Ala Ala Ile Asn Gln Ile Asn Gly Lys Leu
    385                 390                 395
aat agg tta atc gag aaa acg aac gag aaa ttc cat caa att gaa aaa      3229
Asn Arg Leu Ile Glu Lys Thr Asn Glu Lys Phe His Gln Ile Glu Lys
400                 405                 410                 415
gaa ttc tca gaa gta gaa ggg aga att cag gac ctc gag aaa tat gtt      3277
Glu Phe Ser Glu Val Glu Gly Arg Ile Gln Asp Leu Glu Lys Tyr Val
                420                 425                 430
gag gac act aaa ata gat ctc tgg tcg tac aac gcg gag ctt ctt gtt      3325
Glu Asp Thr Lys Ile Asp Leu Trp Ser Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val
            435                 440                 445
gcc ctg gag aac caa cat aca att gat cta act gac tca gaa atg aac      3373
Ala Leu Glu Asn Gln His Thr Ile Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asn
        450                 455                 460
aaa ctg ttt gaa aga aca aag aag caa ctg agg gaa aat gct gag gat      3421
Lys Leu Phe Glu Arg Thr Lys Lys Gln Leu Arg Glu Asn Ala Glu Asp
    465                 470                 475
atg ggc aat ggt tgt ttc aaa ata tac cac aaa tgt gac aat gcc tgc      3469
Met Gly Asn Gly Cys Phe Lys Ile Tyr His Lys Cys Asp Asn Ala Cys
480                 485                 490                 495
ata ggg tca atc aga aat gga act tat gac cat gat gta tac aga gac      3517
Ile Gly Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asp His Asp Val Tyr Arg Asp
                500                 505                 510
gaa gca tta aac aac cgg ttc cag atc aaa ggt gtt gag ctg aag tca      3565
Glu Ala Leu Asn Asn Arg Phe Gln Ile Lys Gly Val Glu Leu Lys Ser
            515                 520                 525
```

```
gga tac aaa gat tgg atc cta tgg att tcc ttt gcc ata tca tgc ttt     3613
Gly Tyr Lys Asp Trp Ile Leu Trp Ile Ser Phe Ala Ile Ser Cys Phe
        530                 535                 540
ttg ctt tgt gtt gtt ttg ctg ggg ttc atc atg tgg gcc tgc caa aaa     3661
Leu Leu Cys Val Val Leu Leu Gly Phe Ile Met Trp Ala Cys Gln Lys
    545                 550                 555
ggc aac att agg tgc aac att tgc att tga ggggccctaa caaaacaaaa       3711
Gly Asn Ile Arg Cys Asn Ile Cys Ile
560                 565
agatggggtt attccctaaa cttcatgggt tacgtaattg gaagttgggg gacattgcca   3771
caagatcata ttgtacaaaa gatcaaacac tgttttagaa aacttcctgt aaacaggcct   3831
attgattgga aagtatgtca aaggattgtg ggtcttttgg gctttgctgc tccatttaca   3891
caatgtggat atcctgcctt aatgcctttg tatgcatgta tacaagctaa acaggctttc   3951
actttctcgc caacttacaa ggcctttcta agtaaacagt acatgaacct ttaccccgtt   4011
gctcggcaac ggcctggtct gtgccaagtg tttgctgacg caacccccac tggctggggc   4071
ttggccatag gccatcagcg catgcgtgga acctttgtgg ctcctctgcc gatccatact   4131
gcggaactcc tagccgcttg ttttgctcgc agccggtctg gagcaaagct cataggaact   4191
gacaattctg tcgtcctctc gcggaaatat acatcgtttc gatctacgta tgatcttttt   4251
ccctctgcca aaaattatgg ggacatcatg aagccccttg agcatctgac ttctggctaa   4311
taaaggaaat ttattttcat tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct ctcactcgga   4371
aggaattctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga ggcggtttgc gtattgggcg   4431
ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc gttcggctgc ggcgagcggt   4491
atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata acgcaggaaa   4551
gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg cgttgctggc   4611
gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct caagtcagag   4671
gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa gctccctcgt   4731
gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc tcccttcggg   4791
aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcggtgt aggtcgttcg   4851
ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg ccttatccgg   4911
taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta tcgccactgg cagcagccac   4971
tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct tgaagtggtg   5031
gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc tgcgctctgc tgaagccagt   5091
taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg ctggtagcgg   5151
tggtttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc aagaagatcc   5211
tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt aagggatttt   5271
ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaattaaa aatgaagttt   5331
taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac agttaccaat gcttaatcag   5391
tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc atagttgcct gactc        5446
```

<210> 55
<211> 568
<212> PRT
<213> Artficial sequence

<400> 55

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

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

<210> 56
<211> 63
<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220>
<223> N terminal peptide of H3 Panama HA influenza antigen

<400> 56
Met Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala
1 5 10 15
Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly
20 25 30
His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp
35 40 45
Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser
50 55 60

<210> 57
<211> 65
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> N terminal sequence of H3 Panama HA antigen encoded by pPJV1671

<400> 57
Met Ala Ser Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val
1 5 10 15
Phe Ala Gln Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys
20 25 30
Leu Gly His His Ala Val Ser Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr
35 40 45
Asn Asp Gln Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser
50 55 60
Ser
65

<210> 58
<211> 62
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Consensus of natural and pPJV1671 N terminal H3 Panama HA antigens

<400> 58

Lys Thr Ile Ile Ala Leu Ser Tyr Ile Leu Cys Leu Val Phe Ala Gln
1 5 10 15
Lys Leu Pro Gly Asn Asp Asn Ser Thr Ala Thr Leu Cys Leu Gly His
20 25 30
His Ala Val Ser Asn Gly Thr Leu Val Lys Thr Ile Thr Asn Asp Gln
35 40 45
Ile Glu Val Thr Asn Ala Thr Glu Leu Val Gln Ser Ser Ser
50 55 60

<210> 59
<211> 5453
<212> DNA
<213> Artficial sequence

<220>
<221> Kanamycin resistance gene flanked by Tn903 sequences
<222> (1)..(896)

<220>
<221> Sal I cloning site
<222> (897)..(902)

<220>
<221> CMV promoter
<222> (903)..(1587)

<220>
<221> CMV exon 1/2 fusion
<222> (1588)..(1718)

<220>
<221> Bam H1/Bg12 fusion
<222> (1719)..(1724)

<220>
<221> Rat Insulin intron A
<222> (1725)..(1857)

<220>
<221> Bam H1 cloning site
<222> (1858)..(1863)

<220>
<221> pre S2 region of HBsAgNon-coding
<222> (1864)..(1984)

<220>
<221> CDS
<222> (1985)..(3697)

<220>
<221> Bsp1201 cloning site
<222> (3700)..(3705)

<220>
<221> HBV enhancer
<222> (3706)..(4238)

<220>
<221> Rabbit beta globin polyadenylation region
<222> (4250)..(4380)

<220>
<221> Eco RI cloning site
<222> (4381)..(4386)

<220>
<221> PUC 19 vector backbone sequences
<222> (4387)..(5453)

<400> 59
ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120
agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 240

```
tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat    300
ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca    360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga    420
aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg    480
aacactgcca gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg    540
aatgctgttt tccccgggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata    600
aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca    660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg    720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat    780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt    840
tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggtcg    900
acaatattgg ctattggcca ttgcatacgt tgtatctata tcataatatg tacatttata    960
ttggctcatg tccaatatga ccgccatgtt gacattgatt attgactagt tattaatagt   1020
aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc catatatgga gttccgcgtt acataactta   1080
cggtaaatgg cccgcctggc tgaccgccca acgacccccg cccattgacg tcaataatga   1140
cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga ctttccattg acgtcaatgg gtggagtatt   1200
tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc aagtgtatca tatgccaagt ccgccccta    1260
ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgcct ggcattatgc ccagtacatg accttacggg   1320
actttcctac ttggcagtac atctacgtat tagtcatcgc tattaccatg gtgatgcggt   1380
tttggcagta caccaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt ccaagtctcc   1440
accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac tttccaaaat   1500
gtcgtaataa ccccgccccg ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg tgggaggtct   1560
atataagcag agctcgttta gtgaaccgtc agatcgcctg gagacgccat ccacgctgtt   1620
ttgacctcca tagaagacac cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cggtgcattg   1680
gaacgcggat tccccgtgcc aagagtgact caccgtccgg atctcagcaa gcaggtatgt   1740
actctccagg gtgggcctgg cttccccagt caagactcca gggatttgag ggacgctgtg   1800
ggctcttctc ttacatgtac cttttgcttg cctcaaccct gactatcttc caggtcagga   1860
tcccagagtc aggggtctgt attttcctgc tggtggctcc agttcaggaa cagtaaaccc   1920
tgctccgaat attgcctctc acatctcgtc aatctccgcg aggactgggg accctgtgac   1980
gaac atg gct agc gag aaa ata gtg ctt ctt ttt gca ata gtc agt ctt      2029
     Met Ala Ser Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu
     1               5                  10                  15
gtt aaa agt gat cag att tgc att ggt tac cat gca aac aac tcg aca      2077
Val Lys Ser Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr
                20                  25                  30
gag cag gtt gac aca ata atg gaa aag aac gtt act gtt aca cat gcc      2125
Glu Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala
            35                  40                  45
caa gac ata ctg gaa aag aca cac aat ggg aag ctc tgc gat cta gat      2173
Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp
        50                  55                  60
gga gtg aag cct cta att ttg aga gat tgt agt gta gct gga tgg ctc      2221
Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu
    65                  70                  75
ctc gga aac cca atg tgt gac gaa ttc atc aat gtg ccg gaa tgg tct      2269
Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser
80                  85                  90                  95
tac ata gtg gag aag gcc aat cca gtc aat gac ctc tgt tac cca ggg      2317
Tyr Ile Val Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly
                100                 105                 110
gat ttc aat gac tat gaa gaa ttg aaa cac cta ttg agc aga ata aac      2365
Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn
            115                 120                 125
cat ttt gag aaa att cag atc atc ccc aaa agt tct tgg tcc agt cat      2413
His Phe Glu Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His
        130                 135                 140
gaa gcc tca ttg ggg gtg agc tca gca tgt cca tac cag gga aag tcc      2461
Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser
    145                 150                 155
tcc ttt ttc aga aat gtg gta tgg ctt atc aaa aag aac agt aca tac      2509
Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr
```

```
160                 165                 170                 175
cca aca ata aag agg agc tac aat aat acc aac caa gaa gat ctt ttg      2557
Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu
                180                 185                 190
gta ctg tgg ggg att cac cat cct aat gat gcg gca gag cag aca aag      2605
Val Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys
            195                 200                 205
ctc tat caa aac cca acc acc tat att tcc gtt ggg aca tca aca cta      2653
Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu
        210                 215                 220
aac cag aga ttg gta cca aga ata gct act aga tcc aaa gta aac ggg      2701
Asn Gln Arg Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly
    225                 230                 235
caa agt gga agg atg gag ttc ttc tgg aca att tta aaa ccg aat gat      2749
Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp
240                 245                 250                 255
gca atc aac ttc gag agt aat gga aat ttc att gct cca gaa tat gca      2797
Ala Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala
                260                 265                 270
tac aaa att gtc aag aaa ggg gac tca aca att atg aaa agt gaa ttg      2845
Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu
            275                 280                 285
gaa tat ggt aac tgc aac acc aag tgt caa act cca atg ggg gcg ata      2893
Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile
        290                 295                 300
aac tct agc atg cca ttc cac aat ata cac cct ctc acc atc ggg gaa      2941
Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu
    305                 310                 315
tgc ccc aaa tat gtg aaa tca aac aga tta gtc ctt gcg act ggg ctc      2989
Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu
320                 325                 330                 335
aga aat agc cct caa aga gag aga aga aga aaa aag aga gga tta ttt      3037
Arg Asn Ser Pro Gln Arg Glu Arg Arg Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe
                340                 345                 350
gga gct ata gca ggt ttt ata gag gga gga tgg cag gga atg gta gat      3085
Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp
            355                 360                 365
ggt tgg tat ggg tac cac cat agc aac gag cag ggg agt ggg tac gct      3133
Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala
        370                 375                 380
gca gac aaa gaa tcc act caa aag gca ata gat gga gtc acc aat aag      3181
Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys
    385                 390                 395
gtc aac tcg att att gac aaa atg aac act cag ttt gag gcc gtt gga      3229
Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly
400                 405                 410                 415
agg gaa ttt aac aac tta gaa agg aga ata gag aat tta aac aag aag      3277
Arg Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys
                420                 425                 430
atg gaa gac ggg ttc cta gat gtc tgg act tat aat gct gaa ctt cta      3325
Met Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu
            435                 440                 445
gtt ctc atg gaa aac gag aga act cta gac ttt cat gac tca aat gtc      3373
Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val
        450                 455                 460
aag aac ctt tac gac aag gtc cga cta cag ctt agg gat aat gca aag      3421
Lys Asn Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys
    465                 470                 475
gag ctg ggt aac ggt tgt ttc gag ttc tat cat aaa tgt gat aat gaa      3469
Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu
480                 485                 490                 495
```

```
tgt atg gaa agt gta aga aac gga acg tat gac tac ccg cag tat tca      3517
Cys Met Glu Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser
                500                 505                 510
gaa gaa gca aga cta aaa aga gag gaa ata agt gga gta aaa ttg gaa      3565
Glu Glu Ala Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu
            515                 520                 525
tca ata gga att tac caa ata ttg tca att tat tct aca gtg gcg agc      3613
Ser Ile Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser
        530                 535                 540
tcc cta gca ctg gca atc atg gta gct ggt cta tcc tta tgg atg tgc      3661
Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys
    545                 550                 555
tcc aat ggg tcg tta caa tgc aga att tgc att taa atgggcccta           3707
Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
560                 565                 570
acaaaacaaa aagatggggt tattccctaa acttcatggg ttacgtaatt ggaagttggg   3767
ggacattgcc acaagatcat attgtacaaa agatcaaaca ctgttttaga aaacttcctg   3827
taaacaggcc tattgattgg aaagtatgtc aaaggattgt gggtcttttg ggctttgctg   3887
ctccatttac acaatgtgga tatcctgcct taatgccttt gtatgcatgt atacaagcta   3947
aacaggcttt cactttctcg ccaacttaca aggcctttct aagtaaacag tacatgaacc   4007
tttaccccgt tgctcggcaa cggcctggtc tgtgccaagt gtttgctgac gcaaccccca   4067
ctggctgggg cttggccata ggccatcagc gcatgcgtgg aacctttgtg gctcctctgc   4127
cgatccatac tgcggaactc ctagccgctt gttttgctcg cagccggtct ggagcaaagc   4187
tcataggaac tgacaattct gtcgtcctct cgcggaaata tacatcgttt cgatctacgt   4247
atgatctttt tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagcccctt gagcatctga   4307
cttctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc   4367
tctcactcgg aaggaattct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg   4427
cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg   4487
cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat   4547
aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc   4607
gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc   4667
tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga   4727
agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt   4787
ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg   4847
taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc   4907
gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg   4967
gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc   5027
ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg   5087
ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc   5147
gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct   5207
caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt   5267
taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa   5327
aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa   5387
tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc   5447
tgactc                                                             5453
```

<210> 60
<211> 570
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 60

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

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

```
       515                 520                 525
Ile Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser
    530                 535                 540
Leu Ala Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser
545                 550                 555                 560
Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
565                 570
```

<210> 61
<211> 5578
<212> DNA
<213> Artificial construct

<220>
<223> PJV2012 construct containing LTA and TLB coding sequences

<400> 61

```
ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg     60
agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa    120
agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc    180
tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg    240
tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat    300
ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca    360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga    420
aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcaaatgcaa ccggcgcagg    480
aacactgcca gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg    540
aatgctgttt tccccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata    600
aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca    660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg    720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat    780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt    840
tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacaggtcg    900
acaattcctt ccgagtgaga gacacaaaaa attccaacac actattgcaa tgaaaataaa    960
tttcctttat tagccagaag tcagatgctc aaggggcttc atgatgtccc cataattttt   1020
ggcagaggga aaaagatccc tagttttcca tactgattgc cgcaattgaa ttgggggttt   1080
tattattcca tacacataat ttatcaattt tggtctcggt cagatatgtg attcttaatg   1140
tgtccttcat cctttcaatg gctttttttt gggagtctat atgttgactg cccgggactt   1200
cgacctgaaa tgttgcgccg ctcttaaatg taatgataac catttctctt ttgcctgcca   1260
tcgattccgt atatgatagt atcttgtcat ttatcgtata tatttgtgtg ttgcgatatt   1320
ccgaacatag ttctgtaata gactggggag cgctagcccc cagagcagcc aggggcagga   1380
agcaaagcac caagattagc aaagacctac tagccatgtt cgtcacaggg tccccagtcc   1440
tcgcggagat tgacgagatg tgagaggcaa tattcggagc agggtttact gttcctgaac   1500
tggagccacc agcaggaaaa tacagacccc tgactctggg atcctgacct ggaagatagt   1560
cagggttgag gcaagcaaaa ggtacatgta agagaagagc ccacagcgtc cctcaaatcc   1620
ctggagtctt gactggggaa gccaggccca ccctggagag tacatacctg cttgctgaga   1680
tccggacggt gagtcactct tggcacgggg aatccgcgtt ccaatgcacc gttcccggcc   1740
gcggaggctg gatcggtccc ggtgtcttct atggaggtca aaacagcgtg gatggcgtct   1800
ccaggcgatc tgacggttca ctaaacgagc tctgcttata tagacctccc accgtacacg   1860
cctaccgccc atttgcgtca acggggcggg gttattacga cattttggaa agtcccgttg   1920
attttggtgc tcgacctgca ggtcgacaat attggctatt ggccattgca tacgttgtat   1980
ctatatcata atatgtacat ttatattggc tcatgtccaa tatgaccgcc atgttgacat   2040
tgattattga ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat   2100
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac   2160
ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc   2220
cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg   2280
tatcatatgc caagtccgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat   2340
tatgcccagt acatgacctt acgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc   2400
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacacca atgggcgtgg atagcggttt   2460
gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac   2520
caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aataaccccg ccccgttgac gcaaatgggc   2580
ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc   2640
```

gcctggagac gccatccacg ctgttttgac ctccatagaa gacaccggga ccgatccagc 2700
ctccgcggcc gggaacggtg cattggaacg cggattcccc gtgccaagag tgactcaccg 2760
tccggatctc agcaagcagg tatgtactct ccagggtggg cctggcttcc ccagtcaaga 2820
ctccagggat ttgagggacg ctgtgggctc ttctcttaca tgtacctttt gcttgcctca 2880
accctgacta tcttccaggt caggatccca gagtcagggg tctgtatttt cctgctggtg 2940
gctccagttc aggaacagta aaccctgctc cgaatattgc ctctcacatc tcgtcaatct 3000
ccgcgaggac tggggaccct gtgacgaaca tggctagtag gtctttgcta atcttggtgc 3060
tttgcttcct gcccctggct gctctggggg ctagcaatgg cgacaaatta taccgtgctg 3120
actctagacc cccagatgaa ataaaacgtt ccggaggtct tatgcccaga gggcataatg 3180
agtacttcga tagaggaact caaatgaata ttaatcttta tgatcacgcg agaggaacac 3240
aaaccggctt tgtcagatat gatgacggat atgtttccac ttctcttagt ttgagaagtg 3300
ctcacttagc aggacagtct atattatcag gatattccac ttactatata tatgttatag 3360
cgacagcacc aaatatgttt aatgttaatg atgtattagg cgtatacagc cctcacccat 3420
atgaacagga ggtttctgcg ttaggtggaa taccatattc tcagatatat ggatggtatc 3480
gtgttaattt tggtgtgatt gatgaacgat tacatcgtaa cagggaatat agagaccggt 3540
attacagaaa tctgaatata gctccggcag aggatggtta cagattagca ggtttcccac 3600
cggatcacca agcttggaga gaagaaccct ggattcatca tgcaccacaa ggttgtggaa 3660
attcatcaag aacaattaca ggtgatactt gtaatgagga gacccagaat ctgagcacaa 3720
tatatctcag gaaatatcaa tcaaaagtta agaggcagat attttcagac tatcagtcag 3780
aggttgacat atataacaga attcgggatg aattatgagg atctgggccc taacaaaaca 3840
aaaagatggg gttattccct aaacttcatg ggttacgtaa ttggaagttg ggggacattg 3900
ccacaagatc atattgtaca aaagatcaaa cactgtttta gaaaacttcc tgtaaacagg 3960
cctattgatt ggaaagtatg tcaaaggatt gtgggtcttt tgggctttgc tgctccattt 4020
acacaatgtg gatatcctgc cttaatgcct ttgtatgcat gtatacaagc taaacaggct 4080
ttcactttct cgccaactta caaggccttt ctaagtaaac agtacatgaa cctttacccc 4140
gttgctcggc aacggcctgg tctgtgccaa gtgtttgctg acgcaacccc cactggctgg 4200
ggcttggcca taggccatca gcgcatgcgt ggaacctttg tggctcctct gccgatccat 4260
actgcggaac tcctagccgc ttgttttgct cgcagccggt ctggagcaaa gctcatagga 4320
actgacaatt ctgtcgtcct ctcgcggaaa tatacatcgt ttcgatctac gtatgatctt 4380
tttcctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc 4440
taataaagga aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga atttttgtg tctctcactc 4500
ggaaggaatt ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt tgcgtattgg 4560
gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc 4620
ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 4680
aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 4740
ggcgtttttc cataggctcc gcccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 4800
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 4860
cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 4920
gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt 4980
tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc 5040
cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc 5100
cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 5160
gtggcctaac tacggctaca ctagaagaac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc 5220
agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 5280
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga 5340
tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gttaagggat 5400
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag 5460
ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc aatgcttaat 5520
cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactc 5578

<210> 62
<211> 6254
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> PJV7788 construct

<400> 62
ggcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa aaactcatcg 60
agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata tttttgaaaa 120

agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat ggcaagatcc 180
tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa tttcccctcg 240
tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc cggtgagaat 300
ggcaaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca 360
tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccgtta ttcattcgtg attgcgcctg agcgagacga 420
aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg 480
aacactgcca gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg 540
aatgctgttt tcccggggat cgcagtggtg agtaaccatg catcatcagg agtacggata 600
aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca 660
tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcatcg 720
ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat 780
ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt 840
tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt 900
attgttcatg atgatatatt tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt ttgagacaca 960
acgtggcttt ccccccccc ccggcatgcc tgcaggtcga caatattggc tattggccat 1020
tgcatacgtt gtatctatat cataatatgt acatttatat tggctcatgt ccaatatgac 1080
cgccatgttg acattgatta ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag 1140
ttcatagccc atatatggag ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct 1200
gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 1260
caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg 1320
cagtacatca agtgtatcat atgccaagtc cgcccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 1380
ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttacggga ctttcctact tggcagtaca 1440
tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac accaatgggc 1500
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga 1560
gtttgttttg gcaccaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaataac cccgcccccgt 1620
tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctcgtttag 1680
tgaaccgtca gatcgcctgg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc 1740
gggaccgatc cagcctccgc ggccgggaac ggtgcattgg aacgcggatt ccccgtgcca 1800
agagtgactc accgtccgga tctcagcaag caggtatgta ctctccaggg tgggcctggc 1860
ttccccagtc aagactccag ggatttgagg gacgctgtgg gctcttctct tacatgtacc 1920
ttttgcttgc ctcaaccctg actatcttcc aggtcaggat cccagagtca ggggtctgta 1980
ttttcctgct ggtggctcca gttcaggaac agtaaaccct gctccgaata ttgcctctca 2040
catctcgtca atctccgcga ggactgggga ccctgtgacg aacatggcta gtaggtcttt 2100
gctaatcttg gtgctttgct tcctgccccc ggctgctctg ggggctagcg ctccccagtc 2160
tattacagaa ctatgttcgg aatatcgcaa cacacaaata tatacgataa atgacaagat 2220
actatcatat acggaatcga tggcaggcaa aagagaaatg gttatcatta catttaagag 2280
cggcgcaaca tttcaggtcg aagtcccggg cagtcaacat atagactccc aaaaaaaagc 2340
cattgaaagg atgaaggaca cattaagaat cacatatctg accgagacca aaattgataa 2400
attatgtgta tggaataata aaacccccaa ttcaattgcg gcaatcagta tggaaaacta 2460
gggatctttt tccctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagcccctt gagcatctga 2520
cttctggcta ataaaggaaa tttattttca ttgcaatagt gtgttggaat tttttgtgtc 2580
tctcactcgg aaggaattga gggccggccc tctgcaggtc gacaatattg gctattggcc 2640
attgcatacg ttgtatctat atcataatat gtacatttat attggctcat gtccaatatg 2700
accgccatgt tgacattgat tattgactag ttattaatag taatcaatta cggggtcatt 2760
agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg 2820
ctgaccgccc aacgacccccc gcccattgac gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac 2880
gccaataggg actttccatt gacgtcaatg ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt 2940
ggcagtacat caagtgtatc atatgccaag tccgcccccct attgacgtca atgacggtaa 3000
atggcccgcc tggcattatg cccagtacat gaccttacgg gactttccta cttggcagta 3060
catctacgta ttagtcatcg ctattaccat ggtgatgcgg ttttggcagt acaccaatgg 3120
gcgtggatag cggtttgact cacggggatt tccaagtctc caccccattg acgtcaatgg 3180
gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga ctttccaaaa tgtcgtaata accccgcccc 3240
gttgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt 3300
agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 3360
ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc 3420
caagagtgac tcaccgtccg gatctcagca agcaggtatg tactctccag ggtgggcctg 3480
gcttccccag tcaagactcc agggatttga gggacgctgt gggctcttct cttacatgta 3540
ccttttgctt gcctcaaccc tgactatctt ccaggtcagg atcccagagt caggggtctg 3600
tattttcctg ctggtggctc cagttcagga acagtaaacc ctgctccgaa tattgcctct 3660
cacatctcgt caatctccgc gaggactggg gaccctgtga cgaacatggc tagtaggtct 3720
ttgctaatct tggtgctttg cttcctgccc ctggctgctc tgggggctag caatggcgac 3780

aaattatacc gtgctgactc tagaccccca gatgaaataa aacgttccgg aggtcttatg 3840
cccagagggc ataatgagta cttcgataga ggaactcaaa tgaatattaa tctttatgat 3900
cacgcgagag gaacacaaac cggctttgtc agatatgatg acggatatgt ttccacttct 3960
cttagtttga gaagtgctca cttagcagga cagtctatat tatcaggata ttccacttac 4020
tatatatatg ttatagcgac agcaccaaat atgtttaatg ttaatgatgt attaggcgta 4080
tacagccctc acccatatga acaggaggtt tctgcgttag gtggaatacc atattctcag 4140
atatatggat ggtatcgtgt taattttggt gtgattgatg aacgattaca tcgtaacagg 4200
gaatatagag accggtatta cagaaatctg aatatagctc cggcagagga tggttacaga 4260
ttagcaggtt tcccaccgga tcaccaagct tggagagaag aaccctggat tcatcatgca 4320
ccacaaggtt gtggaaattc atcaagaaca attacaggtg atacttgtaa tgaggagacc 4380
cagaatctga gcacaatata tctcaggaaa tatcaatcaa aagttaagag gcagatattt 4440
tcagactatc agtcagaggt tgacatatat aacagaattc gggatgaatt atgaggatct 4500
gggccctaac aaaacaaaaa gatggggtta ttccctaaac ttcatgggtt acgtaattgg 4560
aagttggggg acattgccac aagatcatat tgtacaaaag atcaaacact gttttagaaa 4620
acttcctgta aacaggccta ttgattggaa agtatgtcaa aggattgtgg gtcttttggg 4680
ctttgctgct ccatttacac aatgtggata tcctgcctta atgcctttgt atgcatgtat 4740
acaagctaaa caggctttca ctttctcgcc aacttacaag gcctttctaa gtaaacagta 4800
catgaacctt taccccgttg ctcggcaacg gcctggtctg tgccaagtgt ttgctgacgc 4860
aacccccact ggctggggct tggccatagg ccatcagcgc atgcgtggaa cctttgtggc 4920
tcctctgccg atccatactg cggaactcct agccgcttgt tttgctcgca gccggtctgg 4980
agcaaagctc ataggaactg acaattctgt cgtcctctcg cggaaatata catcgtttcg 5040
atctacgtat gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga 5100
gcatctgact tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt 5160
tttgtgtctc tcactcggaa ggaattctgc attaatgaat cggccaacgc gcggggagag 5220
gcggtttgcg tattgggcgc tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg 5280
ttcggctgcg gcgagcggta tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat 5340
caggggataa cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta 5400
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa 5460
atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc 5520
cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt 5580
ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca 5640
gttcggtgta ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg 5700
accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat 5760
cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta 5820
cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct 5880
gcgctctgct gaagccagtt accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac 5940
aaaccaccgc tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa 6000
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa 6060
actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt 6120
taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca 6180
gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat ctgtctattt cgttcatcca 6240
tagttgcctg actc 6254

<210> 63
<211> 18
<212> DNA
<213> Artficial sequence

<400> 63
gccactctct tccgacac 18

<210> 64
<211> 19
<212> DNA
<213> Artficial sequence

<400> 64
caagaacatc acacggaac 19

<210> 65
<211> 512
<212> PRT
<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 65

Met Ala Thr Asp Ile Asp Met Leu Ile Asp Leu Gly Leu Asp Leu Ser
1 5 10 15

Asp Ser Glu Leu Glu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Asp Glu Glu Gly Arg
20 25 30

Arg Asp Asp Pro Glu Ser Asp Ser Ser Gly Glu Cys Ser Ser Ser Asp
35 40 45

Glu Asp Met Glu Asp Pro Cys Gly Asp Gly Gly Ala Glu Ala Ile Asp
50 55 60

Ala Ala Ile Pro Lys Gly Pro Pro Ala Arg Pro Glu Asp Ala Gly Thr
65 70 75 80

Pro Glu Ala Ser Thr Pro Arg Pro Ala Ala Arg Arg Gly Ala Asp Asp
85 90 95

Pro Pro Pro Ala Thr Thr Gly Val Trp Ser Arg Leu Gly Thr Arg Arg
100 105 110

Ser Ala Ser Pro Arg Glu Pro His Gly Gly Lys Val Ala Arg Ile Gln
115 120 125

Pro Pro Ser Thr Lys Ala Pro His Pro Arg Gly Gly Arg Arg Gly Arg
130 135 140

Arg Arg Gly Arg Gly Arg Tyr Gly Pro Gly Gly Ala Asp Ser Thr Pro
145 150 155 160

Asn Pro Arg Arg Arg Val Ser Arg Asn Ala His Asn Gln Gly Gly Arg
165 170 175

His Pro Ala Ser Ala Arg Thr Asp Gly Pro Gly Ala Thr His Gly Glu
180 185 190

Ala Arg Arg Gly Gly Glu Gln Leu Asp Val Ser Gly Gly Pro Arg Pro
195 200 205

Arg Gly Thr Arg Gln Ala Pro Pro Pro Leu Met Ala Leu Ser Leu Thr
210 215 220

Pro Pro His Ala Asp Gly Arg Ala Pro Val Pro Glu Arg Lys Ala Pro
225 230 235 240

Ser Ala Asp Thr Ile Asp Pro Ala Val Arg Ala Val Leu Arg Ser Ile
245 250 255

Ser Glu Arg Ala Ala Val Glu Arg Ile Ser Glu Ser Phe Gly Arg Ser
260 265 270

Ala Leu Val Met Gln Asp Pro Phe Gly Gly Met Pro Phe Pro Ala Ala
275 280 285

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

Ala Glu Thr Arg Arg Val Ser Trp Glu Thr Leu Val Ala His Gly Pro
305 310 315 320

Ser Leu Tyr Arg Thr Phe Ala Ala Asn Pro Arg Ala Ala Ser Thr Ala
325 330 335

Lys Ala Met Arg Asp Cys Val Leu Arg Gln Glu Asn Leu Ile Glu Ala
340 345 350

Leu Ala Ser Ala Asp Glu Thr Leu Ala Trp Cys Lys Met Cys Ile His
355 360 365

His Asn Leu Pro Leu Arg Pro Gln Asp Pro Ile Ile Gly Thr Ala Ala
370 375 380

Ala Val Leu Glu Asn Leu Ala Thr Arg Leu Arg Pro Phe Leu Gln Cys
385 390 395 400

Tyr Leu Lys Ala Arg Gly Leu Cys Gly Leu Asp Asp Leu Cys Ser Arg
405 410 415

Arg Arg Leu Ser Asp Ile Lys Asp Ile Ala Ser Phe Val Leu Val Ile
420 425 430

Leu Ala Arg Leu Ala Asn Arg Val Glu Arg Gly Val Ser Glu Ile Asp
435 440 445

Tyr Thr Thr Val Gly Val Gly Ala Gly Glu Thr Met His Phe Tyr Ile

450 455 460

Pro Gly Ala Cys Met Ala Gly Leu Ile Glu Ile Leu Asp Thr His Arg
465 470 475 480

Gln Glu Cys Ser Ser Arg Val Cys Glu Leu Thr Ala Ser His Thr Ile
485 490 495

Ala Pro Leu Tyr Val His Gly Lys Tyr Phe Tyr Cys Asn Ser Leu Phe
500 505 510

<210> 66
<211> 18
<212> PRT
<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 66
Arg Val Ser Trp Glu Thr Leu Val Ala His Gly Pro Ser Leu Tyr Arg
1 5 10 15

Thr Phe

<210> 67
<211> 18
<212> PRT
<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 67
Val Ala His Gly Pro Ser Leu Tyr Arg Thr Phe Ala Ala Asn Pro Arg
1 5 10 15

Ala Ala

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial sequence

<400> 68
His Gly Pro Ser Leu Tyr Arg Thr Phe
1 5

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Herpes Simplex Virus 2

<400> 69
Leu Tyr Arg Thr Phe Ala Ala Asn Pro Arg Ala
1 5 10

<210> 70
<211> 11
<212> PRT

<213> Herpes Simplex Virus 1

<400> 70
Leu Tyr Arg Thr Phe Ala Gly Asn Pro Arg Ala
1 5 10

CONSTRUCCIONES DE ACIDO NUCLEICO

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a los campos de la biología molecular e inmunología y generalmente a reactivos útiles en técnicas de inmunización de ácido nucleico. Más específicamente, la invención se refiere a construcciones de ácido nucleico para la expresión de polipéptidos y en particular polipéptidos antigénicos, particularmente antígenos de influenza así como la expresión de polipéptidos adyuvantes y a estrategias de inmunización de ácido nucleico que utilizan tales reactivos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La terapia de gen y la inmunización de ácido nucleico son métodos prometedores para el tratamiento y prevención tanto de enfermedades adquiridas como heredadas. Estas técnicas proveen la transferencia de un ácido nucleico en un sujeto con la subsiguiente expresión *in vivo*. La transferencia se puede lograr transfectando las células o tejidos del sujeto *ex vivo* y reintroduciendo el material transformado en el hospedero. Alternativamente, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* directamente al receptor.

Cada una de estas técnicas requiere la expresión eficiente de ácido nucleico en la célula transfectada, para proveer una cantidad suficiente del producto de gen

terapéutico o antigénico. Se conocen varios factores que afectan los niveles de expresión obtenidos, incluyendo la eficiencia de la transfección, y la eficacia con la cual el gen o secuencia de interés se transcribe y el ARNm traducido.

Se han descrito en la técnica un número de sistemas de expresión, cada uno de los cuales típicamente consiste de un vector que contiene una secuencia de gen o nucleótido de de interés operablemente enlazado a las secuencias de control de la expresión. Estas secuencias de control incluyen secuencias de promotor trascripcionales y secuencias de inicio y terminación trascripcional. Los promotores comúnmente utilizados para sistemas de expresión de células de mamífero incluyen el promotor temprano de SV40, un promotor de citomegalovirus (CMV, por sus siglas en inglés) tal como el promotor temprano inmediato CMV (Chapman y otros (1991) *Nucl. Acids Res.* 19:3979-3986), el promotor de larga repetición de terminal (LTR) del virus de tumor de mama de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus (Ad MLP, por sus siglas en inglés) y el promotor del virus simple de herpes (HSV, por sus siglas en inglés), entre otros. Los promotores no virales, tales como el promotor derivado del gen de metalotioeneina de murino también es comúnmente utilizado.

Los sistemas de expresión por lo general incluyen elementos moduladores trascripcionales, referidos como

"potenciadores". Los potenciadores son ampliamente definidos como un agente de actuación cis, el cual cuando está operablemente enlazado a una secuencia promotora/gen incrementará la trascripción de esa secuencia de gen. Los potenciadores pueden funcionar desde posiciones que están más lejos de la secuencia del interés que otros elementos de control de expresión (por ejemplo, promotores), y pueden operar cuando se colocan en cualquier orientación relativa a la secuencia del interés (Banerji y otros. (1981) *Cell* 27:299-308, deVilleirs y otros. (1981) *Nucl. Acids Res* 9: 6251 -6264). Los potenciadores se han identificado de un número de fuentes virales, incluyendo el virus de polioma, de virus de BK, citomegalovirus (CMV), adenovirus, el virus de simio 40 (SV40), el virus de sarcoma de Moloney, el virus de papiloma de los bovino y virus de sarcoma de Rous (deVilleirs y otros *supra*, Rosenthal y otros. (1983) *Science* 222:749-755, Hearing y otros (1983) *Cell* 33:695-703, Weeks y otros, (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3:1222-1234, 5 Levinson y otros, (1982) *Nature* 295: 568-572, y Luciw y otros, (1983) *Cell* 33: 705-716).

Un número de sistemas de expresión para la inmunización de ácido nucleico y la terapia de gen hacen uso a promotor temprano inmediato del hCMV. Ver por ejemplo las Patentes de Estados Unidos Nos. 5168062 y 5385839 de Stinski, y la especificación de Patente EP 0323997 Bl. Los vectores de

expresión que utilizan el promotor temprano inmediato hCMV incluyen por ejemplo, pWRG7128 (Roy y otros, Vaccine 19, 764-778, 2001), y pBC12/CMV y pJW4303 que se mencionen en WO 95/20660. Chapman y otros reportó niveles reducidos de expresión del promotor temprano inmediato hCMV en ausencia del intrón A hCMV.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Se ha estado desarrollado una construcción de ácido nucleico utilizando las secuencias de promotor/expresión virales manipuladas que proveen la expresión mejorada de las secuencias de codificación heterólogas en células hospederas. La construcción es adecuada para la expresión eficiente de genes y particularmente genes que codifican el antígeno, y que por consiguiente se puede utilizar en la inmunización de ácido nucleico. La construcción se puede también utilizar para expresar los polipéptidos adyuvantes. La construcción puede ser provista en partículas portadoras, para uso en la inmunización de ácido nucleico mediada por partículas. En una modalidad especialmente preferida de la invención la construcción codifica un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica del mismo. En una modalidad adicional especialmente preferida la construcción codifica un polipéptido adyuvante. Por consiguiente, la presente invención provee una construcción de ácido nucleico adecuada para distribuir a un sujeto por

inducción una respuesta inmune contra el antígeno de hemaglutinina (HA) del virus de influenza, cuya construcción comprende:

(i) una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) la secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV;

(ii) una secuencia de codificación enlazada de manera operable con el promotor quimérico, en donde la secuencia de codificación codifica un antígeno de hemaglutinina (HA) de virus de influenza, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de dicho antígeno o fragmento que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido a dicho antígeno o fragmento;

(iii) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia de e-antígeno HBV o la secuencia de antígeno HSV de tipo 2gD y que está en un enlace operable con el promotor quimérico; y

(iv) una secuencia potenciadora que se deriva de una región no traducida 3' (UTR) de una secuencia HBsAg o de una secuencia de gen temprano inmediato CMV de simio, que

está operablemente enlazada con el promotor quimérico y la cual está en dirección 3´ de la secuencia de codificación. La presente invención también provee una construcción de ácido nucleico adecuada para distribuir a un sujeto por inducción una respuesta inmune contra el antígeno de hemaglutinina (HA) del virus de influenza, cuya construcción comprende:

(i) una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV;

(ii) una secuencia de codificación enlazada de manera operable con el promotor quimérico, en donde la secuencia de codificación codifica un antígeno de hemaglutinina (HA) de virus de influenza, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de dicho antígeno o fragmento que tiene por lo menos 80% homología de aminoácido a dicho antígeno o fragmento.

Además, la presente invención provee una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora quimérica y un sitio de clonación para inserción de

una secuencia de codificación en un enlace operable con el promotor quimérico, en donde la secuencia promotora quimérica comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV.

En una instancia preferida, la construcción comprende una secuencia de codificación insertada en el sitio de clonación. De esta forma, una secuencia de codificación se puede proveer en el sitio de clonación. En una modalidad preferida adicional una construcción de la invención además puede comprender:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, una secuencia de e-antígeno HBV o secuencia de antígeno HSV de tipo 2 gD, y que está operable enlazada con el promotor quimérico; y/o

(b) una secuencia potenciadora que se deriva de una región no-traducida 3' (UTR) de una secuencia HBsAg, o una UTR 3' de una secuencia de gen temprano inmediato CMV de simio y que está operable enlazada con el promotor quimérico, en donde la secuencia potenciadora está en dirección 3´ del

sitio de clonación.

La invención también provee una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada al promotor, en donde la construcción además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia de e-antígeno HBV, o una secuencia de antígeno HSV de tipo 2gD, que está operablemente enlazada a la secuencia de codificación y al promotor que es heterólogo a la secuencia de codificación; y/o

(b) una secuencia promotora 3' de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de una UTR 3' de una secuencia de HBsAg, o una UTR 3' de una secuencia de gen temprano inmediato CMV de simio, y a la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadota 3'.

La invención también provee una construcción de ácido nucleico que comprende:

(i) una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(ii) el sitio de clonación para inserción de una secuencia de codificación en enlace operable con el promotor quimérico; y

(iii) (a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBV preS2, una secuencia e-antígeno HBV o secuencia de antígeno HSV de tipo 2gD y que está operablemente enlazada al promotor quimérico; y/o

(b) una secuencia potenciadora que se deriva de una región no traducida 3' (UTR) y una secuencia de HBsAg, o una UTR 3' de la secuencia de gen temprano inmediato CMV de simio y que está operablemente enlazada con el promotor quimérico, en donde la secuencia potenciadora está en sentido descendente del sitio de clonación.

La invención también provee una construcción de ácido nucleico que comprende:

(i) una secuencia promotora;

(ii) una secuencia líder no-traducida derivada de la secuencia de antígeno HBV preS2, la secuencia e-antígeno HBV o la secuencia de antígeno HSV de tipo 2gD; y

(iii) una secuencia de codificación operablemente enlazada a (i) y (ii)

en donde la secuencia de codificación es heteróloga

a la secuencia líder no-traducida.

La invención también provee una construcción de ácido nucleico que comprende:

(i) una secuencia promotora;

(ii) una secuencia de codificación operablemente enlazada a la secuencia promotora (i); y

(iii) una secuencia potenciadora 3' de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación (ii);

en donde la secuencia potenciadora (iii) se deriva de un UTR 3' de una secuencia de HBsAg o una UTR 3' de una secuencia de gen temprano inmediata CMV de simio, y la secuencia de codificación (ii) es heteróloga a la secuencia potenciadora 3'.

La presente invención también provee una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada al promotor, en donde la construcción además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia de e-antígeno HBV, o una secuencia de antígeno HSV de tipo 2gD, que está operablemente enlazada a la secuencia de codificación y al promotor que es heterólogo a la secuencia de codificación; y/o

(b) una secuencia promotora 3' de y operablemente

enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de una UTR 3' UTR de una secuencia de HBsAg, o una UTR 3' de una secuencia de gen temprano inmediato CMV de simio, y a la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadota 3'.

La presente invención provee además una población de construcciones de ácido nucleico en donde la población comprende por lo menos dos diferentes construcciones de la invención.

En otra instancia, la invención provee una secuencia promotora quimérica aislada purificada que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal del hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal del hCMV.

La invención también provee

un método de obtener la expresión en células de mamífero de un polipéptido de interés, cuyo método comprende transferir en las células una construcción de ácido nucleico, una población de construcciones de ácido nucleico o partículas cubiertas de la invención;

las partículas cubiertas, adecuadas para la distribución desde un dispositivo de distribución mediado por partículas, cuyas partículas comprenden partículas portadoras cubiertas con una construcción de ácido nucleico de la invención, la construcción incluye una secuencia de codificación que codifica el polipéptido;

un receptáculo de dosificación para un dispositivo de distribución mediado por partículas que comprende las partículas cubiertas;

una dispositivo de distribución mediado por partículas cargado con las partículas cubiertas;

un método para inmunización de ácido nucleico que comprende administrar a un sujeto de una cantidad efectiva de partículas cubiertas de la invención;

- una composición farmacéutica que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención o una población de construcciones de ácido nucleico de la invención junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable;

- una composición de vacuna que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención o una población de construcciones de ácido nucleico de la invención o de partículas cubiertas de la invención.

También se provee el uso de una construcción de ácido nucleico de la invención, una población de

construcciones de ácido nucleico de la invención o de partículas cubiertas de la invención en la fabricación de un medicamento para la inmunización de ácido nucleico.

Estos y otros objetos, aspectos, modalidades y ventajas de la presente invención se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la descripción de la presente.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra los niveles de expresión del antígeno del superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) obtenido utilizando varios vectores de expresión del plásmido.

La Figura 2 muestra el efecto de la inclusión del intrón en la expresión de HBsAg en células SCC15 y de beta-gal en células de B16 (promedio de tres experimentos).

La Figura 3 muestra el efecto de un intrón A de insulina de rata y la UTR 3' en la expresión de beta-gal en células SCC15 (promedio de tres experimentos).

La Figura 4 muestra el efecto del intrón A de insulina de la rata y la UTR 3' HSVgD en la expresión de SCC 15 (promedio de tres experimentos).

La Figura 5 muestra el efecto del intrón A de insulina de la rata y la UTR 3' HBV en la expresión de SEAP en células SCC15 y células B16 (tres repeticiones por línea de células).

La Figura 6 muestra la habilidad de los péptidos de señal heterólogos para dirigir la secreción de SEAP o del fragmento hFc en células B16.

La Figura 7 ilustra los niveles de anticuerpos detectados en el suero de ratones inmunizados con ácidos nucleicos que codifican el antígeno contenido en una variedad de vectores de expresión de plásmido.

La Figura 8 es una representación diagramática del vector de expresión pPJV.

La Figura 9 es una representación diagramática de pPJV7389.

La Figura 10 es una representación diagramática de pPJV7400.

La Figura 11 es una representación diagramática de pPJV7468.

La Figura 12 es una representación diagramática de pPJV7563.

La Figura 13 establece la composición base para pPJV7563.

La Figura 14 provee una gráfica de flujo de la derivatización de los plásmidos pPJV7563 y pPJV1 671.

Las Figuras 15a-15f proveen los mapas de los plásmidos clave en la construcción de pPJV1671.

La Figura 16 provee un mapa de característica de pPJV1671 y provee una comparación de secuencia de las

secuencias de la terminal N del antígeno H3 de Panamá HA natural y del antígeno HA de H3 Panamá codificado por el pPJV1 671.

La Figura 17 muestra las concentraciones de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación en puercos vacunados con pPJV1671.

La Figura 18 muestra las reacciones de la piel locales después de la distribución epidérmica mediada por partícula de pPJV1671 a seres humanos.

La Figura 19 muestra las concentraciones de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación en puercos inmunizados con una vacuna trivalente basada en PMED. Las concentraciones HI específicas para los virus H3, H1 y B se muestran para dos dispositivos PMED.

La Figura 20 es una representación diagramática de pPML7789.

Las Figuras 21a-21k muestran la secuencia comentada de pPML7789.

La Figura 22 es una representación diagramática de pPJV2012.

La Figura 23 es una gráfica de flujo para la construcción de pPJV2012.

Las Figuras 24a-24e proveen la secuencia comentada de pPJV2012.

La Figura 25 es una representación diagramática del

vector pPJV7788.

La Figura 26 es una representación diagramática del vector pPJV7788 que muestra los sitios de restricción.

La Figura 27 es una representación diagramática de pICP27.

La Figura 28 es la secuencia de aminoácido (SEC ID NO:65) de ICP27 de la cepa MS de HSV-2 con base en la secuencia de nucleótido de pICP27. La diferencia del aminoácido individual entre la secuencia publicada de ICP27 de la cepa HSV-2 MS (asparagina=N) y la cepa HG52 (lisina) está en tipo oscuro. La secuencia identificada como el epítopo CD8 putativo en la cepa HSV-2 MS está subrayada.

Las Figuras 29a-29b muestran la identificación de un epítopo ICP27 dominante en ratones Balb/c. Fig.29a: bazo(S) y células del nódulo linfático (N) de ratones Balb/c infectados con HSV-2 (BS y BN, respectivamente) o ratones C57BL/6 (CS y CN) se ensayaron para actividad ELISPOT IFN-γ utilizando grupos de varios péptidos (C1-C12, R1-R6) descritos en el Ejemplo 22. Se colocaron en placas 5×10^5 células en cada cavidad y los resultados se tabularon como negativo (cuadros vacíos), débil (<25 ELISPOT/cavidad, cuadros grises) o fuerte (>25 ELISPOT/cavidad, cuadros negros). Fig.29b: Secuencias de dos péptidos (SEC ID NO:66 y 67) reconocidos por las células de ratones Balb/c resaltando un epítopo HSV-2 Dd potencial (negritas) y una región

(subrayada) correspondiente a un epítopo HSV-I identificado previamente (Banks y otros, J. Virol. 67, 613-616, 1993).

La Figura 30 reporta la caracterización de la respuesta Balb/c a ICP27 utilizando un ensayo ELISPOT IFN-γ. Las células de bazo de ratones Balb/c infectados se ensayaron para la actividad ELISPOT IFN-γ utilizando el grupo de péptidos hecho de todos los péptidos de péptidos ICP27 (Pool), o péptidos individuales HGPSLYRTF (P1, SEC ID NO:68) y LYRTFAANPRA (P2, SEC ID NO:69). Se colocaron en placas 5 x 10^5 células en cada cavidad y los resultados se expresaron como número de ELISPOT/cavidad. Además, se trató una alícuota de una muestra celular de bazo con perlas magnéticas para consumir la muestra de células CD8+ como se describe en el Ejemplo 22. La muestra original (+CD8) y la muestra consumida (-CD8) se ensayaron para la actividad ELISPOT IFN-γ utilizando el grupo de péptidos hecho de todos los péptidos de ICP27 (Grupo).

Las Figuras 31a-31c muestran la correlación entre la protección del ataque HSV-2 y la producción de citocinas específicas de ICP27. Los grupos de 16 ratones recibieron inmunizaciones primarias y de refortalecimiento de ADN PMED consistiendo de la vacuna de ADN pICP27 con y sin el vector pPJV2013 CT DEI (subunidad doble A+B) o subunidad del vector LT DEI pPJV2012 (doble A+B1). El pICP27 para vector de DEI fue de una relación de 9:1. Panel A: datos de supervivencia

del ataque postulado. La mitad de los animales en cada grupo se estimuló dos semanas después de la segunda inmunización con 50 LD_{50} de HSV-2. Los paneles B y C: ICP27 específico de ICP27 y producción de IFN-γ y TNF-α en cada grupo, respectivamente. Los animales restantes se sacrificaron al mismo tiempo y los esplenocitos se recolectaron para la medición de la producción de citosina específica de ICP27 utilizando un kit de arreglo de perlas citométrico.

La Figura 32 muestra el papel de IFN-γ y TNF- α en la protección del ataque letal HSV-2-evaluación de morbidez. Los grupos de 4 ratones recibieron inmunizaciones primarias y de refortalecimiento con la vacuna de ADN de pICP27 PMED con (4 grupos) o sin (1 grupo) el vector A+B LT DEI doble pPJV2012. El pICP27 para el vector de DEI estuvo en una relación de 9:1. Los animales fueron atacados intranasalmente durante dos semanas después con 50 LD_{50} de HSV-2. Para el consumo de la célula T, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales conteniendo 200 µg de anticuerpo monoclonal específico para IFN-γ y/o TNF-α en los días -2, 0, 2, 4, 6, y 8, con relación al ataque del virus como se describió en el Ejemplo 22. Los animales se monitorearon para mortalidad (% de supervivencia) y morbidez, las puntuaciones en una escala de 0 a 4 de acuerdo con el siguiente programa: 4, sano; 3, pelo encrespado, estornudos; 2, ulceraciones en los ojos o traseros, movimiento reducido; 1, encorvados, poco

movimiento; 0, muerto.

La Figura 33 muestra el papel de las poblaciones de T-célula en la protección del reto letal HSV-2. Cinco grupos de 4 ratones recibieron inmunizaciones principales y de refortalecimiento con la vacuna de ADN pICP27 PMED con (+LT5 4 grupos) o sin (-LT, 1 grupo) del vector DEI A+B LT doble PJV2012. El pICP27 para el vector de DEI estuvo en la relación 9:1. Los animales se atacaron intranasalmente con 50 LD_{50} de HSV-2 dos semanas después. Tres grupos de los animales inmunizados con ICP27+LT DEI se trataron con inyecciones intraperitoneales de 90 µg de anticuerpos monoclonales específicos de αCD4 y/o αCD8, en los días -2 y 0 como relación al ataque del virus. Con el fin de mantener ADN total en el grupo solo de pICP27 (indicado como -LT) igual a los grupos pICP27 + LT, el vector vacío se agregó al grupo solo de ICP27.

BREVE DESCRIPCION DE LAS SECUENCIAS

SEC ID NO:1 es una secuencia promotora temprana inmediata hCMV (GenBank #M60321, X17403)

SEC ID NO:2 es una secuencia de los exones 1 y 2 del gen temprano inmediato principal hCMV (GenBank #M60321, X17403)

SEC ID NO:3 es una secuencia de intrón A de insulina de la rata (GenBank #J00748)

SEC ID NO:4 es la secuencia de un promotor

quimérico de acuerdo con la presente invención

SEC ID NO:5 es una secuencia líder de la secuencia de UTR 5' del antígeno HBV pre S2 (GenBank #M54923)

SEC ID NO:6 es una secuencia líder de la secuencia UTR 5' gD de tipo 2 HSV (GenBank #Z86099)

SEC ID NO:7 es una secuencia líder de la secuencia UTR 5' del e-antígeno HBV (GenBank #M54923)

SEC ID NO:8 es la secuencia UTR 3' HBVenh (GenBank #AF143308)

SEC ID NO:9 es la secuencia UTR 3' del gen temprano inmediato de simio(GenBank #M16019)

SEC ID NO:10 es la secuencia de poli A de globina de conejo (GenBank #K03256)

SEC ID NO:11 es una secuencia poli A de gen temprano inmediato sCMV de simio (GenBank #M16019)

SEC ID NO:12 es una secuencia poli A del gen gB HSV2 (GenBank #Z86099)

SEC ID NO:13 es secuencia poli A del gen temprano HPV16 (GenBank #K02718)

SEC ID NO:14 es la secuencia del vector de expresión pPJV.

SEC ID NO:15 es el iniciador de un JF93 de PCR

SEC ID NO:16 es el iniciador F110 PCR

SEC ID NO:17 es el iniciador GW1 de PCR

SEC ID NO:18 es el iniciador JF254 de PCR

SEC ID NO:19 es el iniciador GW150 de PCR

SEC ID NO:20 es el iniciador JF255 de PCR

SEC ID NO:21 es el iniciador DS1 de PCR

SEC ID NO:22 es el iniciador DA1 de PCR

SEC ID NO:23 es el iniciador JF301 de PCR

SEC ID NO:24 es el iniciador JG302 de PCR

SEC ID NO:25 es el iniciador JF84 de PCR

SEC ID NO:26 es el iniciador JF225 de PCR

SEC ID NO:27 es el iniciador JF335 de PCR

SEC ID NO:28 es el iniciador JF336 de PCR

SEC ID NO:29 es el iniciador JF358 de PCR

SEC ID NO:30 es el iniciador JF365 de PCR

SEC ID NO:31 es el iniciador JF393 de PCR

SEC ID NO:32 es el iniciador JF406 de PCR

SEC ID NO:33 es el iniciador JF256 de PCR

SEC ID NO:34 es el iniciador JF257 de PCR

SEC ID NO:35 es el iniciador JF320 de PCR

SEC ID NO:36 es el iniciador JF321 de PCR

SEC ID NO:37 es el iniciador JF386 de PCR

SEC ID NO:38 es el iniciador FcAS de PCR

SEC ID NO:39 es el oligonucleótido JF354

SEC ID NO:40 es el iniciador JF355 de PCR

SEC ID NO:41 es el iniciador JF356 de PCR

SEC ID NO:42 es el oligonucleótido JF348

SEC ID NO:43 es el iniciador JF349 de PCR

SEC ID NO:44 es el iniciador JF350 de PCR

SEC ID NO:45 es el oligonucleótido JF351

SEC ID NO:46 es el iniciador JF352 de PCR

SEC ID NO:47 es el iniciador JF353 de PCR

SEC ID NO:48 es el iniciador JF430 de PCR

SEC ID NO:49 es el iniciador JF442 de PCR

SEC ID NO:50 es el iniciador JF421 de PCR

SEC ID NO:51 es el iniciador JF444 de PCR

SEC ID NO:52 es la secuencia promotora del virus de Pseudorabia (PRV).

SEC ID NO:53 es la secuencia promotora del virus de sarcoma de Rous (RSV).

SEC ID NO:54 provee la secuencia de nucleótido del vector pPJV1671 y de la secuencia de aminoácido del antígeno HA H3N2 codificado.

SEC ID NO:55 provee la secuencia de aminoácido sola del antígeno HA H3N2 codificado por pPJV1671.

SEC ID NO:56 provee la secuencia de aminoácido N-terminal natural de antígeno HA de Panamá H3.

SEC ID NO:57 provee la secuencia de aminoácido N-terminal para el antígeno HA de Panamá H3 codificado por pPJV1671.

SEC ID NO:58 provee la secuencia de consenso de las secuencias SEC ID Nos 56 y 57.

SEC ID NO:59 provee la secuencia de nucleótido del

vector pPML7789 y de secuencia de aminoácido del antígeno de VN1194H5.

SEC ID NO:60 provee la secuencia de aminoácido sola del antígeno de VN1194H5.

SEC ID NO:61 provee la secuencia de nucleótido del vector pPJV2012.

SEC ID NO:62 provee la secuencia de nucleótido del vector PJV7788.

SEC ID NOS:63 y 64 son los cebadores 5' y 3' utilizados en el Ejemplo 22 para amplificar el ADN de la cepa MS de HSV-2.

SEC ID NO:65 es la secuencia de aminoácido de ICP27 de la cepa del MS de HSV-2 con base en la secuencia de nucleótido de pICP27, Ejemplo 22.

SEC ID NO:66 y 67 son péptidos 45 y 46 reconocidos por células de ratones Balb/c en el Ejemplo 22.

SEC ID NO:68 es una secuencia de aminoácido de nuevo homólogos contenidos en los péptidos 45 y 46.

SEC ID NOS:69 y 70 son regiones de aminoácido de HSV-2 ICP27 y HSV-1 ICP27 que difieren por un aminoácido.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Antes de describir la presente invención con detalle, se entiende que esta invención no está limitada a las moléculas o parámetros del procedimiento particularmente ilustrados los cuales por supuesto pueden variar. También se

entiende que la terminología utilizada en la presente es para el propósito de describir modalidades particulares de la invención solamente, y no pretende ser limitante. Además, la práctica de la presente invención utilizará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de virología, microbiología, biología molecular, técnicas de ADN recombinantes e inmunología todos los cuales están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se ejemplifican completamente en la literatura. Ver, por ejemplo, Sambrook, y otros., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2da Edición, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach,* vol. I & II (D. Glover, ed.); *Oligonucleotide Synthesis* (N. Gait, ed., 1984); *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); y *Fundamental Virology*, 2a. Edición, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe, ed.).

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en la presente, ya sea *supra* o *infra*, se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Se debe observar que, como se utiliza en la especificación y las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "uno" y "el, la" incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario.

En instancias en donde se especifica un agente particular como comprendiendo unidades particulares, en una

instancia preferida el agente puede consistir esencialmente de dichas unidades.

A. Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica para el cual pertenece la invención. Aunque un número de métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí se pueden utilizar en la práctica de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen aquí.

En la descripción de la presente invención, se utilizarán los siguientes términos, y pretenden estar definidos como se indica a continuación.

El término "inmunización de ácido nucleico" se utiliza aquí para referirse a la introducción de una molécula de ácido nucleico que codifica uno o más antígenos o polipéptidos una célula hospedera para la expresión *in vivo* del antígeno o de antígenos. La molécula de ácido nucleico se puede introducir directamente en el sujeto receptor, tal como a través de inyección intramuscular o intradérmica estándar; distribución de partículas transdérmicas; inhalación; tópicamente, o a través de modos de administración orales, intranasales o mucosal. Particularmente, el ácido nucleico se puede administrar a través de la distribución de partículas

transdérmicas. La molécula alternativamente se puede introducir *ex vivo* en células que se han sido removidas de un sujeto. En este último caso, las células contienen la molécula de ácido nucleico de interés se reintroducen en el sujeto de tal forma que se puede montar una respuesta inmune contra el antígeno codificado por la molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico utilizadas en la inmunización son generalmente referidas en la presente como "vacunas de ácido nucleico". Cualquiera de los ácidos nucleicos mencionados pueden estar presentes en dichas vacunas y en particular las construcciones de ácido nucleico mencionadas aquí pueden estar presentes.

El término "adyuvante" significa un material o composición capaz de específica o no específicamente alterar, mejorar, dirigir, redirigir, potenciar o iniciar una respuesta inmune específica de antígeno. De esta forma, la coadministración de un adyuvante con un antígeno puede dar como resultado una dosis inferior o menos dosis del antígeno siendo necesario para lograr una respuesta inmune deseada en el sujeto al cual el antígeno se administra, o la coadministración puede dar como resultado una respuesta inmune cualitativa y/o cuantitativamente diferente en el sujeto. En particular, la administración del adyuvante puede dar como resultado una respuesta inmune mejorada tal como una de mayor magnitud y/o duración. La efectividad de un

adyuvante se puede determinar a través de la administración del adyuvante con una composición de vacuna en paralelo con una composición de vacuna sola a animales y anticuerpos de comparación y/o inmunidad mediada celular en dos grupos utilizando ensayos estándares tales como radioinmunoensayo, ELISA, y ensayos CTL. Las construcciones de la invención pueden expresar uno o más polipéptidos adyuvantes.

Por "portador central" significa un portador en el cual un ácido nucleico hospedero (por ejemplo, ADN, ARN) se cubre con el fin de impartir un tamaño de partícula definido así como una densidad suficientemente alta para lograr el momento requerido para la penetración de membrana celular, de tal forma que la molécula hospedera se puede distribuir utilizando técnicas mediadas por partícula (por ejemplo, la patente de E. U. A. 5,100,792). Los portadores centrales típicamente incluyen materiales tales como tungsteno, oro, platino, ferrito, poliestireno y látex. Ver, por ejemplo, *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, (1994) Yang, N. ed., Oxford University Press, New Cork, NY págs. 10-11.

Por "jeringa sin aguja" significa un instrumento que distribuye una composición en partículas transdérmicamente sin la ayuda de la aguja convencional para perforar la piel. Las jeringas sin aguja para uso con la presente invención se explican aquí.

El término distribución "transdérmica" significa intradérmico (por ejemplo, en la dermis o epidermis) transdérmico (por ejemplo, "percutáneo") y administración transmucosa, es decir, distribución por medio del paso de un antígeno dentro o a través de la piel o tejido mucoso. Ver, por ejemplo, *Transdermal Drug Delivery: Developmental Issues and Research Initiatives,* Hadgraft and Guy (eds.), Marcel Dekker, Inc., (1989); *Controlled Drug Delivery: Fundamentals and Applications,* Robinson and Lee (eds.), Marcel Dekker Inc., (1987); y *Transdermal Delivery of Drugs*, Vols. 1-3, Kydonieus and Berner (eds.), CRC Press, (1987). De esta forma, el término abarca la distribución de una jeringa sin aguja como se describe en la patente de E. U. A. 5,630,796, así como la distribución mediada por partículas como se describe en la patente de E. U. A. No. 5,865,796.

Un "polipéptido" se utiliza en el sentido más amplio para referirse a un compuesto de dos o más aminoácidos de subunidad, análogos del aminoácido, u otros peptidomiméticos. Las subunidades pueden estar enlazadas a través de enlaces con péptidos o a través de otros enlaces, por ejemplo, éster, éter, etc. Como se utiliza aquí, el término "aminoácido" se refiere ya sea a aminoácidos naturales y/o no naturales o sintéticos, incluyendo glicina y ambos isómeros ópticos D o L, y análogos de aminoácidos y peptidomiméticos. Un péptido de tres o más aminoácidos es

comúnmente denominado un oligopéptido si la cadena de péptido es corta. Si la cadena de péptido es larga, el péptido es típicamente denominado un polipéptido o una proteína.

Un "antígeno" se refiere a cualquier agente, generalmente una macromolécula, que puede provocar una respuesta inmunológica en un individuo. El término se puede utilizar para referirse a una macromolécula individual o a una población homogénea o heterogénea de macromoléculas antigénicas. Como se utiliza aquí, "antígeno" generalmente se utiliza para referirse a una molécula de proteína o porción de la misma que contiene uno o más epítopos. Un "antígeno" puede comprender, por ejemplo, un polipéptido de existencia natural, un fragmento de dicho polipéptido que es inmunogénico o una forma variante de cualquiera que retiene la inmunogenicidad. En una instancia preferida, en donde se refiere un fragmento o una variante, la respuesta inmune generada puede preferiblemente ser capaz de reconocer el polipéptido adicional a partir del cual se deriva el fragmento o variante.

Para los propósitos de la presente invención, los antígenos se pueden obtener o derivar de cualquier fuente apropiada. Para el propósito de la presente invención, un "antígeno" incluye una proteína que tiene modificaciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (generalmente conservadoras en naturaleza) para la secuencia

nativa, mientras la proteína mantenga suficiente inmunogenicidad. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, por ejemplo a través de mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como a través de mutaciones de hospederos que producen los antígenos. En una modalidad particularmente preferida de la invención el antígeno utilizado o codificado puede ser un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico de un antígeno de influenza o una variante inmunogénica de ambos.

Una "respuesta inmune" contra un antígeno de interés es el desarrollo en un individuo de una respuesta inmune humoral y/o celular al antígeno. Para propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpo, mientras una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T y/o otras células de glóbulos blancos.

Los términos "molécula de ácido nucleico" y "polinucleótido" se utilizan intercambiablemente aquí y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos, o análogos de los mismos. Los polinucleótidos pueden tener cualquier estructura tridimensional y pueden llevar a cabo cualquier función, conocida o desconocida. Los ejemplos no limitantes de polinucleótidos incluyen un gen, un fragmento de gen, exones, intrones, ARN mensajero (ARNm), ARN de

transferencia, ARN ribosomal, ribosimas, ADNc, polinucleótidos recombinantes, polinucleótidos ramificados, plásmidos, vectores, ADN aislado de cualquier secuencia, ARN aislado de cualquier secuencia, sondas de ácidos nucleicos e cebadores.

Un polinucleótido típicamente está compuesto de una secuencia específica de cuatro bases de nucleótido: adenina (A); citosina (C); guanina (G); y timina (T) (uracil (U) para timina (T) cuando el polinucleótido es ARN). De esta forma, el término secuencia de ácido nucleico es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética se puede capturar en bases de datos en una computadora que tiene una unidad de procesamiento central y se utiliza para aplicaciones bioinformáticas tales como investigaciones genómicas funcionales y homología.

Un "vector" es capaz de transferir las secuencias de ácido nucleico a células objetivo (por ejemplo, vectores virales, vectores no virales, portadores particulados, y liposomas). Las células objetivo pueden ser procarióticas o eucarióticas. Típicamente, "una construcción de vector", "vector de expresión" y "vector de transferencia de", significan cualquier construcción de ácido nucleico capaz de dirigir la expresión de un gen de interés y que puede transferir secuencias de gen a células objetivo. De esta forma, el término incluye la clonación y los vehículos de

expresión, así como vectores virales. Un "plásmido" es un vector en la forma de un elemento genético extracromosómico.

Una secuencia de ácido nucleico que "codifica" un antígeno seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) en un polipéptido *in vitro* o *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia de codificación se determinan a través de un codón de inicio en el término 5' (amino) y un codón de detección de traducción en el término "carboxi 3'". Para los propósitos de la invención, tales secuencias de ácido nucleico pueden incluir, pero no se limitan a, ADNc de ARNm viral, procariótico o eucariótico, secuencias genómicas de ADN o ARN viral o procariótico, y aún secuencias de ADN sintéticas, una secuencia de terminación de trascripción se puede localizar en 3' para la secuencia de codificación.

En algunos casos una secuencia transcrita puede dar origen a múltiples polipéptidos, por ejemplo una trascripción puede contener múltiples marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) y también uno o más sitios de entrada de ribosoma interna (IRES, por sus siglas en inglés) para permitir la traducción de ORF después del primer ORF. Una trascripción se puede traducir para dar un polipéptido que subsiguientemente se divide para dar una pluralidad de polipéptidos. En algunos casos una construcción de ácido

nucleico puede dar origen a múltiples transcripciones y por lo tanto una pluralidad de polipéptidos.

Un "promotor" es una secuencia de nucleótido que inicia y regula la trascripción de un polinucleótido que codifica el polipéptido. Los promotores pueden incluir promotores inducibles (en donde la expresión de una secuencia de polinucleótido operablemente enlazada al promotor se induce a través de un analito, co-factor, proteína reguladora, etc.), promotores reprimibles (en donde la expresión de una secuencia de polinucleótido operablemente enlazada al promotor se reprime a través de un analito, co-factor, proteína reguladora, etc.), y promotores constitutivos. Se pretende que el término "promotor" o "elemento de control" incluya regiones promotoras de longitud completa y segmentos funcionales (por ejemplo, trascripción o a traducción de control) de estas regiones.

"Operablemente enlazado" se refiere a una configuración de elementos en donde los componentes así descritos se configuran para llevar a cabo su función usual. De esta forma, un promotor operablemente enlazado dado a una secuencia de aminoácido es capaz de efectuar la expresión de esa secuencia cuando las enzimas apropiadas están presentes. El promotor no necesita ser contiguo a la secuencia, mientras funcione para dirigir la expresión del mismo. De esta forma, por ejemplo, la intervención de secuencias transcritas pero

no traducidas pueden estar presentes entre la secuencia promotora y la secuencia de ácido nucleico, y la secuencia promotora aún puede considerarse "operablemente enlazada" a la secuencia de codificación.

"Recombinante" se utiliza aquí para describir una molécula de ácido nucleico (polinucleótido) de ADNc genómico, de origen semisintético o sintético, en virtud de este origen o manipulación no está asociado con toda una porción del polinucleótido con el cual está asociado por naturaleza y/o está enlazado a un polinucleótido diferente de aquel al cual está enlazado en naturaleza. Dos secuencias de ácido nucleico están contenidas dentro de una sola molécula de ácido nucleido recombinante son "heterólogas" con relación entre sí cuando no están anormalmente asociadas una con la otra en naturaleza.

Los homólogos de polinucleótidos son referidos en la presente. Típicamente un polinucleótido que es homólogo a otro polinucleótido es al menos 70% homólogo al polinucleótido, preferiblemente por lo menos 75, 80 o 90% y preferiblemente por lo menos el 95%, 97% o 99% homólogo al mismo. Los métodos para medir la homología son bien conocidos en la técnica, y serán entendidos por los expertos en la técnica que en el presente contexto, la homología se calcula en base de identidad de ácido nucleico. Dicha homología puede, por ejemplo, existir sobre una región de al menos 15,

preferiblemente al menos 30, por ejemplo por lo menos 40, 60 o 100 o más nucleótidos contiguos. La región de homología puede ser sobre al menos 150, preferiblemente por menos 200 y más preferiblemente sobre al menos 300 nucleótidos. La región de homología se puede relacionar con cualquiera de los elementos referidos en la presente con relación a las construcciones de ácido nucleico de la invención. En algunos casos, la región de homología puede ser sobre la región completa en cuestión, tal como por ejemplo, sobre la región completa de cualquiera de los elementos especificados aquí.

Los niveles de homología de aminoácido equivalentes a aquellos referidos en relación a la homología de nucleótido anterior pueden estar presentes. De esta forma, cualquiera de los niveles anteriormente mencionados de homología puede aplicarse al nivel de aminoácido. La homología en el nivel de aminoácido puede, por ejemplo, ser sobre al menos 15, preferiblemente al menos 25, preferiblemente sobre al menos 50%, aún más preferiblemente al menos 75 y más preferiblemente sobre al menos 100 aminoácidos. La región de homología puede ser sobre la longitud completa del elemento en cuestión.

Los métodos para medir la homología del polinucleótido o identidad son conocidos en la técnica. Por ejemplo el paquete UWGCG provee el programa BESTFIT que se puede utilizar para calcular la homología (por ejemplo,

utilizado con su configuración por omisión) (Devereux y otros (1984) *Nucleic Acids Research* 12, p387-395).

Los algoritmos PILEUP y BLAST también se pueden utilizar para calcular secuencias de la homología o las secuencias alineadas (típicamente con sus configuraciones por omisión), por ejemplo como se describe en Altschul S. F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S. F. y otros (1990) J Mol Biol 215:403-10.

El software para llevar a cabo el análisis BLAST está públicamente disponible a través del Centro Nacional para información de Biotecnología (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo involucra primero identificar el par se secuencias con alta puntuación (HSP) a través de la identificación de palabras cortas en longitud W en la secuencia de consulta que ya sea coincida o satisfaga la puntuación T del umbral valuado positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en la secuencia de la base de datos. T es referida como el umbral de puntuación de palabra contigua (Altschul y otros, *supra*). Estos aciertos de palabras contiguas iniciales actúan como fuentes para iniciar las búsquedas para encontrar HSP que los contiene. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia mientras la puntuación de la alineación acumulativa se puede incrementar. Las extensiones para los aciertos de palabra en cada

dirección se detienen cuando: la puntuación de alineación acumulativa va de cero hacia abajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuo de puntuación negativa; o cuando se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST utiliza por omisión una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación (B) de 50, de la matriz de puntuación BLOSUM 62 (ver Henikoff and Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89:10915-10919), la expectación (E) de 10, M=5, N=4, y una comparación de ambas cepas.

El algoritmo BLAST lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias; ver, por ejemplo, Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl, Acad. Sci.* USA 90:5873-5787. Una medida de la similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que provee una indicación de la probabilidad a través de la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótido o aminoácido podría ocurrir por casualidad. Por ejemplo, una secuencia se considera similar a otra secuencia si la probabilidad de la suma más pequeña en comparación con la primera secuencia de la segunda secuencia es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menor de aproximadamente 0.1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0.01, y más preferiblemente menor de 0.001.

La homología típicamente hibridiza con el polinucleótido relevante a un nivel significativamente arriba del fondo. El nivel de señal generado por la interacción entre el homólogo y el polinucleótido es típicamente de al menos 10 veces, preferiblemente al menos 100 veces, tan intenso como "hibridación de fondo". La intensidad de la interacción se puede medir, por ejemplo, radio marcando la sonda, por ejemplo, con ^{32}P. La hibridación selectiva típicamente se logra utilizando condiciones de medio de alta restricción, (por ejemplo, 0.03 M de cloruro de sodio y 0.003 M de citrato de sodio a aproximadamente 50°C a aproximadamente 60°C.

Las condiciones de hibridación estrictas pueden incluir 50% de formamida, 5 x de solución de Denhardt, 5x SSC, 0.1% de SDS y 100 µg/ml, de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y las condiciones de lavado pueden incluir 2x de SSC, 0.1% de SDS a 37°C seguido por 1x de SSC, 0.1% de SDS a 68°C. La definición apropiada de las condiciones de hibridación está dentro de la experiencia en la técnica. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*.

El homólogo puede diferir de una secuencia en el polinucleótido relevante a través de menos de 3, 5, 10, 15, 20 o más mutaciones (cada una de las cuales puede ser una sustitución, duplicación, eliminación o inserción). Estas mutaciones se pueden medir sobre una región de al menos 30,

por ejemplo al menos 40, 60 ó 100 o más nucleótidos contiguos del homólogo. En algunos casos las mutaciones se pueden medir sobre la región completa del homólogo. Cuando un polinucleótido codifica un polipéptido, las sustituciones preferiblemente crean cambios "conservadores" en el aminoácido codificado.

Estos se definen de acuerdo con la Tabla 1 siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna se pueden sustituir uno con el otro en cambios conservadores.

Tabla 1

ALIFATICO	No Polar	G A P
		I L V
	Polar no cargado	C S T M
		N Q
	Polar cargado	D E
		K R
AROMATICO		H F W Y

El término "fragmento" indica una parte más pequeña de una entidad más grande. Los fragmentos de elementos específicos referidos en la presente se pueden utilizar en la invención. En particular, dichos fragmentos retendrán alguna o toda la funcionalidad del elemento original y en particular cualquiera de las funciones mencionadas aquí.

En instancias preferidas un fragmento de un

antígeno puede retener la inmunogenicidad y un fragmento de un adyuvante la habilidad para actuar como un adyuvante. En algunas instancias, un fragmento puede ser al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, más de preferencia al menos 90% y aún más preferiblemente al menos 95% de longitud del original. Un fragmento puede ser igual a o menos que dichos porcentajes de la longitud del original.

Los términos "individual" y "sujeto" se utilizan de manera intercambiable en la presente para referirse a cualquier miembro del suborden de la corbata, incluyendo, sin limitación, humanos y otros primates, incluyendo primates no humanos tales como chimpancés y otros monos y especies de changos; animales de granja tales como ganado, carneros, puercos, cabras y caballos; mamíferos domésticos tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores tales como ratones, ratas y conejillos de indias así como puercos; pájaros, incluyendo domésticos, salvajes y aves de casa tales como pollos, gallos y otros pájaros gallináceos, patos, gansos y similares. El término no denota ninguna edad particular, de esta forma, tanto individuos adultos como recién nacidos pretenden estar cubiertos. Los métodos descritos en la presente son previstos para el uso en cualquiera de las especies de vertebrados anteriores, ya que los sistemas inmunes de todos estos vertebrados operan

similarmente.

En algunas instancias, la invención se puede utilizar para inmunizar cualquier sujeto adecuado y en particular cualquier sujeto adecuado de una especie dada. En una instancia particular, cualquier sujeto humano adecuado puede inmunizarse. De esta forma, se puede inmunizar tanto sujetos como sea posible, por ejemplo, se pueden inmunizar sin énfasis sobre cualquier de sujetos grupo particular. Por ejemplo, una población de sujetos como un todo, o tantos como sea posible, se puede inmunizar. En particular, cuando la invención se está utilizando para tratar influenza, y especialmente para inmunizar contra una cepa pandémica de influenza, las construcciones de la invención se pueden utilizar para inmunizar cualquier sujeto y preferiblemente a tantos sujetos como sea posible.

En otros casos, el sujeto o individuo puede ser uno con riesgo de infección o para el cual la infección podría se particularmente perjudicial. La infección puede, en una instancia preferida, ser una infección respiratoria. En particular, cuando la invención se está utilizando para prevenir o para tratar una infección respiratoria y en particular contra influenza, el sujeto puede ser un ser humano. En algunos casos, las construcciones de ácido nucleico de la invención se pueden administrar con preferencia, primero, a grupos de riesgo particular. Éste

puede, por ejemplo, ser el caso de administración de construcciones para inmunizar contra las cepas no pandémicas de influenza. En algunos casos los sujetos pueden, por ejemplo, caer en una o más de las siguientes categorías:

- un sujeto con un trastorno respiratorio y/o problemas cardíacos y en particular que tiene asma, enfisema, bronquitis y/o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, por sus siglas en inglés);

- un sujeto con una condición médica crónica tal como diabetes, supresión inmune, deficiencia inmune, enfermedad de la célula de hoz y/o enfermedad de riñón;

- un sujeto con edad de hasta por lo menos 50 años, preferiblemente de al menos 60 años, más preferiblemente al menos 65 años, aún más preferiblemente al menos 75 años de edad y aún más preferiblemente de al menos 80 años de edad;

- un niño en edad de 2 años o menos, en particular de 6 a 23 meses, por ejemplo 18 meses o menos;

- un sujeto en terapia de aspirina crónica y en particular en la edad de 6 meses a 18 años;

- una mujer embarazada y en particular una que estará en su segundo o tercer trimestre de embarazo durante la etapa de la influenza;

- un residente de una residencia de ancianos o instalación de cuidado a largo plazo; y/o

- un trabajador de cuidados para cualquiera de los anteriores que probablemente caerá en contacto regular con ellos

B. **Introducción General**

La invención se refiere a construcciones de ácido nucleico que permiten la expresión eficiente de secuencias de codificación heterólogas, y en particular genes que codifican el antígeno, en células hospederas. Las construcciones pueden, en algunos casos, expresar uno o más polipéptidos adyuvantes. Más específicamente, la invención provee construcciones de ácido nucleico que comprenden, o en algunas modalidades, que consisten esencialmente de una secuencia promotora quimérica y un sitio de clonación, tal como cuando una secuencia de codificación se inserta en el sitio de clonación, la secuencia de codificación está operablemente enlazada al promotor quimérico. La invención también provee construcciones con secuencias de codificación insertadas en el sitio o sitios de clonación. Las secuencias de codificación pueden codificar cualquiera de los polipéptidos referidos en la presente y en particular un antígeno y especialmente cualquiera de los antígenos y polipéptidos adyuvantes mencionados aquí.

En una modalidad especialmente preferida las construcciones comprenden una secuencia de codificación y en particular una secuencia de codificación que codifica un

antígeno, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos. En una modalidad especialmente preferida las secuencias de codificación codifican un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico de la misma o una variante inmunogénica de ambos. En una modalidad referida adicional la secuencia de codificación puede codificar un polipéptido adyuvante y en particular una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con actividad adyuvante o una variante de cualquiera con actividad adyuvante.

El promotor quimérico comprende, o en algunas modalidades consiste esencialmente de:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV.

La secuencia promotora temprana inmediata hCMV (a) puede comprender:

(i) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV nativa;

(ii) una variante homóloga funcional de la misma; o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

En la secuencia general (a) comprende aproximadamente 100 a 600, preferiblemente 200 a 600, por ejemplo 400 a 600 nucleótidos. La secuencia típicamente (a) comprende las secuencias presentes en (i) que enlazan factores de trascripción o polimerasa de ARN, o en lugar de cualquiera de estas secuencias, homólogos de estas secuencias capaces de unirse a los mismos factores de trascripción y polimerasa de ARN. Típicamente dichas secuencias o sus homólogos están presentes en la secuencia promotora (a) en el mismo orden y/o substancialmente la misma separación relativa como en (i).

Generalmente, (i) comprende al menos de los nucleótidos -100 a -1, típicamente -150 a -1, por ejemplo -500 a -1 ó -600 a -1 del gen temprano inmediato principal hCMV. La secuencia (i) típicamente comprende la secuencia promotora central hCMV y también puede incluir uno o más elementos potenciadores presentes en el promotor temprano inmediato hCMV. Por ejemplo, (i) puede comprender de los nucleótidos -118 a -1, ó -524 a -1 como en US 6218140, o de los nucleótidos -62 a 1 ó -465 a -1 como en US 538 5839.

Generalmente (i) incluye una caja TATA o una caja CAAT comúnmente encontrada en las secuencias promotoras. Preferiblemente la secuencia incluye una o más de las secuencias de repetición en el promotor temprano inmediato

hCMV.

En una modalidad preferida, (i) comprende el SEC ID NO: 1. En una modalidad preferida adicional, (i) comprende los nucleótidos 903 a 1587 de SEC ID NO: 54. En otra modalidad (i) puede comprender los nucleótidos 903 a 1587 de SEC ID NO: 14. En una modalidad preferida adicional (i) puede comprender los nucleótidos 1002 a 1686 ó 2624 a 3308 de SEC ID No. 57. En una modalidad preferida más (i) puede comprender los nucleótidos 1815 a 1935 y/o 1948 a 2632 de SEC ID No. 61 y en particular los nucleótidos 1948 a 2632 de SEC ID No.61. En otra modalidad preferida los nucleótidos 1815 a 1935 se pueden utilizar.

En una modalidad particularmente preferida de la invención la secuencia promotora temprana inmediata hCMV (a) comprende:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID No. 1, nucleótidos 903 a 1587 de SEC ID No. 54, los nucleótidos 1815 a 1935 de SEC ID NO.: 61, los nucleótidos 1948 a 2632 de SEC ID NO. 61, los nucleótidos 1002 a 1686 de SEC ID NO. 62 y/o los nucleótidos 2624 a 3308 de SEC ID NO: 62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido una o más de las secuencias de (i); y/o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

En algunas instancias, un fragmento puede

comprender por lo menos 300 nucleótidos, preferiblemente por lo menos 400 nucleótidos, más preferiblemente por lo menos 500 nucleótidos y aún más preferiblemente por lo menos 600 nucleótidos en cada secuencia. El fragmento puede comprender hasta 800, hasta 600 o hasta 400 nucleótidos.

Una secuencia promotora temprana inmediata hCMV puede obtenerse utilizando métodos conocidos. Un promotor temprano inmediato hCMV nativo se puede aislar directamente de una muestra del virus, usando técnicas estándares. US 5385839, por ejemplo, describe la clonación de una región promotora hCMV. La secuencia del promotor temprano inmediato hCMV está disponible en Genbank #M60321 (hCMV cepa Towne) y X17403 (cepa hCMV Ad169). Una secuencia nativa podría por consiguiente aislarse a través de PCR utilizando cebadores PCR con base en la secuencia conocida. Ver, por ejemplo Sambrook y otros, *supra*, para una descripción de las técnicas utilizadas para obtener y aislar ADN. Una secuencia promotora hCMV adecuada también podría aislarse de un vector de plásmido existente. Las secuencias promotoras también se pueden producir sintéticamente.

Una variante funcional (ii) o fragmento (iii) es generalmente una que retiene y/o complementa la actividad del promotor nativo (i). Típicamente esta actividad es la habilidad para causar (incluyendo la iniciación y regulación) de la transcripción de un polinucleótido operablemente

enlazado, en particular el gen temprano inmediato principal hCMV. En una modalidad, la variante o fragmento podría ser capaz de complementar la actividad del promotor nativo en un virus hCMV, por ejemplo permitiendo que el virus detenga la habilidad de infectar y/o replicarse en las células.

Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) se puede ensayar para la habilidad para retener y/o complementar la actividad de (i). Por ejemplo, una variante o fragmento se puede ensayar para la habilidad para restaurar la funcionalidad (tal como la habilidad de infección y/o replicación) para el mutante hCMV en donde el promotor temprano inmediato hCMV nativo está defectuoso.

Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) se puede probar para utilidad utilizando el ensayo de expresión comparativo siguiente. La secuencia promotora de prueba se intercambia en el vector base en lugar del promotor temprano inmediato hCMV nativo. Típicamente, una variante funcional o fragmento permite por lo menos 50%, por ejemplo, 60, 70, 80, 90% o más de la expresión provista utilizando el vector base. Una variante o fragmento funcional puede proveer cualquiera de los niveles de expresión referidos aquí. En algunos casos, la variante o fragmento puede se provisto a un nivel más alto de expresión tal como al menos 50%, 100%, 150%, 200%, 300% o más incremento en actividad. Generalmente, la expresión es provista en por lo menos uno, pero preferiblemente dos, tipos

de células de referencia. Típicamente, las células de referencia son células HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamíferos. Las células de referencia pueden ser células hospederas SSC-15 o B16 en algunos casos.

Adicional o alternativamente, la secuencia promotora puede probarse en el ensayo de inmunogenicidad comparativo siguiente. La secuencia promotora de prueba se intercambia en el vector base en lugar del promotor temprano inmediato hCMV nativo. Una secuencia promotora funcional típicamente provee concentraciones de anticuerpo que al menos tan altas como o mayores que aquellas logradas por el vector base con al menos uno, preferiblemente dos antígenos. Las concentraciones de anticuerpo preferibles son de al menos 5%, 10%, 20%, 30% o 40% mayores que las del vector base. En algunos casos, el nivel de las concentraciones de antígeno puede ser cualquiera de las referidas aquí. Los antígenos adecuados son antígenos HBsAg, HSV 2gD y flu-M2. Los antígenos particularmente preferidos son los antígenos de influenza. Los antígenos de influenza incluyen los antígenos HA, NA, M2, NP, M1, PB1, PB2, PA, NS1 y NS2 y en particular los antígenos HA, NA y M2. En una modalidad especialmente preferida el antígeno HA o un fragmento del mismo o una variante de cualquiera. De acuerdo con los ensayos, una variante homóloga funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de la secuencia promotora nativa (i) es típicamente una que

permite las concentraciones de anticuerpo más altas logradas por la secuencia nativa. En algunos casos, la concentración del anticuerpo puede ser ligeramente inferior incluyendo cualquiera de los niveles mencionados aquí.

En instancias en donde una construcción de la invención codifica un polipéptido adyuvante, la prueba de inmunogenicidad comparativa se puede utilizar con un antígeno estándar y comparando un vector de prueba que codifica un polipéptido de actividad adyuvante conocida con un vector adyuvante estándar. Por ejemplo, un vector adyuvante de prueba puede codificar un fragmento o variante de un polipéptido adyuvante conocido y puede compararse contra un vector estándar que expresa el polipéptido adyuvante conocido en su habilidad para promover una respuesta inmune cuando se administra con un antígeno. Un fragmento o variante puede tener cualquiera de los niveles de actividad mencionados aquí y en particular proveerá al menos 50%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 85% y aún más preferiblemente al menos 100% de la actividad del adyuvante del adyuvante estándar. Preferiblemente, el vector de prueba y el vector estándar serán idénticos, o al menos substancialmente idénticos, aparte de las secuencias que codifican el adyuvante/polipéptido bajo prueba.

Como se mencionó anteriormente, la construcción puede comprender la secuencia de exón (b) que comprende la

secuencia derivada del exón 1 y del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV. Los exones son secuencias de codificación, que en naturaleza están generalmente separadas por intrones. En el gen temprano inmediato principal hCMV nativo, los exones 1 y 2 están usualmente separados por el intrón A nativo. En la presente construcción quimérica la secuencia del exón 2 está generalmente colocada en 3' de la secuencia del exón 1, sin intervenir en la secuencia del intrón, de tal forma que las secuencias del exón 1 y el exón 2 están contiguas.

La secuencia de exón (b) puede comprender:

(i) la secuencia de exón nativa, típicamente el exón 1 y (completo o parcial) el exón 2;

(ii) una variante homóloga de (i) que es funcional; o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia (i) puede comprender de aproximadamente 50 a 100% de la secuencia del exón 1 del gen temprano inmediato principal hCMV, por ejemplo, de 60 a 90% ó 70 a 80%. Típicamente al menos 50% de la secuencia del exón 1 natural está presente, tal como 60%, 70%, 80%, 90% o más. La secuencia de exón (b) también comprende por lo menos una parte de la secuencia del exón 2. En la secuencia (i), típicamente 2 o más bases del exón 2 nativo, por ejemplo 2 a 9, 2 a 7 ó 3 a 5 bases están presentes. Hasta e incluyendo el

100% de la secuencia del exón 2 natural, por ejemplo 5 a 95%, 20 a 80% ó 40 a 60% de la secuencia del exón 2 natural pueden estar presentes. Típicamente, la variante homóloga tiene cualquiera de las longitudes anteriormente mencionadas para la secuencia nativa.

Preferiblemente (i) comprende el SEC ID No. 2. En una modalidad preferida adicional (i) comprende los nucleótidos 1588 a 1718 de SEC ID NO. 54. En una modalidad preferida adicional (i) comprende los nucleótidos 1588 a 1718 de SEC ID No. 14. En otra instancia preferida (i) comprende los nucleótidos 1684 a 1814 y/o 2633 a 2763 de SEC ID No. 51. En una modalidad preferida más, (i) puede comprender los nucleótidos 1687 a 1817 y/o 3309 a 3439 de SEC ID NO: SEC ID No.62.

De esta forma, en modalidades particularmente preferidas la secuencia de exón (b) del promotor quimérico comprende:

(i) la secuencia de nucleótidos de SEC ID No.2, la secuencia de nucleótido de los nucleótidos 1588 a 1718 de SEC ID No. 54, los nucleótidos 1684 a 1814 de SEC ID NO: 61, los nucleótidos 2633 a 2763 de SEC ID NO: 61, los nucleótidos 1687 a 1817 de SEC ID No: 62 y/o los nucleótidos 3309 a 3439 de SEC ID No: 62;

(ii) la variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido a una o más

de las secuencias de (i); y/o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia de exón adecuada (b) se puede obtener utilizando métodos conocidos. Ver, por ejemplo, Sambrook y otros, *supra*, para una descripción de las técnicas utilizadas para obtener y aislar ADN. La secuencia del gen temprano o principal hCMV nativo se puede aislar directamente de una muestra de virus, utilizando técnicas estándar (ver, por ejemplo, MacLean, A (1998) "Preparation of HSV-DNA and Production of Infectious Virus" in Herpes Simplex Virus Protocols S. Brown, A Maclean, editors, Humana Press, Totowa, NJ, pp.19-26). La secuencia de un gen temprano inmediato principal hCMV, incluyendo la ubicación del exón 1 y el exón 2, está disponible en Genbank #M60321, X17403. Las secuencias del exón 1 y 2 nativas podrían por consiguiente aislarse cortando la secuencia del gen principal nativo en los sitios de restricción apropiados a través de PCR utilizando cebadores de PCR con base en las secuencias conocidas. Las secuencias de exón adecuadas podrían alternativamente aislarse de un vector de plásmido existente, tal como pWRG7128. Las secuencias de exón también se pueden producir sintéticamente, en lugar de clonarse. Las secuencias variantes pueden fácilmente construirse a través de metodologías de rutina tal como mutagénesis dirigida al sitio.

220

Generalmente la secuencia de exón, cuando está presente en la construcción de la invención, mejora la expresión, típicamente causando una mejora comparable con la secuencia del exón 1 y 2 nativa (i) mencionadas anteriormente.

La secuencia de exón puede ensayarse para funcionalidad utilizando el ensayo de expresión comparativo siguiente. La secuencia de exón de prueba se intercambia en el vector base en lugar de la secuencia de exón ya presente. Generalmente la secuencia de exón es funcional si la secuencia no anula la expresión, pero preferiblemente incrementa la expresión en al menos una, preferiblemente dos tipos de célula de referencia cuando se compara con el vector base. Típicamente, las células de referencia son células HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o Cos de mamífero. Se pueden utilizar las células SSC15 o B16. Preferiblemente, la expresión se incrementa al menos 5%, 10%, 20%, 30% ó 40%. La expresión se puede incrementar a través de cualquiera de los niveles mencionados aquí. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de la secuencia de exón natural (i) es una que típicamente permite por lo menos 50% de mejora de expresión provista por la secuencia natural. En algunos casos, cuando el nivel de expresión es inferior que aquel dado por el nivel base, la disminución puede ser cualquiera de los niveles mencionados

aquí.

Adicional o alternativamente, la secuencia de exón se puede probar en el ensayo de inmunogenicidad comparativo siguiente. La secuencia de exón de prueba se intercambia en el vector basa en lugar de la secuencia de exón ya presente. La secuencia de exón funcional provee concentraciones de anticuerpo que son típicamente al menos tan altas o más altas que aquellas logradas por el vector base con al menos uno, preferiblemente dos antígenos. Las concentraciones de anticuerpo preferiblemente son de al menos 5%, 10%, 20%, 30% ó 40% mayores que con el vector base. El incremento puede ser cualquiera de los niveles mencionados aquí. Los antígenos preferidos son los antígenos HBsAg, HSV 2gD y flu-M2. Los antígenos especialmente preferidos son antígenos de influenza, incluyendo cualquiera de los mencionados aquí y en particular los antígenos HA, NA y M2. El uso del antígeno HA, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos es especialmente preferido. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de la secuencia de exón natural (i) es una que típicamente permite concentraciones de anticuerpo más altas logradas por la secuencia natural. En casos en donde el nivel de la concentración del anticuerpo es ligeramente inferior, la disminución puede ser cualquiera de los niveles mencionados aquí. Los vectores adyuvantes pueden

evaluarse en una forma equivalente como se explicó anteriormente.

La construcción promotora quimérica comprende el intrón heterólogo (c) en lugar de la región de intrón A nativa del gen temprano inmediato principal hCMV. Un intrón es una secuencia de no-codificación que se divide del ARNhn transcrito de un gen. Un intrón heterólogo es uno que no está presente en la secuencia de codificación por naturaleza.

El intrón heterólogo (c) reemplaza completa o parcialmente, al intrón A nativo del gen temprano inmediato principal hCMV. Típicamente, el intrón nativo A está ausente.

En general el intrón heterólogo (c) es 3' de la secuencia del exón (b).

Típicamente el intrón heterólogo (c) comprende:

(i) un intrón natural;

(ii) una variante homóloga funcional de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

El intrón heterólogo (c) es en general un intrón viral o eucariótico. Preferiblemente el intrón es un intrón de mamífero, en particular un intrón no humano, por ejemplo se puede utilizar un intrón de rata. En algunos casos, se puede emplear un intrón de pollo. Preferiblemente el intrón es un intrón A, por ejemplo, el intrón A de insulina de rata, el intrón A de queratina de pollo, o el intrón A de actinia cardiaca de pollo. En una modalidad especialmente preferida

el intrón es el intrón A de insulina de rata.

En una modalidad preferida el intrón heterólogo (c) comprende una secuencia seleccionada de la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata, la secuencia del intrón A del gen de queratina de pollo, la secuencia del intrón A del gen de actina cardiaca de pollo, un fragmento funcional de cualquiera de estos o una variante funcional de cualquiera de los anteriores.

Típicamente el intrón (c) tiene una longitud de aproximadamente 50 nucleótidos a aproximadamente 1000 nucleótidos, por ejemplo de aproximadamente 100 a aproximadamente 500 nucleótidos. El intrón (c) puede por ejemplo, comprender de 50 a 500 nucleótidos, tal como hasta 100, 200, 300 ó 400 nucleótidos. Preferiblemente el intrón comprende la secuencia encontrada en aproximadamente los nucleótidos 50 a 133 del intrón A de insulina de rata nativo, o un homólogo de esta secuencia.

Preferiblemente el intrón heterólogo (c) es capaz dividirse de una trascripción de ARN en una célula hospedera eucariótica. En general el intrón comprende uno o más de una secuencia donadora (tal como GT), una secuencia aceptora (tal como AG), una región rica en pirimidina 3' y una región de punto de ramificación. La región rica y de pirimidina, si está presente, puede incluir, por ejemplo, al menos 5, 8, 10 o más pirimidinas. Preferiblemente, el intrón comprende por

lo menos una secuencia donadora, una secuencia aceptora, y una secuencia de punto de ramificación.

Típicamente en la construcción quimérica, el intrón (c) comprende secuencias de flanqueo no de intrón que se derivan de las secuencias de exón encontradas en los límites del intrón/exón del intrón natural (i). La secuencia del exón de flanqueo puede ser una secuencia de exón nativa o un homólogo de esta secuencia que retiene substancialmente la misma actividad que la secuencia nativa, por ejemplo, retiene la función de empalme. Típicamente de 5 a 10, preferiblemente de 7 a 10 bases de secuencia de exón se incluyen en cada extremo del intrón.

El intrón (c) puede ser un intrón artificial, siempre que intrón sea funcional. Por ejemplo, un intrón recombinante o quimérico se puede utilizar dicho intrón puede comprender la secuencia de más de un intrón natural.

Típicamente el intrón (c) comprende secuencias presentes en el intrón A hCMV que unen factores de trascripción o proteínas reguladoras o en lugar de cualquiera de estas secuencias, homólogos de estas secuencias capaces de unirse a los mismos factores o proteínas. Típicamente dichas secuencias o sus homólogos están presentes en el intrón (c) en el misma orden y/o substancialmente la misma separación relativa como en el intrón A hCMV.

El intrón (c) puede comprender una variante

homóloga (ii) en donde la secuencia del intrón natural (i) ha sido modificada para remover un sitio de restricción interno. Por ejemplo, una variante homóloga del intrón A de insulina de rata se puede utilizar en donde se ha destruido el sitio *Nhel* interno.

Preferiblemente, el intrón (c) comprende:

(i) SEC ID No.3;

(ii) una variante homóloga funcional de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

En una instancia preferida adicional, (i) puede comprender los nucleótidos 1725 a 1857 de SEC ID NO: 54 o los mismos nucleótidos de SEC ID No. 14. En una modalidad preferida adicional (i) puede comprender los nucleótidos 1545 a 1677 y/o 2770 a 2902 de SEC ID NO: 61. En otra modalidad preferida, (i) puede comprender los nucleótidos 1824 a 1956 y/o 3446 a 3578 de SEC ID NO: 62.

En una modalidad preferida, la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata comprende:

(i) la secuencia de nucleótidos de SEC ID No. 3, la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1725 a 1857 de SEC ID No.54, los nucleótidos 1545 a 1677 de SEC ID NO: 61, los nucleótidos 2770 a 2902 de SEC ID NO: 61, los nucleótidos 1824 a 1956 de SEC ID NO: 62 y/o los nucleótidos 3446 a 3578 de SEC ID NO: 62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene

al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido a uno o más de las secuencias de (i); y/o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

La secuencia de intrón (c) se puede obtener utilizando técnicas de clonación estándar. Por ejemplo, la secuencia del intrón A de insulina de rata está disponible en GenBank J00748, la secuencia del intrón A de queratina de pollo en GenBank J00847, y la secuencia del intrón A cardiaca de pollo en GenBank X02212. La secuencia de intrón se puede aislar de fuentes naturales utilizando cebadores basados en la secuencia conocida. La secuencia se puede preparar sintéticamente. Las secuencias variantes se pueden obtener a través de mutagénesis.

Típicamente una secuencia de intrón funcional, por ejemplo, una variante funcional (ii) o un fragmento funcional (iii) es una que tiene substancialmente la misma actividad que, y/o complementa la actividad de un intrón natural (i). En una modalidad la actividad es la actividad de empalme.

Las secuencias de intrón (c) se pueden probar para la actividad de empalme utilizando un ensayo de empalme de rutina. En general un homólogo funcional (ii) o fragmento funcional (iii) mostrará al menos 50%, por ejemplo, 60%, 70%, 80%, 90% y hasta 100% o más de la eficiencia de empalme del intrón natural (i) en el ensayo.

En general la secuencia de intrón heteróloga,

cuando está presente en la construcción de la invención, mejorará la expresión. Típicamente, un intrón de variante (ii) o fragmento (iii) causará una mejora comparable con el intrón natural (i). En algunos casos, se podría ver una disminución en la expresión incluyendo cualquiera de los niveles mencionados aquí.

La funcionalidad de la secuencia del intrón potencial (c) se puede probar utilizando el ensayo de expresión comparativo siguiente. El intrón heterólogo se intercambia en el vector base. Generalmente, la secuencia del intrón heteróloga es funcional si la adición de la secuencia incrementa la expresión en al menos uno, preferiblemente dos tipos de células de referencia en 25% o más, comparado con el vector base. Típicamente las células de referencia son células HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamíferos. Las células SSC15 o B16 se pueden utilizar. El incremento en la expresión puede ser de al menos 35%, 45%, 55% o más. El incremento puede ser cualquiera de los niveles mencionados aquí. De acuerdo con este ensayo, una variante funcional (i) o fragmento funcional (ii) de la secuencia de intrón natural (i) es típicamente una que permite más del 50% de la mejora de expresión lograda por la secuencia natural. En los casos en donde la disminución en la expresión se ve en la disminución puede, por ejemplo, ser cualquiera de los niveles mencionados aquí.

Una secuencia de intrón heteróloga (c) puede, por ejemplo adicional o alternativamente probarse para funcionalidad utilizando el ensayo de inmunogenicidad comparativo siguiente. La secuencia de intrón (c) se agrega al vector base. Una secuencia de intrón funcional (c) provee concentraciones de anticuerpo que son mayores que aquellas logradas por el vector base con al menos uno, preferiblemente dos antígenos. Preferiblemente, las concentraciones de anticuerpo son al menos 5 o 10%, por ejemplo 20%, 30% ó 40% mayores que con el vector base. Los antígenos preferidos son los antígenos HBsAg, HSV2gD y Flu-M2. Los antígenos especialmente preferidos son los antígenos de influenza, incluyendo cualquiera de aquellos mencionados aquí y en particular los antígenos HA, NA y M2. En particular, el antígeno de HA, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos se puede utilizar. De acuerdo con este ensayo, una variante funcional (ii) o fragmento funcional (iii) de una secuencia de intrón natural (i) típicamente es una que permite que se logren concentraciones de anticuerpo más altas a través de la secuencia natural. En algunos casos una disminución podría verse, los niveles pueden, por ejemplo, ser cualquiera de los mencionados aquí. Los vectores adyuvantes se pueden evaluar en una forma como se explicó en cualquier lugar aquí.

La secuencia de intrón heteróloga adecuada se puede

obtener utilizando técnicas de clonación estándar. Por ejemplo, la secuencia del intrón A de insulina de rata está disponible en GenBank J00748, el intrón A de queratina de pollo en GenBank J00847, y el intrón A de actinia cardiaca de pollo en X02212. La secuencia de intrón se puede aislar de fuentes nativas utilizando cebadores basados en los datos de secuencia conocidos. La secuencia adecuada también se puede preparar sintéticamente.

Las secuencias de componente (a), (b) y (c) se pueden proveer adecuadamente enlazadas para formar un promotor quimérico utilizando clonación estándar o técnicas de biología molecular. Preferiblemente, la secuencia de intrón (c) es provista en 3' de la secuencia de exón (b). La construcción del promotor quimérico está enlazada a un sitio de clonación, en tal forma que el promotor efectuará la expresión de la secuencia de codificación insertada en el sitio, cuando están presentes las enzimas apropiadas. Los sitios de clonación adecuados, incluyendo sitios de multi-clonación son conocidos en la técnica, por ejemplo los sitios de multiclonación pUC19, pBC SK, pBluescript II KS, cDNA3.1, pSP72, pGEM 7Z. Cualquier sitio de restricción adecuado puede, por ejemplo, utilizarse como un sitio de clonación para insertar las secuencias de codificación.

En una modalidad preferida, el promotor quimérico empleado comprende:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID No. 4 o la secuencia de nucleótido de los nucleótidos 903 a 1857 de SEC ID No. 54;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido a (i); y/o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

En una modalidad preferida adicional, el promotor quimérico utilizado puede ser uno que comprende la secuencia de SEC ID NO: 14.

Típicamente, un ácido nucleico para inserción (o insertado) en el sitio de clonación codifica un polipéptido terapéuticamente relevante. Se prefiere que la secuencia de codificación sea adecuada para uso en la inmunización de ácido nucleico o terapia de gen. El inserto de ácido nucleico puede de esta forma comprender una secuencia capaz de proveer inmunidad, por ejemplo una secuencia inmunogénica que provoca una respuesta inmune humoral y/o celular cuando se distribuye a un sujeto. Alternativamente, el ácido nucleico puede comprender unos o más genes que codifican un polipéptido terapéutico, por ejemplo, una proteína defectuosa o carente de un genoma celular objetivo o una proteína no nativa que tiene un efecto biológico o terapéutico deseado (por ejemplo, una función antiviral). La construcción puede codificar un polipéptido adyuvante. Para el tratamiento de trastornos

genéticos, los genes funcionales correspondientes a los genes conocidos como siendo deficientes en un trastorno particular se pueden administrar a un sujeto. Preferiblemente, el ácido nucleico es ADN. El ácido nucleico puede en algunos casos ser ARN o HAP.

En algunos casos un ARN no de codificación se puede expresar a través de una construcción de la invención. De esta forma el vector puede haber sido insertado en el sitio de clonación en una región que pueda dar origen al ARN, por ejemplo un ARN anti-sentido o ARNSi. El ARN anti-sentido o ARNSi puede, por ejemplo, inhibir la expresión de cualquiera de los genes mencionados aquí, o un gen de cualquiera de los patógenos mencionados aquí. Sin embargo, en la modalidad más preferida, se codifica un polipéptido.

Los ácidos nucleicos adecuados para inserción incluyen aquellos utilizados para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, autoinmunes, enfermedades crónicas e infecciosas, incluyendo trastornos tales como SIDA, cáncer, enfermedades neurológicas, enfermedades cardiovasculares, hipercolestemia; varios trastornos sanguíneos incluyendo varias anemias, talasemia o hemofilia; defectos genéticos tales como fibrosis cística, enfermedad de Gaucher, deficiencia de aminasa de adenosina (ADA, por sus siglas en inglés), enfisema, etc.

Las construcciones en la invención se pueden

utilizar para tratar o prevenir una condición. Las construcciones se pueden utilizar para mejorar una condición y/o eliminar o reducir un síntoma particular, o todos, de un trastorno. En una instancia preferida particularmente las construcciones se pueden utilizar para vacunar a un sujeto contra un patógeno.

Por ejemplo, en los métodos para el tratamiento de tumores sólidos, los genes que codifican péptidos tóxicos (es decir, agentes quimioterapéuticos tales como ricina, toxina de difteria y el factor de venoma de cobra), genes supresores de tumor tales como p53, genes que codifican secuencias de ARNm que son anti-sentido para los oncogenes de transformación, péptidos antineoplásticos tales como el factor de necrosis de tumor (TNF, por sus siglas en inglés) y otras citocinas, o mutantes negativos transdominantes de oncogenes de transformación, se pueden insertar para la expresión en o cerca del sitio de tumor.

En una modalidad preferida una construcción de la invención puede codificar un polipéptido para tratar o prevenir un cáncer. En una modalidad particularmente preferida una construcción de la invención puede codificar un antígeno de tumor. Ejemplos de antígenos asociados con tumor incluyen, pero no se limitan a, antígenos de cáncer en los testículos tales como los miembros de la familia MAGE (MAGE 1, 2, 3 etc.), NY-ESO-1 y SSX-2, diferenciación de antígenos

tales como tirosinasa, gpl00, PSA, Her-2 y CEA, antígenos automutados y antígenos de tumor viral tales como E6 y/o E7 de los tipos HPV oncogénicos. Los ejemplos adicionales de antígenos de tumor particulares incluyen MART-1, Melan-A, p97, beta-HCG, GaINAc, MAGE-1, MAGE-2, MAGE-4, MAGE-12, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC18, CEA, DDC, P1A, EpCam, el antígeno de melanoma gp75, Hker 8, antígeno de melanoma de alto peso molecular, K19, Tyrl, Tyr2, miembros de la familia del gen 17 pMel, c-Met, PSM (antígeno de mucina de próstata), PSMA (antígeno de membrana específica de próstata), proteína que secreta la próstata, alfa-fetoproteína, antígeno CA125, CA19.9, TAG-72, BRCA-1 y el antígeno BRCA-2.

Los ejemplos de cánceres particulares que el antígeno puede derivar incluyen aquellos de cánceres de pulmón, próstata, pecho, colon, ovario, testículos, intestino, melanoma, un linfoma y una leucemia. Las construcciones de la invención también se pueden utilizar para tratar o prevenir tales cánceres.

Similarmente, los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos conocidos para desplegar actividad antiviral y/o antibacteriana, o estimular el sistema inmune del hospedero, también se pueden incluir. El ácido nucleico puede codificar una de las varias citocinas (o fragmentos funcionales de la misma), tales como interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonia.

En una instancia preferida, las secuencias de codificación pueden codificar un antígeno, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos. El antígeno puede ser en particular un antígeno de patógeno viral, bacterial, de parásito o fúngico o un antígeno de tumor. En una instancia preferida, el antígeno es antígeno viral, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos.

El ácido nucleico puede codificar un antígeno para el tratamiento o prevención de un número de condiciones que incluyen pero no se limitan a cáncer, alergias, toxicidad e infección a través de un patógeno tal como pero no limitándose a, hongo, virus incluyendo el virus de papiloma humanos (HPV, por sus siglas en inglés), VIH, HSV2/HSV1, virus de influenza (tipo A, B y C), virus del polio, virus RSV, Rinovirus, Rotavirus, virus de hepatitis A, el grupo de virus Norwalk, enterovirus, Astrovirus, virus de sarampión, virus de para-influenza, virus de paperas, virus de Varicela Zoster, Citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de rubéola, virus del tipo I de linfoma de célula T humana, (HTLV-I), virus de hepatitis B (HBV), virus de hepatitis C (HCV), virus de hepatitis D, virus de viruela, Marburg y Ebola; bacterias incluyendo *M. tuberculosis, Chlamydia, N. gonorrhoeae, Shigella, Salmonella, Vibrio Cholera, Treponema pallidua, Pseudomonas, Bordetella*

pertussis, Brucella, Franciscella tulorensis, Helicobacter pylori, Leptospria interrogaus, Legionella pnumophila, Yersinia pestis, Streptococcus (tipos A and B), *Pneumococcus, Meningococcus, Hemophilus influenza* (tipo b), *Toxoplama gondii, Complybacteriosis, Moraxella catarrhalis, Donovanosis,* y *Actinomycosis;* patógenos fúngicos incluyendo Candidiasis y Aspergillosis; patógenos parasíticos incluyendo solitaria, lombrices, ascárides, amibas, Giardiasis, Criptosporidio, Schitosoma, Pneumocystis carinii, tricomoniasis y triquinosis. El ácido nucleico también puede utilizarse para proveer una respuesta inmune adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como enfermedades de fiebre aftosa, coronavirus, *Pasteurella multocida, Helicobacter, Strongylus vulgaris, Actinobacillus pleuropneumonia,* virus de diarrea viral de bovino (BVDV, por sus siglas en inglés), *Klebsiella pneumoniae, E. coli, Bordetella pertussis, Bordetella parapertussis and Bordetella brochiseptica.* De esta forma, en un aspecto, las construcciones de ácido nucleico de la presente invención pueden encontrar uso en una vacuna. Las vacunas de la invención se pueden utilizar para vacunar contra cualquiera de los patógenos y condiciones mencionados aquí. De esta forma, la invención provee una composición de vacuna que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención o una población de construcciones de ácido nucleico de la

invención o partículas cubiertas de la invención.

En una instancia preferida una construcción de ácido nucleico de la invención puede codificar un antígeno de un miembro de *adenoviridae* (incluyendo por ejemplo un adenovirus humano), *herpesviridae* (incluyendo por ejemplo HSV-1, HSV-2, EBV, CMV y VZV), *papovaviridae* (incluyendo por ejemplo HPV), *poxviridae* (incluyendo por ejemplo viruela y vacuna), *parvoviridae* (incluyendo por ejemplo parvovirus B19), *reoviridae* (por ejemplo incluyendo un rotavirus), *coronaviridae* (incluyendo por ejemplo SARS), *flaviviridae* (incluyendo por ejemplo fiebre amarilla, virus del Nilo del oeste, dengue, hepatitis C, y encefalitis de marca de nacimiento), *picornaviridae* (incluyendo polio, rinovirus, y hepatitis A), *togaviridae* (incluyendo por ejemplo el virus de rubéola), *filoviridae* (incluyendo por ejemplo Marburg y Ebola), *paramyxoviridae* (incluyendo por ejemplo un virus de parainfluenza, virus sisticial respiratorio, paperas y sarampión), *rhabdoviridae* (por ejemplo incluyendo el virus de rabia), *bunyaviridae* (incluyendo por ejemplo el virus Hantaan), *orthomyxoviridae* (incluyendo por ejemplo el virus de influenza A, B y C), *retroviridae* (incluyendo por ejemplo el VIH y HTLV) y *hepadnaviridae* (incluyendo por ejemplo hepatitis B). En una instancia preferida adicional el antígeno puede estar en la forma de un patógeno responsable de una enfermedad veterinaria y en particular puede ser de un

patógeno viral, incluyendo, por ejemplo, un renovirus (tal como la enfermedad del caballo africano o virus de la lengua azul) y virus de herpes (incluyendo herpes de equino). El antígeno puede ser uno del virus de la enfermedad de fiebre aftosa. En una instancia preferida adicional el antígeno puede estar en la forma de un virus de encefalitis de marca de nacimiento, virus de dengue, SARS, virus del oeste del Nilo y el virus Hantaan.

En otro caso preferido el antígeno puede estar en la forma de un *retroviradae* (por ejemplo HTLV-I; HTLV-11; o VIH-1 (también conocido como HTLV-111, LAV, ARV, hTLR, etc.)). En particular de VIH y en particular los aislados HIVI11b, HIVSF2, HTVLAV, HIVLAI, HIVMN; VIH-1CM235, VIH-1; o HIV-2. En una modalidad particularmente preferida, el antígeno puede ser un antígeno de virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Los ejemplos de antígenos de VIH incluyen, por ejemplo, antígenos gpl20, gp 160 gp41, gag tales como p24gag y p55gag, también como proteínas derivadas de las regiones pol, env, tat, vif, rev, nef, vpr, vpu o LTR de VIH. En un caso particularmente preferido el antígeno puede ser el VIH gpl20 o una porción de VIH gpl20. El antígeno puede estar en la forma de un virus de inmunodeficiencia, y puede, por ejemplo, ser de SIV o un virus de inmunodeficiencia de felino.

De esta forma, el polipéptido codificado puede ser

un antígeno, un fragmento inmunogénico del mismo, o una variante inmunogénica del mismo. El fragmento o variante puede, por ejemplo, tener cualquiera de los niveles de homología, proporción de longitud del antígeno original, y funcionalidad especificada aquí y en particular la habilidad para dar origen a una respuesta inmune. En algunos casos, la secuencia de codificación de la construcción de ácido nucleico puede haber sido modificado para optimizar la expresión. Por ejemplo, el uso del codón se puede modificar a aquel típico del sujeto. Una secuencia Kozak de consenso para el sujeto también puede substituirse por la secuencia de existencia natural alrededor del codón de inicio.

En una modalidad especialmente preferida la construcción de ácido nucleico de la invención comprende una secuencia de codificación que codifica un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico de la misma, o una variante inmunogénica de ambos. El fragmento y/o variante pueden tener cualquiera de los niveles de homología de secuencia, longitudes de fragmento y/o niveles de funcionalidad especificados aquí. En particular, preferiblemente una secuencia de codificación de la construcción codifica un antígeno de virus de influenza, un fragmento inmunogénico de un antígeno de virus de influenza o una variante inmunogénica con 80% de homología de aminoácido para cualquiera de los anteriores.

Por ejemplo el antígeno de influenza puede ser un antígeno NP de influenza (nucleoproteína/proteína de nucleocapsida), HA (hemaglutinina), NA (neuraminidasa), M1, M2, PB1, PB2, PA, NS1 y/o NS2 o puede ser un fragmento o variante de dichos antígenos. En una modalidad preferida el antígeno codificado puede ser el antígeno de influenza HA, NA y/o M2 o un fragmento o una variante de dichos antígenos. En una instancia especialmente preferida, el antígeno codificado puede ser un antígeno HA o NA o un fragmento o variante de dichos antígenos y en particular un antígeno HA o un fragmento o variante de dicho antígeno.

De esta forma, en una construcción especialmente preferida de la invención el antígeno codificado es hemaglutinina de influenza (HA), un fragmento inmunogénico de la misma o una variante inmunogénica con 80% de homología de secuencia de aminoácido para cualquiera. En una instancia preferida adicional el antígeno codificado es Neuraminidasa de influenza (NA), M2, un fragmento inmunogénico de cualquier o una variante inmunogénica con 80% de homología de secuencia de aminoácido para cualquiera de los anteriores.

En una instancia preferida, una construcción de la invención puede codificar más de un polipéptido y en particular más de un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico o una variante inmunogénica de ambos. En instancias en donde se va a utilizar más de un antígeno en

una instancia preferida se pueden utilizar los antígenos HA y NA juntos o un fragmento o una variante de dichos antígenos.

En instancias en donde una construcción de la invención expresa más de un antígeno de influenza, fragmento inmunogénico, o variante inmunogénica de ambos, por lo menos dos de los diferentes antígenos, fragmentos o variantes codificados son del mismo polipéptido de influenza de diferentes cepas del virus de influenza.

En una modalidad preferida el antígeno puede estar en la forma de la cepa H5N1 de los fragmentos de influenza e inmunogénicos de la misma y variantes de ambos que retienen inmunogenicidad se pueden utilizar. En particular, el antígeno puede estar en la forma de la cepa H5N1 o un fragmento de dicho antígeno.

En dichas instancias, el antígeno puede ser un fragmento o variante de un polipéptido de influenza de existencia natural. Por ejemplo, el antígeno puede corresponder a una sub-región de un polipéptido de influenza de existencia natural que incluye cualquiera de las varias longitudes de fragmento referidas aquí. El antígeno puede ser una variante de un antígeno de influenza de existencia natural o de un fragmento de dicho antígeno. Preferiblemente dichas variantes y/o fragmentos serán capaces de dar origen a una respuesta inmune capaz de reconocer el antígeno y en particular el virus de influenza del cual se derivan el

fragmento o la variante.

El antígeno de influenza puede estar en la forma de cualquier virus de influenza. El antígeno puede ser del virus de influenza A, B o C, en particular de influenza A y/o B. El antígeno puede estar en la forma de una cepa de influenza variante y en particular una cepa variante asociado con una inefectividad incrementada o patogenicidad de la cepa de influenza. El antígeno puede, por ejemplo, estar en la forma de una de las cepas identificadas anualmente por la Organización Mundial de la Salud a utilizarse en vacunas de influenza y en particular puede ser un antígeno identificado por WHO para dicho uso. En una instancia preferida, una construcción de ácido nucleico, población de ácidos nucleicos, composición farmacéutica o vacuna de la invención pueden codificar un antígeno de cada una de las tres cepas de influenza y en particular las tres cepas identificadas por WHO u otras autoridades equivalentes en un año particular.

En una instancia preferida, uno o más de los antígenos de influenza codificados pueden originarse de una cepa de influenza pandémica. De esta forma, el antígeno de influenza, el fragmento inmunogénico o una variante de cualquiera puede estar en la forma de una cepa de influenza pandémica. Una construcción que codifica el antígeno a partir de la cepa pandémica puede, por ejemplo, administrarse, o estar presente, por sí mismo. En otros, la construcción

también puede codificar, o administrarse con otras construcciones que codifican, otros antígenos. En un caso particular, un antígeno de una cepa de influenza pandémica y un antígeno de una cepa de influenza no pandémica pueden codificarse ya sea en la misma o separadas construcciones. En particular, un antígeno de gripe pandémica y un antígeno de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más cepas de influenza no pandémica se pueden administrar, preferiblemente un antígeno de cada una de 3, 4 ó 5 cepas de influenza no pandémicas se pueden administrar y aún más preferiblemente un antígeno de cada una de las 3 ó 4 cepas de influenza no pandémicas se pueden administrar.

En algunas instancias, la construcción puede codificar más de un polipéptido. En particular, una construcción puede codificar más de un antígeno y especialmente más de un antígeno de influenza. Por ejemplo, la construcción puede expresar dos, tres, cuatro, cinco, seis o más polipéptidos y en particular antígenos. En un caso preferido, la construcción puede codificar tres, cuatro, cinco o más diferentes polipéptidos y en particular antígenos. En un caso aún más preferido la construcción puede codificar tres, cuatro o cinco diferentes polipéptidos y en particular antígenos. En aún un caso más preferido la construcción puede codificar tres o cuatro diversos polipéptidos, en particular antígenos y especialmente

antígenos de influenza. Al menos uno de los antígenos se expresará utilizando el promotor quimérico de la invención y preferiblemente todos los antígenos se expresaran de esta forma. Típicamente, cada antígeno puede expresarse de un promotor quimérico separado de la invención. En algunos casos, se puede utilizar un solo promotor para generar una trascripción que da origen a una pluralidad de polipéptidos. En algunos casos, se pueden expresar varios antígenos como una proteína de fusión.

En una instancia preferida, una construcción de la invención codifica un antígeno de influenza pandémico, un fragmento inmunogénico de la misma, o una variante inmunogénica de ambos y uno o más antígenos de influenza no pandémicos, fragmentos inmunogénicos de lo mismo o variantes inmunogénicas de cualquiera.

Las construcciones de ácido nucleico de la invención se pueden utilizar en una vacuna. De esta forma, la invención provee una composición de vacuna que comprende una construcción de ácido nucleico, una población de construcciones de ácido nucleico o partículas portadoras cubiertas de la invención. La vacuna puede comprender un portador excipiente farmacéuticamente adecuado. La vacuna puede comprender un adyuvante y en particular una construcción adyuvante de la invención. Alternativamente, la vacuna puede administrarse separadamente, secuencialmente o

simultáneamente con dicho coadyuvante.

En una instancia preferida, la invención provee una vacuna multivalente que comprende por lo menos dos diferentes construcciones de la invención que codifican diferentes antígenos, fragmentos inmunogénicos de los mismos, o variantes inmunogénicas de cualquiera. El antígeno puede ser cualquiera de aquellos mencionados aquí. En una instancia preferida, la invención provee una vacuna multivalente que comprende al menos dos diferentes construcciones de la invención que codifican diferentes antígenos de influenza, fragmentos inmunogénicos de la misma o variantes inmunogénicos de cualquiera. En instancias alternativas, una pluralidad de antígenos se puede expresar de la misma construcción para proveer una vacuna multivalente o combinaciones de construcciones que codifican antígenos individuales y plurales se pueden utilizar.

En una instancia preferida adicional, una vacuna multivalente de la invención puede ser una que es una vacuna trivalente, tetravalente o pentavalente que codifica tres, cuatro o cinco diferentes antígenos, fragmentos inmunogénicos o variantes inmunogénicas y en particular el antígeno de influenza, fragmentos o variantes de ambos.

En otra instancia preferida una vacuna de la invención, que incluye vacunas multivalentes, puede comprender una construcción que codifica un antígeno de

influenza pandémico, fragmentos inmunogénicos de los mismos o variantes inmunogénicas de cualquiera. Una vacuna multivalente puede codificar un antígeno de influenza pandémico, un fragmento inmunogénico, o una variante inmunogénica de ambos y también, por ejemplo, un antígeno de cada una de los tres, cuatro o cinco diferentes cepas de influenza, fragmentos inmunogénicos de los mismos o variantes inmunogénicas de cualquiera. Un adyuvante puede estar presente en una vacuna de la invención o administrarse simultanea, separada o secuencialmente con una vacuna de la invención. En particular, la invención provee una vacuna que comprende por lo menos una construcción de la invención que codifica un subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, fragmento de la misma con una actividad adyuvante o variante de la misma con actividad adyuvante.

Las construcciones de ácido nucleico que expresan más de un antígeno se puede utilizar para generar vacunas multivalentes, es decir una vacuna prevista para inmunizar contra una pluralidad de diferentes antígenos y en particular contra antígenos de influenza. En algunos casos, serán provistos un antígeno o antígenos de influenza y un antígeno o antígenos de un patógeno diferente. De esta forma, cualquiera de las construcciones, poblaciones de construcciones de ácido nucleico, vacunas, composiciones farmacéuticas, partículas portadoras cubiertas mencionados

aquí pueden comprender una construcción que codifica un antígeno de influenza y ya sea la misma construcción, o diferentes construcciones, pueden codificar antígenos de diferentes patógenos. Las varias construcciones de influenza multivalentes, poblaciones y vacunas mencionadas aquí también pueden codificar un antígeno o antígenos de un patógeno diferente.

En algunos casos, los antígenos asociados tendrán la forma del mismo patógeno. En algunos casos, los diferentes antígenos serán todos del mismo virus. De esta forma, en una instancia preferida, todos los antígenos serán antígenos de influenza. La pluralidad de antígenos puede venir de la misma cepa del virus de influenza y por lo tanto pueden ser de varios diferentes polipéptidos de virus de influenza. Alternativamente, la pluralidad de antígenos puede ser de diferentes cepas de virus y en particular virus de influenza. En el caso de construcciones multivalentes y/o antígenos de vacunas de al menos dos y preferiblemente por lo menos tres, cuatro o cinco diferentes cepas de influenza se pueden seleccionar. Los antígenos pueden, por ejemplo, ser de 2, 3, 4, 5, 6 o más diferentes cepas, en particular antígenos de tres, cuatro o cinco cepas se pueden utilizar, y aún más preferiblemente de tres o cuatro diferentes cepas.

Las vacunas multivalentes puede alternativa o adicionalmente comprender una pluralidad de diferentes

construcciones de la invención con las diferentes construcciones codificando diferentes antígenos. Por ejemplo, por lo menos 2, 3, 4, 5, ó 6 diferentes construcciones se pueden utilizar. En una instancia particularmente preferida, 2, 3, 4 ó 5 diferentes construcciones y especialmente tres o cuatro construcciones se pueden utilizar. En una instancia, cuando más de una construcción está presente, cada construcción codifica un antígeno singular. En una instancia adicional, las construcciones pueden codificar 2, 3, 4, 5 o más diferentes de antígenos, preferiblemente 3 ó 4 diferentes antígenos.

La invención también provee una población de construcciones de ácido nucleico en donde la población comprende una pluralidad de construcciones de la invención y en particular cualquiera de las combinaciones mencionadas anteriormente. De esta forma, la invención provee una población de construcciones de ácido nucleico en donde la población comprende por lo menos dos diferentes construcciones de la invención. Las construcciones de ácido nucleico pueden estar presentes en cualquier cantidad adecuada relativas entre sí. Típicamente, cada construcción de ácido nucleico está presente en una relación de peso de aproximadamente 1:10 entre sí. Las poblaciones de construcciones de ácido nucleico se pueden utilizar para generar vacunas multivalentes y en los varios métodos de la

invención. Las vacunas multivalentes también pueden ser multivalentes porque comprenden cualquiera de las construcciones de la invención que codifican más de un antígeno.

En una instancia preferida una población de ácidos nucleico es provista en donde la población comprende al menos dos diferentes construcciones que codifican diferentes antígenos. En particular, la invención provee una población que comprende al menos dos diferentes construcciones que codifican antígenos de influenza, fragmentos inmunogénicos de los mismos o variantes inmunogénicas de cualquiera. En dicha población de construcciones de ácido nucleico preferiblemente al menos dos de los diferentes antígenos pueden estar en la forma del mismo polipéptido de influenza, tal como HA, de diferentes cepas de influenza. En poblaciones con al menos dos diferentes construcciones que codifican antígenos de influenza estén presentes, preferiblemente por lo menos dos de los diferentes antígenos, los fragmentos o variantes están en la forma de diferentes polipéptidos de influenza pueden estar en la forma de la misma o diferente cepa de influenza. Las poblaciones preferidas adicionales incluyen una población de construcciones de ácido nucleico en donde la población comprende por lo menos tres diferentes construcciones con cada uno codificando un antígeno de una cepa de influenza diferente o un fragmento inmunogénico o variante

inmunogénica.

En otra instancia preferida, la invención provee una población de construcciones de ácido nucleico que comprenden al menos una construcción que codifica un antígeno, un fragmento inmunogénico del mismo, o una variante inmunogénica de ambos y al menos una construcción que codifican una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, fragmento del mismo con actividad adyuvante o variante del mismo con actividad adyuvante. El o cada construcción que codifica un antígeno, fragmento inmunogénico o variante inmunogénica típicamente está presente en una relación de peso de aproximadamente 10:1 a 1:10 con respecto al o cada construcción que codifica la subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, fragmento del mismo con actividad adyuvante o variante del mismo con actividad adyuvante. La relación de peso puede ser de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 1:1, por ejemplo aproximadamente 9:1.

En instancias en donde se van a codificar una pluralidad de polipéptidos, cualquier combinación de construcciones que codifica uno o más polipéptidos y una pluralidad de construcciones se pueden utilizar. Por ejemplo, cuando se van a codificar tres antígenos, una construcción puede codificar los tres, una construcción puede codificar dos y otro construcción un antígeno, o tres construcciones cada una codifica un antígeno puede, por ejemplo, utilizarse.

En instancias en donde cuatro antígenos van a codificarse, se pueden codificar a través de cuatro, tres, dos o una construcción, cada construcción codificando un, dos, tres, o cuatro diferentes antígenos. En una instancia, se pueden utilizar tan pocas como sea posible construcciones, por ejemplo solamente una o dos construcciones se pueden utilizar. La invención también provee poblaciones de ácidos nucleicos y vacunas que comprenden dichas combinaciones de construcciones de ácido nucleico.

En una instancia preferida, la invención provee una vacuna multivalente o población de ácidos nucleicos que comprende una construcción que codifica un antígeno de un virus de influenza pandémico y que también codifica 3, 4 ó 5 y en particular 3 ó 4 antígenos de influenza no pandémicos. Los antígenos de influenza no pandémicos pueden codificarse en la misma construcción que el antígeno de influenza pandémico o en diferentes construcciones. En una instancia preferida los 3, 4 ó 5 antígenos de influenza no pandémicos diferentes se pueden codificar en una construcción separada o construcciones y en particular en una sola construcción separada. En otra instancia, la construcción que codifica el antígeno pandémico puede también codificar uno o más de los otros antígenos.

En algunas modalidades, la construcción de ácido nucleico codificará un adyuvante o una construcción separada

puede hacer esto. Cualquiera de las poblaciones, composiciones y vacunas de la invención puede comprender, o pueden administrarse simultánea, secuencial o separadamente con dicha construcción adyuvante. De esta forma, las secuencias insertadas en el sitio de clonación para la inserción de una secuencia de codificación pueden codificar un polipéptido que puede actuar como un adyuvante.

De esta forma, en una instancia la invención comprende una construcción de ácido nucleico en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con una actividad adyuvante o una variante de cualquiera con una actividad adyuvante que también tiene 80% de homología de aminoácido para cualquiera de los anteriores. En una instancia preferida, la construcción de ácido nucleico comprende dos secuencias de codificación que comprenden una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con actividad adyuvante o variante de cualquiera con actividad adyuvante, en donde cada una está enlazada al promotor quimérico.

Las dos secuencias de codificación que codifican una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, fragmento de la misma con una actividad adyuvante o variante de cualquiera con actividad adyuvante puede ser, en una instancia, estar en orientación inversa. En otra instancia

las dos secuencias de codificación que codifican una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, fragmento de la misma con actividad adyuvante o variante de cualquiera con actividad adyuvante puede estar en la misma orientación. En cualquiera de las construcciones de la invención que comprenden más de una secuencia de codificación enlazada a un promotor quimérico, los promotores pueden estar en la misma orientación, en diferentes orientaciones, o una mezcla de dos en donde existen tres o más de dichos promotores.

En una instancia preferida, el adyuvante codificado en cualquiera de las construcciones adyuvantes puede ser una toxina bacteriana de ribosilación ADP. Éstas incluyen la toxina de difteria (DT), la toxina de tosferina (PT), la toxina de cólera (CT), las toxinas lábiles al calor *E.coli* (LT1 y LT2), endotoxina A *Pseudomonas*, exotoxina S *Pseudomonas*, exoenzima de *B cereus*, toxina *B. sphaericus*, toxinas *C botulinum C2 y C3*, exoenzima *C. limosum*, así como toxinas de *C. perfringens, C spiriforma* y *C. difficile* y *Staphylococcus aureus* EDIN. La mayor parte de las toxinas bacterianas de ribosilación ADP contienen subunidades A y B. La construcción puede expresar la subunidad A, la subunidad B y/o ambas subunidades.

En una instancia preferida, la construcción de ácido nucleico puede codificar la toxina lábil de calor de *E.coli* y/o la toxina de cólera y en particular puede expresar

la toxina lábil de calor *E. coli*. Una entrada a GenBank para las secuencias completas de los genes de la subunidad A y B CT se puede encontrar en Locus VIBCTXABB (No. de acceso D30053), mientras una entrada de GenBank para las secuencias completas de los genes de la subunidad A y B LT se puede encontrar en locus AB0116677 (No. de acceso AB011677). En una instancia particularmente preferida, una construcción de la invención puede codificar las subunidades LT A y/o LT B codificadas por los vectores pPJV2012 y/o pPJV7788 o un fragmento de dicha subunidad que retiene la actividad adyuvante o una variante de cualquiera que retiene la actividad adyuvante. Una construcción de la invención puede comprender las secuencias de codificación para las subunidades LT A y/o LTB de los vectores pPJV2012 y/o pPJV7788, un fragmento de los mismos que codifica un polipéptido que tiene actividad adyuvante o una variante de cualquiera que tiene actividad adyuvante. En una instancia preferida una construcción de la invención tiene tanto las secuencias de codificación del LT A y LTB.

En otra instancia preferida, la construcción puede comprender la secuencia del vector PJV2012 provista por la SEC ID No: 61 o una secuencia con 60% de identidad de secuencia de la misma. En una instancia adicional, la construcción puede comprender la secuencia del vector PJV7788 provisto por SEC ID No: 62 o una secuencia con 60% de

identidad de secuencia del mismo.

La construcción puede expresar una variante activa o fragmento de un adyuvante particular. La variante o fragmento se dirá que es activa si retiene por lo menos actividad adyuvante del polipéptido del que se deriva. De esta forma, la variante y/o fragmento aún serán capaces de mejorar la respuesta inmune contra un antígeno particular en comparación con la respuesta inmune vista cuando no se administra ningún adyuvante con el antígeno. La secuencia codificada pueden ser fragmentos activos o variantes de las subunidades A y/o B CT y en particular pueden ser fragmentos activos de las subunidades A y/o B LT. Las variantes y fragmentos que se pueden utilizar pueden, por ejemplo, tener cualquiera de las longitudes, niveles secuencia de homología u otras características mencionadas aquí para variantes y fragmentos. Estas pueden, por ejemplo, evaluarse utilizando el ensayo de inmunogenicidad comparativo utilizando un antígeno particular y después comparando los resultados vistos con un vector base adyuvante y un vector variante que codifica un adyuvante. En una modalidad particularmente preferida la construcción puede codificar las subunidades LTA y/o LTB y en particular ambas. La construcción puede, en una instancia particularmente preferida ser pPJV2012 o pPJV7788 de las secuencias para las cuales se proveen.

Cualquiera de las construcciones adyuvantes de la

255

invención se puede administrar simultánea, secuencial o separadamente con un antígeno o un ácido nucleico que codifica un antígeno. En una instancia preferida una construcción de adyuvante de la invención se puede administrar simultánea, secuencial o separadamente con una construcción de la invención que codifica un antígeno. Las composiciones y vacunas que comprenden una construcción adyuvante y una construcción que codifica un antígeno se proveen, como portadores centrales cubiertos con ambos tipos de construcciones provistas en ellos o mezclas de portadores centrales cubiertos con una construcción adyuvante y otros portadores centrales cubiertos con una construcción que codifica un antígeno.

La subunidad de toxina puede haber tenido su secuencia de señal de existencia natural eliminada. Las secuencias de señal natural de las exotoxinas se pueden reemplazar por una secuencia de señal eucariótica y en particular a través del péptido de señal de lisozima de pollo. Una subunidad de exotoxina de ocurrencia natural puede haber sido modificada para desintoxicar la toxina. La subunidad A puede haber sido modificada para interrumpir o inactivar la actividad de transferasa de ribosilación ADP. En algunos casos, las subunidades de exotoxina pueden retener la toxicidad. De esta forma, en algunas instancias las subunidades de exotoxina pueden no haber sido desintoxicadas.

De esta forma, las construcciones adyuvantes de la invención pueden utilizarse para mejorar una respuesta inmune contra un antígeno particular. La respuesta inmune mejorada puede involucrar una respuesta inmune de una magnitud mayor o duración. Esto puede significar que cuando el antígeno se reencuentra con la respuesta inmune entonces es mayor que si no se administra el adyuvante. La respuesta inmune mejorada puede dar como resultado concentraciones de anticuerpo mayores. En el caso de algunas construcciones, y en particular aquellas que expresan subunidades de exotoxina, el adyuvante puede dar como resultado una respuesta celular aumentada y una respuesta inmune de tipo adyuvante 1 T contra el antígeno en cuestión.

Las construcciones del adyuvante se pueden administrar, estar presentes en una vacuna con, o estar presentes en una población de ácidos nucleicos con cualquiera de las construcciones mencionadas aquí. Las construcciones de adyuvante también pueden codificar, o administrarse con una construcción que codifica, un antígeno o antígeno, que incluye cualquiera de estos mencionado aquí y en particular aquellos que codifican la influenza.

En una modalidad, una construcción de la invención puede codificar un inmunoestimulador y/o un inmunosupresor. En una instancia preferida una construcción puede codificar uno o más de interferón alfa, beta y/o gamma, interleucina-1,

-2, -4, -5, -7, -10, -12, -13, -18, -23 y -24, el ligando GM-CSF, G-CSF, TGF-beta, B7.1, B7.2, CTLA-4, CD40, los ligandos CD40, OX40, OX40, el ligando Flt-3, TRAIL, TRANCE, el ligando Fas, alfa TNF, alfa MCP-1, PF-4, SLC, MIP-3 alfa, IP-10. En algunos casos dicha construcción se pueden administrar simultánea, separada o secuencialmente con cualquier otra construcción, en particular uno de la invención y especialmente una construcción que codifica un antígeno.

Una construcción de la invención puede comprender una señal de poliadenilación. El ácido nucleico para la inserción en el sitio de clonación puede comprender una secuencia de poliadenilación (poliA). Dicha secuencia poliA es generalmente nativa para la secuencia de codificación. Alternativamente, puede ser provista una secuencia poliA heteróloga en la construcción de ácido nucleico de la invención. Típicamente la secuencia poliA será provista en dirección 3´ del sitio de clonación, de tal forma que está operativamente enlazada a la secuencia de codificación insertada en el sitio de clonación. Se puede incluir cualquier secuencia poliA adecuada en la construcción utilizando técnicas de clonación estándar. Dichas secuencias de poliA son conocidas en la técnica.

La secuencia poli A puede ser:

(i) una secuencia poli A natural;

(ii) una variante homóloga funcional de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

La secuencia poli A natural (i) puede ser, por ejemplo, una poli A del gen de globina beta de conejo, una poli A del gen temprano o tardío del virus de papiloma humano (HPV), una poli A del gen HSV-2gB, una poli A del gen temprano inmediato de CMV de simio, o poli A del gen tardío HSVgD. Las secuencias de poliadenilación se pueden derivar de una secuencia de poliadenilación de un gen seleccionado de aquellos del gen de globina beta de conejo, los genes tempranos o tardíos del virus de papiloma humano (HPV), el gen HSV-2gB, el gen temprano inmediato CMV de simio y el gen tardío HSVgD.

Preferiblemente la secuencia poli A natural (i) se selecciona del grupo que consiste de SEC ID No. 10 (GenBank K03256), SEC ID No. 11 (GenBank M16019), SEC ID No. 12 (GenBank Z80699) y SEC ID No. 13 (GenBank K02718). Una secuencia poli A particularmente preferida comprende los nucleótidos 4243 a 4373 de SEC ID NO: 54 o es una variante homóloga funcional o fragmento de la misma. Una secuencia poli A preferida también es provista por medio de los nucleótidos 2556 a 2686 de SEC ID No. 14 o un fragmento funcional o una variante de cualquiera también se puede utilizar.

En una instancia preferida adicional, la señal de poliadenilación utilizada en la construcción de la invención

puede comprender:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEC ID NO: 12, SEC ID NO: 13, los nucleótidos 4243 a 4373 de SEC ID NO: 54, los nucleótidos 906 a 1038 de SEC ID No: 61, los nucleótidos 4375 a 4050 de SEC ID No: 61, y/o los nucleótidos 2463 a 2593 de SEC ID No: 62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido para uno o más de las secuencias de (i); y/o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

En general, una secuencia poli A funcional es una que retiene la actividad de poliadenilación.

Una secuencia poli A se puede probar para la habilidad para atraer aproximadamente la poliadenilación de una trascripción de ARN utilizando un ensayo de expresión de rutina. Una variante homóloga funcional (ii) o fragmento funcional (iii) típicamente muestra por lo menos 50%, por ejemplo 60%, 70%, 80% o más de la actividad poli A de la secuencia poli A natural en el ensayo.

Generalmente, la secuencia poli A, cuando está presente en la construcción de la invención, mejora la expresión, típicamente causando una mejora comparable con la secuencia poli A natural (i) mencionada anteriormente.

Una secuencia poli A también puede ensayarse para la funcionalidad utilizando el ensayo de expresión

comparativo siguiente. Una región poli A de prueba se intercambia en el vector base en el lugar de RBGpA. Una poli A de prueba se considera funcional si la poli A no anula la expresión, pero preferiblemente incrementa la expresión en al menos una pero preferiblemente dos tipos de células, comparado con el vector base. Preferiblemente existe un incremento en la expresión de al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40% ó 50% o más. El incremento puede ser cualquiera de los niveles anteriormente mencionados aquí. En algunos casos, puede ocurrir una disminución, incluyendo cualquiera de los niveles mencionados aquí. Los tipos de célula preferidos son HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamífero. También se pueden utilizar células SSC15 o B16. De acuerdo con el ensayo, típicamente una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es funcional si permite más de 50% de la mejora en la expresión lograda por la secuencia poli A natural (i).

Alternativa o adicionalmente, las secuencias poli A se pueden probar para la actividad en el ensayo de inmunogenicidad comparativo siguiente. La secuencia poli A se intercambia en el vector base en lugar de RBGpA. Una secuencia poli A funcional provee concentraciones de anticuerpo que son al menos tan altas como la mayor de aquellas logradas por el vector base con al menos uno, preferiblemente dos antígenos. Preferiblemente las concentraciones del anticuerpo son de al menos 5%, 10%, por

ejemplo 20%, 30% ó 40% o mayores que aquellas logradas con el vector base. En algunas instancias cualquiera de los aumentos o disminuciones mencionados aquí se pueden ver. Los antígenos preferidos son los antígenos HBsAg, HSV2gD y Flu-M2. Los antígenos especialmente preferidos son el antígeno de influenza, incluyendo cualquiera de aquellos mencionados aquí y en particular los antígenos HA, NA y M2. En particular, el antígeno HA, o un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos se puede utilizar. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es típicamente funcional si permite que se logren las concentraciones de anticuerpo más grandes a través de la secuencia poli A natural (i).

La construcción de ácido nucleico puede comprender secuencias de control adicionales que tienen influencia sobre la expresión de una secuencia de codificación insertada en el sitio de clonación. La construcción puede incluir una secuencia líder no traducida. La secuencia es provista en la construcción en enlace operable con el promotor quimérico, y por consiguiente también con la secuencia de codificación insertada en el sitio de clonación. La líder provee un sitio de inicio de traducción para la expresión de una secuencia de codificación insertada y típicamente incluye una secuencia Kozak.

Típicamente, la secuencia líder no traducida

comprende:

(i) una secuencia líder no traducida natural;

(ii) una variante homóloga funcional de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

Típicamente, la secuencia líder comprende secuencias presentes en (i) que se unen a los componentes de trascripción o proteínas reguladoras, u homólogos de estas secuencias que son capaces de unirse a los mismos componentes o proteínas. Típicamente dichas secuencias o sus homólogos están presentes en la secuencia líder en la misma orden y/o substancialmente la misma separación que (i). En general la secuencia líder comprende un sitio de inicio de traducción en la expresión de una secuencia de codificación insertada. Típicamente la secuencia líder incluye una secuencia Kozak.

En general la secuencia líder no traducida tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 nucleótidos, por ejemplo, de aproximadamente 15 a 150 nucleótidos, preferiblemente 15 a aproximadamente 130 nucleótidos. Las secuencias líderes comprenden, por ejemplo, 15, 50, 75 ó 100 nucleótidos se pueden utilizar.

Generalmente, una secuencia líder no traducida funcional es una que es capaz de proveer un sitio de inicio de traducción para la expresión de una secuencia de codificación en un enlace operable con la secuencia líder. Típicamente una variante funcional (ii) o fragmento (iii)

tiene substancialmente la misma actividad que y/o complementa la actividad de la secuencia natural (i), usualmente en la facilitación o mejoramiento de la expresión de una secuencia de codificación en enlace operable con la secuencia.

Una variante (ii) o fragmento (iii) se puede probar para actividad como una secuencia líder no traducida relativa a la secuencia líder natural utilizando protocolos estándar. Por ejemplo, los vectores de expresión se pueden preparar comprendiendo una secuencia líder natural (i) operablemente enlazada a su secuencia de codificación nativa, y la expresión se monitorea en las células hospederas adecuadas, por ejemplo, las células HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamífero. Las construcciones de prueba pueden prepararse en donde la secuencia líder natural se reemplaza por una variante homóloga o fragmento y la expresión se monitorea otra vez en las mismas células hospederas. En general, una variante (ii) o fragmento (iii) provee al menos 50%, tal como 60%, 70%, 80%, 90% ó 100% o más de la expresión provista por la secuencia natural. En algunos casos cualquiera de los incrementos o disminuciones en la expresión mencionada aquí se pueden ver.

Una secuencia líder potencial también se puede probar para utilidad en el ensayo de expresión comparativo siguiente. Por lo menos una secuencia líder se intercambia de en el vector base en lugar de HBV pre S2 5'UTR. Una secuencia

líder funcional no anula la expresión pero preferiblemente incrementa la expresión en al menos una pero preferiblemente dos tipos de células de referencia, comparado con el vector base. En general la expresión se incrementa por al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40% ó 50%. Los tipos de célula preferidos son las células HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamíferos. De acuerdo con el ensayo, una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es típicamente funcional si permite más del 50% de mejoramiento en la expresión logrado por la secuencia líder natural.

Alternativa o adicionalmente, una secuencia líder se puede probar para la actividad en el ensayo de inmunogenicidad comparativo siguiente. Una secuencia líder se intercambia en el vector base en lugar de HBV pre S2 5'UTR. Una secuencia líder funcional provee concentraciones de anticuerpo que son al menos tan altas como la más alta de aquellas logradas por el vector base, con al menos uno preferiblemente dos antígenos. Preferiblemente las concentraciones de anticuerpo son de al menos 5%, 10%, 20%, 30% ó 40% mayores que con el vector base.

Los antígenos preferidos son los antígenos HBsAg, HSV 2gD y Flu-M2. Los antígenos especialmente preferidos son antígenos de influenza, incluyendo cualquiera de aquellos mencionados aquí y en particular los antígenos HA, NA y M2. En particular, el antígeno HA, o un fragmento o variante del

mismo se pueden utilizar. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es típicamente funcional si permite las concentraciones de anticuerpo más altas permitidas por la secuencia líder natural (i). Sin embargo, en algunos casos unos de los niveles disminuidos de la expresión mencionados aquí se pueden ver.

La secuencia líder adecuada se puede obtener utilizando protocolos estándar. Por ejemplo, la secuencia de antígeno HBV preS2, la secuencia de e-antígeno HBV y la secuencia de antígeno gD de tipo 2 HSV están disponibles en GenBank M54923, M54923 y Z86099 respectivamente. Los cebadores se pueden diseñar con base en esta secuencia conocida y utilizarse para aislar secuencias homólogas. Las secuencias líderes pueden sintetizarse con base en secuencias conocidas.

En general la secuencia natural (i) es una secuencia eucariótica o una secuencia viral, en particular, de un virus que infecta a un eucariota. Preferiblemente, la secuencia natural (i) es la secuencia HBV o HSV, por ejemplo la secuencia del antígeno HBV preS2, la secuencia del e-antígeno HBV, o la secuencia de antígeno gD de tipo 2 HSV. Particularmente preferiblemente, (i) se selecciona del grupo que consiste de SEC ID No.5, SEC ID No. 6 y SEC ID No. 7. En una instancia preferida adicional, la secuencia líder no traducida comprende los nucleótidos 1864-1984 de SEC ID NO:54

o SEC ID NO:14. Los fragmentos funcionales o variantes de ambos de estas secuencias también se pueden utilizar

En una instancia, la secuencia líder no traducida comprende:

(i) la secuencia de nucleótidos SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7 o nucleótidos 1864 a 1984 de SEC ID NO: 54.

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido para (i); y/o

(iii) el fragmento funcional de (i) o de (ii).

Dicha secuencia líder no traducida se puede utilizar en cualquiera de las construcciones de la invención.

La construcción de ácido nucleico puede comprender una secuencia potenciadora. Una secuencia potenciadora típicamente es provista en 3′ del sitio de clonación, operablemente enlazada tanto con el promotor quimérico como la secuencia de codificación insertada, y actúa para incrementar la trascripción de la secuencia insertada.

En general el potenciador comprende:

(i) un potenciador natural;

(ii) una variante homóloga funcional de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

La secuencia potenciadora comprende generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 850 nucleótidos, por

ejemplo, de aproximadamente 75 a aproximadamente 500 nucleótidos. Los potenciadores de aproximadamente 100, 200, 300 o 400 nucleótidos pueden ser utilizados.

Típicamente (i) es un potenciador eucariótico o viral, particularmente, de un virus que infecta eucariotes. Usualmente dichos potenciadores ocurren en la región no traducida 3' (UTR 3') de un gen. Preferiblemente (i) es un potenciador HBV o CMV, por ejemplo un UTR 3' HBs Ag o un UTR 3' del gen temprano inmediato CMV. Preferiblemente (i) comprende SEC ID NO:8 o SEC ID NO:9. Preferiblemente (i) puede los nucleótidos 3699-4231 de SEC ID NO:54. En otra instancia preferida (i) puede comprender los nucleótidos 2012 a 2544 de SEC ID NO:14. Los fragmentos o variantes funcionales de cualquiera de estas secuencias se pueden utilizar.

En general, el potenciador en la construcción comprende las secuencias encontradas en (i) que unen componentes de trascripción o proteínas reguladoras, por ejemplo factores de la trascripción, u los homólogos de estas secuencias que se unen a los mismos componentes o proteínas. Preferiblemente estas secuencias están presentes en el potenciador en el misma orden y/o substancialmente la misma separación que en (i).

Generalmente un potenciador funcional es uno que mejora o incrementa la expresión de un polinucleótido, por

ejemplo, una secuencia de codificación, que está operablemente enlazada a la secuencia potenciadora. Típicamente una variante homóloga funcional (ii) o fragmento (iii) tiene substancialmente la misma actividad (por ejemplo, el mejoramiento de la expresión) como y/o contempla la actividad del potenciador natural (i).

La actividad potenciadora se puede ensayar utilizando un ensayo de trampa de potenciador. Los protocolos son conocidos en la técnica. Una variante homóloga funcional (ii) o fragmento (iii) preferiblemente provee al menos 50% de la actividad potenciadora mostrada por el potenciador natural en dicho ensayo. Típicamente la actividad es de al menos 60%, el 70%, el 80%, 90, 100% o más de la actividad del potenciador natural. En general, una variante funcional (ii) o fragmento (iii) es capaz de complementar la actividad del potenciador natural (i) en el ensayo. Cualquiera de los aumentos o disminuciones referidas en la presente pueden, por ejemplo, ser vistos.

En una instancia preferida, la secuencia potenciadora comprende:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, los nucleótidos 3699 a 4231 de SEC ID NO:54, los nucleótidos 3831 a 4363 del SEC ID NO:61 y/o 4507 a 5038 de SEC ID NO:62.

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al

menos 80% de homología de secuencia de nucleótido para una o más de las secuencias de (i); y/o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

La utilidad potenciadora también se puede probar utilizando el ensayo de expresión comparativo establecido a continuación. Una secuencia UTR 3' de prueba se intercambia en el vector base. Una UTR 3' tienen la utilidad si no anula la expresión, pero preferiblemente incrementa la expresión en por lo menos uno pero preferiblemente dos tipos de células de referencia comparados con los vectores base en el ensayo. Preferiblemente la expresión se incrementa en al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40% o 50%. Los tipos de célula preferidos son las células HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamífero. De acuerdo con este ensayo, una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es típicamente funcional si permite más del 50% de la mejora de expresión lograda por la secuencia potenciadora natural (i).

Adicional o alternativamente, las secuencias potenciadoras se pueden probar para actividad en el ensayo de inmunogenicidad comparativo siguiente. Un UTR 3' se intercambia en el vector base. La secuencia potenciadora funcional provee concentraciones de anticuerpo que son al menos tan altas o mayores que aquellas logradas por vector base con al menos uno, preferiblemente dos antígenos. Preferiblemente las concentraciones del anticuerpo son de al

menos 5%, 10%, 20%, 30% o 40% mayores que con el vector base. Los antígenos preferidos son los antígenos HBs Ag, de HSV2gD y Flu-M2. Los antígenos especialmente preferidos son antígenos de influenza, incluyendo cualquiera de aquellos mencionados aquí y en particular los antígenos Ha, NA y M2. Particularmente, HA puede utilizarse o un fragmento o variante del mismo. Una variante homóloga (ii) o fragmento (iii) es funcional si permite que la concentración del anticuerpo más alta permitida por la secuencia potenciadora natural (i).

La secuencia potenciadora adecuada se puede obtener utilizando métodos de clonación estándares. Por ejemplo, la secuencia UTR 3' HBsAg o la secuencia UTR 3' del gen temprano inmediato CMV de simio se pueden evaluar en GenBank AF143308 y M16019. Los cebadores se pueden diseñar con base en su secuencia conocida y utilizar para secuencias homólogas aisladas.

En algunas instancias, cuando una pluralidad de polipéptidos es codificada a través de una sola construcción, puede ser deseable omitir las secuencias particulares para reducir el tamaño de la construcción. Particularmente, una construcción puede carecer de un potenciador y/o región de codificación en la secuencia líder no traducida operablemente enlazada a la secuencia o secuencias de codificación del polipéptido que se va a expresar. Esto puede, por ejemplo,

ser el caso en donde tres, cuatro, cinco o más polipéptidos se expresan de la misma construcción y particularmente tres, cuatro o cinco polipéptidos se expresan de la misma construcción.

En una modalidad preferida, la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia poli A heteróloga, una secuencia líder heteróloga y un potenciador heterólogo, todos operablemente enlazados con el promotor quimérico, para la expresión eficiente de una secuencia de codificación insertada.

En un aspecto más, la presente invención también provee una construcción de ácido nucleico que comprende, o algunas veces consiste esencialmente de:

(i) una secuencia promotora

(ii) una secuencia líder no-traducida derivada de la secuencia de antígeno de HBV preS2, una secuencia de e-antígeno de HBV o la secuencia de antígeno gD del tipo 2 HSV; y

(iii) una secuencia de codificación operablemente enlazada a (i) y (ii)

en donde la secuencia de codificación es heteróloga para la secuencia líder no-traducida.

Típicamente la secuencia promotora (i) se deriva de una secuencia promotora viral o eucariótica. La secuencia promotora puede ser una secuencia promotora natural, un

homólogo funcional de la secuencia natural o un fragmento funcional de cualquiera. Los promotores naturales adecuados incluyen, el promotor temprano inmediato hCMV, el promotor del virus de Pseudorabia (PRV) o el promotor del virus de sarcoma Rous (RSV). Preferiblemente el promotor natural comprende SEC ID NO:52 o SEC ID NO:53.

Una construcción promotora artificial, dicho como la promotora quimérica descrita anteriormente, se puede utilizar, siempre el promotor sea funcional.

Una secuencia promotora funcional es generalmente una que puede causar (incluyendo iniciar y regular) la trascripción de una secuencia de codificación operablemente enlazada en una célula hospedera adecuada.

Una secuencia promotora se puede probar para actividad promotora utilizando un ensayo expresión de rutina. Un homólogo o fragmento funcional de una secuencia promotora natural típicamente provee al menos 50%, por ejemplo, o al menos 60, 70, 80 o 90% de expresión provista por la secuencia natural en dicho ensayo.

La secuencia líder no-traducida (ii) se describe anteriormente. Las secuencias de codificación adecuadas (iii) incluyen aquellas ya descritas con relación a construcción promotora quimérica. Sin embargo, en el presente aspecto de la invención, la secuencia de codificación es heteróloga para secuencia líder no-traducida. La presente construcción

típicamente incluye una secuencia poli A, que ya está descrita, que puede ser nativa para la secuencia de codificación, o provista como una secuencia poli A heteróloga en la construcción. Las secuencias poli A adecuadas ya han sido descritas. La construcción adicionalmente puede incluir una secuencia potenciadora 3′ de la secuencia de codificación. Las secuencias potenciadoras adecuadas se describen anteriormente con relación a la construcción de promotor quimérico.

En otro aspecto, la invención provee una construcción de ácido nucleico que comprende, o en algunas modalidades que consisten esencialmente de:

(i) una secuencia promotora;

(ii) una secuencia de codificación operablemente enlazada a la secuencia promotora (i) y;

(iii) una secuencia potenciadora 3′ de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación (ii);

en donde la secuencia potenciadora (iii) se deriva de la UTR 3′ de una secuencia HBsAg, o un UTR 3′ de una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, y la secuencia de codificación (ii) es heterólogos a la secuencia potenciadora.

La construcción puede incluir una secuencia líder no-traducida dichos como aquellas ya descritas con relación a la construcción promotora quimérica.

Típicamente la secuencia promotora (i) se deriva de una secuencia promotora viral o eucariótica. La secuencia promotora puede ser una secuencia promotora natural, un homólogo funcional de la secuencia natural o un fragmento funcional de cualquiera. Los promotores naturales adecuados incluyen, por ejemplo, el promotor temprano inmediato hCMV, el promotor del virus de Pseudorabia (PRV), o promotor del virus del sarcoma Rous (RSV). Preferiblemente el promotor natural comprende SEC ID NO:52 o SEC ID NO:53.

Una construcción promotora artificial, como el promotor quimérico descrito anteriormente, se puede utilizar, si el promotor es funcional.

Una secuencia promotora funcional es generalmente una que es capaz causar (incluyendo iniciar y regular) la trascripción de una secuencia de codificación operablemente enlazada en una célula hospedera adecuada.

Una secuencia promotora se puede probar para actividad promotora utilizando un ensayo de expresión de rutina. Los homólogos o fragmentos funcionales de una secuencia promotora natural típicamente proveen por lo menos 50%, por ejemplo, o al menos 60, 70, 80 o el 90% o la expresión provista por la secuencia natural en dicho ensayo.

Las secuencias de codificación adecuadas (ii) incluyen aquellas ya mencionadas con relación a la construcción promotora quimérica. Sin embargo, en el presente

aspecto, la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia promotora 3'. La secuencia promotora (iii) de la construcción se describió anteriormente. La presente construcción también incluye típicamente una secuencia poli A. Como es el caso en la construcción promotora quimérica, esta región poli A puede ser nativa para la secuencia de codificación (ii) o puede ser provista como componente poli A heterólogo en la construcción.

Una construcción de acuerdo con cualquier aspecto de la presente invención puede comprender una secuencia de péptido de señal. De esta forma, una construcción de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal que está operablemente enlazado a la secuencia de codificación. La secuencia de péptido de señal se inserta en un enlace operable con el promotor tal como el péptido de señal se expresa y facilita la secreción de un polipéptido codificado por la secuencia de codificación también operablemente enlazada con el promotor.

Típicamente una secuencia de péptido de señal codifica un péptido de 10 a 30 aminoácidos por ejemplo 15 a 20 aminoácidos. Por lo general los aminoácidos son predominantemente hidrofóbicos. En una situación típica, un péptido de señal activa una cadena de polipéptido en crecimiento que lleva el péptido de señal al retículo endoplásmico de la célula de expresión. El péptido de señal

se divide en el retículo endoplásmico, permitiendo la secreción del polipéptido a través del aparato Golgi.

Un péptido de señal para el uso en la invención puede comprender:

(i) una secuencia de péptido de señal natural;

(ii) una variante homóloga de (i) que retiene la actividad del péptido de señal; o

(iii) un fragmento de (i) o de (ii) que retiene la actividad de péptido de señal.

La secuencia (i) puede ser por ejemplo un péptido de señal activador de plasminógeno de tejido humano (hTPAsp) (GenBank L00141), el péptido de señal de aprotinina (GenBank AAD13685), el péptido de señal del extensina de tabaco (GenBank JU0465), o péptido de señal de lisozima del pollo (GenBank AF410481).

Un péptido de señal, adecuado para uso en la presente invención, es una que habilitará la secreción de proteínas heterólogas. Un péptido de señal funcional puede identificarse en un ensayo que compara el efecto del péptido de señal de prueba con el efecto de un péptido conocido, por ejemplo, el péptido de señal activador de plasminógeno de tejido humano (hTPAsP) y con el efecto de no tener ningún péptido de señal. El ensayo de expresión comparativo establecido a continuación se puede utilizar pero con la siguiente modificación. Los vectores de expresión de

secreción se construyen conteniendo el vector base con ya sea péptido de señal de prueba, hTPAsp o sin péptido de señal. Las secuencias de codificación para los polipéptidos despliegan sus péptidos de señal de existencia natural se insertan en los vectores y los vectores transformados en células hospederas de referencia. Preferiblemente las células son células HEK293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamífero. El medio de la célula se analiza para niveles de expresión de polipéptido. Un péptido funcional de señal habilita la secreción del polipéptido en nivel más alto que un vector que carece de un péptido de señal con al menos uno, preferiblemente dos polipéptidos. Típicamente, la secreción es 5% mayor, o preferiblemente 10% mayor o más, por ejemplo 20 o 50% mayor o más. Típicamente, los niveles de secreción son comparables con aquellos obtenidos utilizando hTPAsp. En algunos casos, cualquier incremento o disminución referida pueden ser vistos.

En una instancia preferida, el péptido de señal se selecciona del péptido de señal activador de plasminógeno de tejido humano (hTPAsp), péptido de señal de aprotinina, péptido de señal de extensina de tabaco, y de péptido de señal del lisozima del pollo.

Al permitir la secreción de la proteína codificada fuera de una célula de expresión puede tener un número de ventajas, particularmente cuando la proteína es un antígeno.

Por ejemplo, la secreción de antígeno incrementada podría permitir una mayor absorción del antígeno y respuesta a través de las células inmunes (macrófagos, células de Langerhan, células B, células T, etc.), habilitar la capacidad del antígeno para alcanzar la corriente sanguínea y las células de señal (citocinas), habilitar un antígeno para encontrar los ligandos celulares y efectuar una función (anticuerpos, toxinas tales como la toxina del cólera, *E.coli* LT) y participar en los procedimientos bioquímicos celulares normales (receptores celulares).

Una construcción de la invención puede estar en la forma de un plásmido. Una construcción de ácido nucleico de la invención puede estar en la forma de vector de expresión de plásmido. En una instancia preferida, una construcción de la invención puede ser una construcción de ADN. En instancias alternativas, la construcción puede ser una construcción del RNA o HAP.

El vector entonces puede incluir elementos adicionales, tales como un origen de replicación o genes del selector. Dicho elementos son conocidos en la técnica y pueden incluirse utilizando técnicas estándares. En una modalidad, el vector de plásmido tiene la secuencia en SEC ID NO:14. Alternativamente, la construcción se puede incluir en una construcción del vector viral.

En algunas modalidades, la construcción de ácido

nucleico de la invención puede comprender dos o a más promotores quiméricos definidos aquí. De esta forma, la construcción puede comprender una pluralidad de promotores quiméricos y en particular la construcción puede tener dos, tres, cuatro, cinco o más promotores quiméricos. Los promotores quiméricos preferiblemente estarán cada uno operablemente enlazados en forma separada al sitio de clonación para la inserción de una secuencia de codificación. De esta forma, la construcción puede expresar dos, tres, cuatro, cinco o más secuencias de codificación. Las secuencias de codificación expresadas pueden ser cualquiera de aquellas especificadas aquí. En una instancia preferida, la construcción tiene dos promotores quiméricos con cada uno teniendo una secuencia de codificación operablemente enlazada a ellos. En particular, los dos promotores se pueden transcribir lejos uno del otro. En otras modalidades, los promotores pueden ser transcritos uno hacia el otro. De esta forma, los promotores pueden estar en una orientación invertida o en algunos casos en la misma orientación.

En particular, las construcciones con dos promotores puede expresar las subunidades A y B de una toxina bacteriana de ribosilación ADP, incluyendo cualquiera de aquellas mencionadas aquí y preferiblemente una LTA y subunidad B. Sin embargo, las construcciones con los múltiples promotores pueden expresar cualquier combinación de

secuencias de codificación mencionadas aquí. En un aspecto preferido adicional, las construcciones con los múltiples promotores pueden expresar una pluralidad de antígenos de influenza, incluyendo combinaciones de cualquiera de los antígenos de influenza mencionados aquí. En otro aspecto preferido, una construcción puede expresar un antígeno de influenza pandémico, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica de ambos y uno o más de cualquiera de las secuencias de codificación mencionadas aquí.

En los casos en donde la construcción tiene múltiples promotores quiméricos cada uno puede comprender, o estar operablemente enlazado a, cualquiera de las secuencias mencionadas aquí. En una instancia particularmente preferida, el intrón heterólogo de uno o más de los promotores puede ser la secuencia del intrón A del gen de la insulina de rata. Uno o más de los promotores quiméricos también puede preferiblemente comprender la UTR 5' de HBVpre-S2. Uno o más de los promotores puede comprender la secuencia de poli adenilación del gen de beta globina del conejo.

En una instancia preferida, la construcción de ácido nucleico de la invención puede comprender dos secuencias promotoras quiméricas, cada secuencia promotora estando operablemente enlazada a un sitio de clonación que tiene una secuencia de codificación insertada en el mismo, en donde cada promotor quimérico comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal del hCMV.

Con la secuencia de codificación operablemente enlazada a un promotor quimérico que codifica una subunidad LTA y la secuencia de codificación enlazada a la otra codificación de una subunidad LTB. La construcción además puede expresar ambas subunidades. Preferiblemente:

- el intrón heterólogo de cada promotor es la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata;
- la secuencia que codifica cada subunidad LT está operablemente enlazada al UTR 5' de HBVpre-S2; y/o
- una secuencia de codificación LT que está operablemente enlazada a la secuencia de poliadenilación del gen de beta globina de conejo.

En una instancia especialmente preferida, uno o más de los elementos de los vectores pPJV7563 y/o pPJV1671 puede utilizarse en una construcción de ácido nucleico de la invención. Los fragmentos o variantes funcionales de dichos elementos se pueden utilizar. En particular, cualquiera de los elementos de pPJV1671 especificado en la Tabla 3, las

variantes funcionales de dichos elementos o los fragmentos funcionales de cualquiera se pueden utilizar. Similarmente, cualquiera de los elementos de pPJV7563 especificados en el Ejemplo 5, las variantes funcionales de dichos elementos o los fragmentos funcionales de cualquiera se pueden utilizar. Preferiblemente, las secuencias de uno o más de los elementos de pPJV7563 y/o pPJV1671 por sí mismos se pueden utilizar. En otra modalidad preferida, los elementos correspondientes de la construcción pPML7789 se pueden utilizar y la ubicación de éstos se indica en particular en la Figura 21 y en el listado de secuencias provistos aquí. En instancias preferidas adicionales, los elementos correspondientes a los vectores pPJV2012 y pPJV778 se pueden utilizar y en particular aquellos elementos indicados en las Tablas 6 y 8 se pueden utilizar. Los fragmentos y variantes funcionales de los elementos de los vectores pPML77895, pPJV2012 y pPJV7788 también se pueden utilizar en las construcciones de la invención.

En una instancia preferida, una construcción de la invención comprende:

(i) la secuencia del vector pPJV7563 provisto como SEC ID NO:14;

(ii) una secuencia con 60% de identidad de secuencia para la secuencia de (i), a parte de la inserción de la secuencia que codifica el antígeno de influenza, un

fragmento inmunogénico o variante inmunogénica en la secuencia de (i) o (ii) de tal forma que está operablemente enlazada al promotor quimérico. En una instancia preferida, una secuencia de codificación de dicha construcción codifica un antígeno HA, una variante inmunogénica del mismo o un fragmento inmunogénico de cualquiera.

En instancias preferidas adicionales de la invención una construcción es provista cuando el vector comprende la secuencia del vector pPJV1671 provisto como SEC ID NO:54 o una secuencia con 60% de identidad de secuencia del mismo. En otra instancia preferida, el vector comprende la secuencia del vector pPML7789 provisto como SEC ID NO:59 o una secuencia con 60% de identidad de secuencia del mismo.

En una instancia preferida, el promotor CMV, la secuencia líder no traducida, el intrón A de insulina de rata, la secuencia líder no traducida, el potenciador HBV y/o la secuencia poli A de conejo de pPJV7563 y/o pPJV1671 se utilizan o una variante o fragmento de dicha secuencia. En una instancia particularmente preferida el intrón A del intrón de la insulina de la rata y/o el potenciador de HBV de pPJV7563 y/o pPJV1671 se utilizan o el fragmento funcional o variante de dicha secuencia. En particularmente, tanto el intrón A de insulina de rata como el potenciador HBV se utilizan o un fragmento funcional o variante de dicha secuencia se emplea. En otra instancia preferida las

secuencias correspondientes de PML7789, pPJV2012, pPJV7788, fragmentos funcionales de dichas secuencias o variantes de dichas secuencias se pueden utilizar.

En instancias en donde la construcción codifica varios polipéptidos y particularmente antígenos, las secuencias particulares se pueden omitir para reducir el tamaño de la construcción. Por ejemplo, las construcciones pueden carecer de un potenciador y/o una secuencia líder no traducida, particularmente cuando tres, cuatro, cinco o más antígenos se codifican. En otras construcciones que codifican el mismo número de antígenos estas secuencias aún pueden estar presentes.

En una instancia particularmente preferida, el vector pPJV7563 del vector se utiliza para clonar la secuencia de codificación deseada en y en particular las secuencias de codificación para un antígeno tal como, por ejemplo, cualquiera de los antígenos mencionados aquí. En una instancia preferida un antígeno de influenza deseado, un fragmento o una variante del mismo se clona en el vector. Las modificaciones pueden en algunos casos hacerse a pPJV7563. Por ejemplo, el gen de resistencia a Canamicina se puede intercambiar por un gen alternativo y en particular un marcador seleccionable o clasificable alternativo. Cualquiera de las construcciones de ácido nucleico de la invención puede comprender marcadores seleccionables. La estructura del

plásmido pUC19 de pPJV7563 se puede modificar o reemplazar con una estructura de plásmido diferente. Los elementos específicos de pPJV7563 pueden, por ejemplo, intercambiarse con cualquier elemento que cumpla con la misma función y particular variantes funcionales o fragmentos de las secuencias en pP JV7563. En algunas instancias, pP JV7563 se pueden modificar a través del reemplazo de un elemento particular con cualquiera de los elementos referidos aquí que tienen la misma función que el elemento que se va a reemplazar. Similares modificaciones se pueden hacer a pPJV1671 cuando se está utilizando. Similares modificaciones también se pueden hacer a cualquiera de los vectores mencionados aquí y en particular pPML7789, pPJV2012 y pPJV7788. Las secuencias de codificación de pPML7789, pPJV2012 y pPJV7788 se pueden intercambiar por cualquiera de las secuencias de codificación mencionadas aquí. En el caso de pPJV2012 y pPJV7788 una o ambas secuencias de codificación de los vectores se pueden intercambiar.

En una modalidad preferida una construcción de ácido nucleico de la invención comprende:

(i) la secuencia del vector pPJV7563 provisto como SEC ID NO:14;

(ii) una secuencia con 60% de identidad de secuencia para la secuencia de (i), aparte de la inserción de las secuencias de codificación deseadas de tal forma que

están operablemente enlazadas al promotor quimérico. En una instancia preferida, las secuencias de codificación codifican un antígeno. Particularmente, una secuencia de codificación que codifica un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico o variante inmunogénica se inserta en la secuencia de (i) o de (ii) de tal forma que está operablemente enlazada al promotor quimérico.

La construcción puede tener 60% de identidad de secuencia a la secuencia (i) tomando en cuenta las secuencias de codificación insertadas o desechándolas. La construcción puede tener cualquiera de los valores de identidad de secuencia especificados aquí, y en particular, al menos 70%, preferiblemente por lo menos 80%, más preferiblemente por lo menos 90% y más preferiblemente por lo menos 95%. En una modalidad preferida la construcción es pPJV7563 a parte de la inserción de las secuencias de codificación.

Las secuencias adicionales se pueden adicionar a la secuencia de pPJV7563 para generar construcciones adicionales de la invención. Por ejemplo, unos o más promotores quiméricos de la invención se pueden agregar juntos con cualquiera de las secuencias mencionadas aquí las cuales pueden estar en un enlace operable a dicho promotor. El sitio de clonación de pPJV7563 se puede modificar para permitir la clonación de diferentes fragmentos de restricción y en particular la clonación de las secuencias de codificación

como fragmentos diferentes. Las modificaciones similares se pueden hacer a cualquiera de los vectores mencionados aquí y en particular a pPML7789, pPJV2012 y pPJV7788.

En otra instancia preferida, una construcción de la invención puede hacerse a través del reemplazo de algunas o todas las secuencias de codificación de pPJV1671 que codifica un antígeno con secuencias de codificación a diferentes antígenos. Otra vez, cualquiera de las modificaciones explicadas anteriormente con la relación pPJV7563 también puede hacerse para modificar pPJV1671. Dichas modificaciones también se pueden hacer a pPML7789. Las secuencias de codificación de pPJV2012 y pPJV7788 también se pueden se pueden reemplazar con otras secuencias de codificación deseadas y en particular aquellas que codifican un antígeno.

En otras instancias preferidas, la construcción de la invención comprende la:

- secuencia del vector pPJV1671 provisto como SEC ID NO:54 o una secuencia con 60% de identidad de la secuencia del mismo;
- secuencia del vector pPML7789 provisto como SEC ID NO:59 o una secuencia con 60% de identidad de secuencia del mismo;
- secuencia del vector pPJV2012 provisto por SEC ID NO:61 o una secuencia con 60% de identidad de secuencia del mismo;

- secuencia del vector pPJV7788 provisto por el SEC ID NO:62 o una secuencia con 60% de identidad de secuencia del mismo.

En dichas instancias, la construcción puede tener cualquiera de los porcentajes de identidades unas de secuencia especificados aquí, y en particular aquellos especificados con relación a pPJV7563.

Una construcción de la invención puede comprender cualquiera de los elementos especificados en las tablas aquí y en particular aquellas especificadas en las Tablas 3, 6 y 8. Los fragmentos funcionales de dichas secuencias y variantes de dichas secuencias y sus fragmentos también se pueden utilizar. En una instancia preferida, cuando el vector es un vector adyuvante uno o más de los elementos especificados por las Tablas 6 y/o 8 puede estar presentes o un fragmento o una variante de dichas secuencias.

La invención también provee un método para generar una construcción de la invención que comprende insertar las secuencias de codificación para un polipéptido y particularmente un antígeno en un vector de la invención que carece de dichas secuencias. Las secuencias de codificación pueden codificar cualquiera de los antígenos mencionados aquí. En una instancia preferida, la invención provee un método que comprende insertar las secuencias de codificación seleccionadas en pPJV7563, pPJV1671 o una de las versiones

modificadas de los vectores explicados aquí. Estas se pueden insertar en pPML7789, pPJV2012 y/o pPJV7788 y en particular pPML7789. En algunos casos, se puede inserta una secuencia de codificación adicional y/o una secuencia de codificación ya presente se puede reemplazar en una secuencia de codificación diferente.

La invención también provee una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazadas al promotor, en donde la construcción además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia de e-antígeno HBV o la secuencia de antígeno de tipo 2gD HSV, que está operablemente enlazada a secuencia de codificación y promotora que es heteróloga a la secuencia de codificación; y/o

(b) una secuencia potenciadora 3′ de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de un UTR 3′ de una secuencia HBsAg o un UTR 3′ de una secuencia de gen temprano inmediato CMV de simio, y la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadora 3′.

Los varios elementos del vector pueden ser cualquiera de aquellos especificados en la presente. En una instancia, la secuencia promotora (i) se selecciona de la secuencia promotora temprana inmediata hCMV, la secuencia

promotora del virus de Pseudorabia y la secuencia promotora del virus de sarcoma de Rous. En otra, la promotora es una de los promotores quiméricos explicados aquí. En otra instancia, la invención provee un promotor quimérico aislado purificado en donde el promotor quimérico es cualquiera de aquellos definidos aquí.

Una construcción de polinucleótido de la invención puede estar substancialmente libre de o asociada con las células o con el material celular. Puede estar en una forma substancialmente aislada, o puede estar en una forma substancialmente purificada, en cuyo caso generalmente comprenderá por lo menos el 90% por ejemplo al menos 95%, 98% o 99% del polinucleótido o la masa seca en la preparación.

Las moléculas de ácido nucleico presenten se pueden derivar para células hospederas adecuadas, para la expresión de un polinucleótido en enlace operable con el promotor. Preferiblemente, las células hospederas son células de mamífero, particularmente células humanas. Los métodos adecuados para distribuir ácidos nucleico a dichas células son conocidas en la técnica e incluyen, por ejemplo, transfección mediada por dextrina, precipitación de fosfato de calcio, electroporación y microinyección directa en el núcleo. De esta forma la invención provee una transformación de célula con un vector de la invención.

Como se describió anteriormente, una secuencia de codificación de ácido nucleico en una construcción puede codificar un polipéptido terapéutico relevante. Las construcciones presentes pueden por consiguiente utilizarse para la inmunización de ácido nucleico o terapia de gen utilizando protocolos de distribución de gen estándar. Los métodos adecuados para la distribución de gen son conocidos en la técnica, como se explican a continuación. Las moléculas de ácido nucleico se pueden distribuir ya sea directamente a un sujeto, o alternativamente, distribuidas *ex vivo* a células derivadas del sujeto a partir de los cual las células reimplantan en el sujeto. En una instancia preferida, las construcciones se distribuyen directamente al sujeto cuando el polipéptido codificado es un antígeno, particularmente un antígeno de influenza. Cualquiera de las rutas de distribución mencionadas aquí se pueden utilizar y en particular la distribución transdérmica. Las construcciones adyuvantes de la invención se pueden administrar para mejorar la respuesta inmune contra un antígeno y en particular contra un antígeno expresado de una construcción de la invención.

La invención también provee el uso de una construcción de ácido nucleico de la invención o una población de construcciones de ácido nucleico de la invención o partículas cubiertas de la invención en la fabricación de un medicamento para la inmunización de ácido nucleico. El

medicamento puede ser uno que se distribuye a través de inyección, distribución de partículas transdérmicas, inhalación, tópicamente, oralmente, intranasalmente o transmucosalmente. En una instancia preferida, el medicamento que se va a distribuir a través de inyección sin aguja.

Para uso en inmunización de ácido nucleico o terapia del gen, las construcciones de ácido nucleico se pueden formular como preparaciones farmacéuticas convencionales. Esto se puede hacer utilizando químicas y metodologías de formulación farmacéutica, que están disponibles para los expertos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones que contienen una o más secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, presentes en una forma de vector adecuado tal como un plásmido de ADN) se pueden combinar con uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proveer una preparación líquida. De esta forma también se proveen composiciones farmacéuticas que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención y un portador de excipiente farmacéuticamente aceptable. En una instancia preferida una composición farmacéutica puede comprender una pluralidad de construcciones de la invención o una población de construcciones de la invención o incluyendo cualquiera de aquellas mencionadas aquí.

Las sustancias auxiliares, tales como agentes de humectación o emulsificación, sustancias reguladoras de pH y

similares, pueden estar presentes en el excipiente o vehículo. Estos excipientes, vehículos y sustancias auxiliares son generalmente agentes farmacéuticos que pueden administrarse sin una indebida toxicidad y que, en el caso de composiciones de vacuna no inducirán una respuesta inmune en el individuo que recibe la composición. Los excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. Las sales farmacéuticamente aceptables se también se pueden incluir aquí, por ejemplo, sales de ácido mineral tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. También se prefiere, aunque no se requiere, que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que sirve como estabilizador, particularmente para moléculas de péptido, proteína u otras moléculas similares si se van a incluir en la composición. Ejemplos de portadores adecuadas que también pueden actuar como estabilizadores para los péptidos incluyen, sin limitación, grados de dextrosa farmacéutica, sacarosa, lactosa, el trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrina, y similares. Otro portadores adecuados incluyen, otra vez sin limitación, almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles

de alto peso molecular (PEG), y combinación de los mismos. Una discusión minuciosa de excipientes farmacéuticamente aceptables, vehículos y sustancias auxiliares está disponible en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. 1991), incorporada aquí por referencia.

Ciertos facilitadores de la absorción y/o expresión de ácido nucleico ("agentes de facilitación de transfección") también se pueden incluir en las composiciones, por ejemplo, facilitadores tales como bupivacaina, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos que facilitan la transfección tales como preparaciones liposómicas o lípidas que rutinariamente se utilizan para distribuir moléculas de ácido nucleico. Los liposomas aniónicos y neutrales están ampliamente disponibles y también son conocidos para la distribución de moléculas de ácido nucleico (ver, por ejemplo, *Liposomes: A Practical Approach*, (1990) RPC New Ed., IRL Press). Las preparaciones lípidas catiónicas también son vehículos bien conocidos para uso en la distribución de moléculas de ácido nucleico. Las preparaciones de lípido adecuadas incluyen DOTMA (N-[1 (2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-cloruro de trietilamonio), disponible bajo el nombre comercial de Lipofectin™, y DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3-(trimetilamonio)propano), ver, por ejemplo Feigner y otros. (1987) *Proc. Nactl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7416; Malone y otros. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6077-6081; Patentes de E. U. A. Nos. 5,283,185 y

5,527,928 y publicación internacional No. WO 90/11092, WO 91/15501 y WO 95/26356. Estos lípidos catiónicos pueden preferiblemente utilizarse en asociación con un lípido neutral, por ejemplo DOPE (fosfatiletanolamina de dioleilo). Aún otras composiciones que facilitan la transfección adicionales que se pueden agregar a las preparaciones de lípido o de liposomas anteriores incluye derivados de espermina (ver, por ejemplo, la Publicación Internacional No. WO 93/18759) y compuestos de permeabilización de membrana tales como GALA, y sales de bilis catiónica (ver, Publicación Internacional No. WO 93/19768).

Alternativamente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden encapsular, adsorber a, o asociar con, portadores en partículas. Los portadores en partículas adecuadas incluyen aquellos derivados de polímeros de metacrilato de polimetilo, así como micropartículas PLG derivadas de poli (lactida) y poli (lactida-co-glicolida). Ver, por ejemplo, Jeffery y otros (1993) *Pharm. Res.* 10:362-368. Otros sistemas y polímeros también se pueden utilizar, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, polihornitina, espermina, espermidina, así como conjugados de estas moléculas. En una modalidad preferida, las construcciones de la invención son precipitadas sobre portadores en la presencia de un agente de condensación de ácido nucleico y un agente de quelatación de un ión metálico.

Los agentes condensantes preferidos incluyen polímeros catiónicos, particularmente poliaminas, y en particular poliaminas y en particular una poliargina o una polilisina. En una instancia preferida la poliamina es $(Arg)_4$ o $(Arg)_6$. Se hace referencia a las técnicas explicadas en WO2004/208560 que se pueden utilizar para generar partículas portadoras cubiertas de la invención.

Una vez que se formulan las composiciones se pueden distribuir a un sujeto *in vivo* utilizando una variedad de rutas y técnicas conocidas. Por ejemplo, las preparaciones líquidas pueden ser provistas como una solución inyectable, suspensión o emulsión y administrarse a través de inyección parenteral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intravenosa utilizando una aguja y jeringa convencionales, o utilizando un sistema de inyección de chorro líquido. Las preparaciones líquidas también se pueden administrar tópicamente a la piel o tejido mucoso, o proveerse como aspersiones finamente divididas adecuada para administración respiratoria o pulmonar. Otros modos de administración incluyen la administración oral, supositorios, y las técnicas de distribución transdérmicas activas o pasivas.

Alternativamente, las composiciones se pueden administrar *ex vivo*, por ejemplo distribuirse y la reimplantación de las células transformadas en un sujeto son conocidas (por ejemplo, transfección mediada dextrina,

precipitación de fosfato de calcio, electroporación, y microinyección directa en el núcleo).

Las composiciones se administran a un sujeto en una cantidad que es compatible con la formulación de dosificación y que serán profiláctica y/o terapéuticamente efectivas. Una cantidad apropiada efectiva caerá en un intervalo relativamente amplio pero pueden fácilmente determinarse a través de un experto en la técnica por medio de ensayos de rutina. El "Physicians Desk Reference" y Goodman and Gilman´2 The Pharmacological Basis of Therapeutics" son útiles para los propósitos de determina la cantidad necesaria. Por ejemplo, se espera generalmente que una dosis efectiva del polinucleótido caerá dentro de una escala de aproximadamente 0.001 a 1000 µg, preferiblemente de 0.001 a 100 µg, más preferiblemente de 0.01 a 10.0 µg. En algunas instancias la dosis puede ser de 0.1 a 100 µg, preferiblemente de la 0.5 a 25 µg. En los casos en donde la dosis se administra a través de inyección sin aguja, la dosis puede en algunos casos estar en la forma de 0.1 a 25 µg, preferiblemente de 0.5 a 10 µg y preferiblemente de 1 a 5 µg. Particularmente, la dosis puede ser de 4 µg. En algunos casos, la dosis puede ser dada a través de una pluralidad de inyecciones sin aguja tales como, por ejemplo, en uno, dos, tres, cuatro o cinco inyecciones sin aguja.

En algunos casos después de una administración

inicial una administración subsiguiente de la construcción se puede llevar a cabo. En particular, después de una inmunización adicional a un sujeto se puede dar una inmunización de refortalecimiento. La inmunización de refortalecimiento puede ser, por ejemplo, una dosis seleccionable de cualquiera de las mencionadas aquí. La administración del sujeto puede, por ejemplo, ser al menos una semana, dos semanas, un mes, dos meses o seis meses después de la administración inicial.

En una instancia, una construcción de ácido nucleico de la invención se puede utilizar en conjunción con otra construcción de ácido nucleico. En un caso, la construcción de ácido nucleico puede ser una de aquellas descritas aquí para la expresión de un adyuvante y la otra construcción puede ser una construcción que codifica unos o más antígenos. En un caso preferido, ambas construcciones pueden utilizar los promotores quiméricos de la invención. Cuando se dan dos o más agentes aquí pueden en particular administrarse de manera separada, simultánea o secuencial.

En el caso en donde una construcción expresa un adyuvante y la otra un antígeno o antígenos, los antígenos pueden en particular estar en la forma de virus HSV, HPV, o hepatitis (particularmente el virus de hepatitis B). Los antígenos pueden en particular ser antígenos HSV ICPO, ICP4, ICP 22 y/ICP 27 y preferiblemente los cuatro. En un caso

especialmente preferido, los antígenos pueden ser un antígeno de influenza que incluye cualquiera de los mencionados aquí y en particular HA, NA y/o M2 y en particular HA y NA y especialmente HA. En los casos en donde antígenos se expresan, la construcción adyuvante en particular expresará LTA y/o LTB y en particular ambas. Cualquiera de las construcciones adyuvantes mencionadas aquí se puede utilizar simultánea, separada o secuencialmente con cualquiera de las construcciones que codifican un antígeno.

Cualquiera de las dos entidades de la invención se puede administrar por separado, secuencialmente o simultáneamente. Las dos construcciones se pueden administrar por separado, simultáneas o secuenciales. Las dos pueden administrarse en la misma o diferentes composiciones. En particular, cuando una construcción tiene un efecto adyuvante las dos se distribuirán de manera que el efecto del adyuvante se ve, que es la respuesta inmune generada será mayor y/o durante un período más largo que si el adyuvante no había sido administrado con el antígeno. En una instancia preferida, las dos construcciones se pueden distribuir en la misma composición, preferiblemente en las mismas partículas portadoras. En otros casos las partículas portadoras que llevan una construcción se pueden mezclar con partículas portadoras que llevan otra construcción. Cualquiera de dichos esquemas de administración se puede utilizar para cualquiera

de las combinaciones de una pluralidad de construcción explicadas aquí.

En una modalidad preferente, las construcciones de ácido nucleico de la invención se distribuyen a células objetivo utilizando la técnica de distribución mediada por partículas. Los métodos mediados por partículas para distribución de preparaciones de ácido nucleico son conocidos en la técnica. Por lo tanto, en una instancia preferida la invención provee partículas cubiertas que comprenden partículas portadoras cubiertas con una construcción de ácido nucleico de la invención o una población de construcciones de ácido nucleico de la invención. En particular, las partículas cubiertas son adecuadas para distribución desde un dispositivo de distribución de grado por partícula.

Las partículas para la distribución mediada por partícula se pueden formar a través del recubrimiento de las moléculas de ácido nucleico de la presente sobre partículas portadoras (por ejemplo, portadores centrales) utilizando una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Las partículas portadoras se seleccionan de materiales que tienen una densidad adecuada en la escala de tamaños de partícula típicamente utilizados para distribución intracelular de un dispositivo de distribución mediado por partícula. Las partículas portadoras típicamente tienen un diámetro de 0.1 a 5 µm, por ejemplo 0.5 a 3 µm, preferiblemente 1 a 2 µm. En

algunos casos, las partículas pueden tener un diámetro de 1 a 3 µm. El tamaño de partícula de portador óptimo, por supuesto, dependerá del diámetro de las células objetivo.

Las partículas portadoras usualmente se seleccionan de metales inertes. Los metales son inertes en que no están fisiológico activos. Para el propósito de la invención, pueden utilizarse por ejemplo hierro, cobalto, níquel, cobre, plata, cadmio, Hafnio, tantalio, tungsteno, platino, oro, y el acero inoxidable y en particular, partículas portadoras de tungsteno, oro, platino e iridio se pueden utilizar. Las partículas de tungsteno y oro. De esta forma, en una instancia preferida, la invención provee partículas portadoras cubiertas que son de oro o tungsteno. Las partículas de tungsteno están fácilmente disponibles en tamaños promedio de 0.5 a 2.0 µm de diámetro. Aunque dichas partículas tienen densidad óptima para uso en métodos de distribución de aceleración de partícula, y permiten un recubrimiento altamente eficiente con ADN, el tungsteno puede potencialmente ser tóxico para ciertos tipos de células. Las partículas del oro u oro microcristalino (por ejemplo polvo de oro A1570, disponible de Engelhard Corp., East Newark, NJ) también encontrarán uso con los métodos presentes. Las partículas del oro proveen una uniformidad en tamaño (disponibles de Alpha Chemicals en tamaños de partícula de 1-3 µm, o disponibles de Degussa, South Plainfield, NJ en un

intervalo de tamaños de partícula que incluyen 0.95 µm) y toxicidad reducida. El oro microcristalino provee una distribución de tamaño de partícula diverso, típicamente en la escala de 0.1-5 µm. Sin embargo, el área de superficie irregular del oro microcristalino provee un recubrimiento altamente eficiente con ácidos nucleicos.

Son conocidos un número de métodos y se han descrito para el recubrimiento o precipitación de ADN o ARN sobre partículas del oro o tungsteno. La mayor parte de dichos métodos generalmente combina una cantidad predeterminada de oro o de tungsteno con ADN del plásmido, $CaCl_2$, y espermidina. La solución resultante se somete a vórtice continuamente durante el procedimiento de recubrimiento para asegurar la uniformidad de la mezcla de reacción. Después de la precipitación de ácido nucleico, las partículas recubiertas se pueden transferir a membranas adecuadas y dejar secar antes de uso, recubrirse sobre superficies de un módulo de muestra o casete, o cargarse en un casete de distribución para uso en instrumentos de distribución mediados por una partícula particular.

Como alternativa, los polinucleótidos de la invención se pueden formular como composición en partículas. La formulación se puede llevar a cabo utilizando las químicas de formulación farmacéuticas estándares anteriormente descritas. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden

combinar con unos o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para proveer una composición adecuada. Las composiciones formuladas entonces se preparan como partículas utilizando técnicas estándares tales como a través de evaporación simple (secado por aire), secado al vacío, secado por aspersión, secado por congelamiento (liofilización), secado por aspersión congelamiento, recubrimiento por aspersión, precipitación, formulación de partícula de fluido supercrítica, y similares. Si se deseadas, las partículas resultantes se pueden densificar utilizando las técnicas descritas en la Publicación Internacional de Propiedad Común No. WO 97/48485, incorporada aquí por referencia.

Estos métodos se pueden utilizar para obtener partículas de ácido nucleico que tienen un tamaño en la escala de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 250 µm, preferiblemente de 10 aproximadamente 150 µm, y más preferiblemente de 20 a 60 µm; y una densidad de partícula en la escala de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 25 g/cm^3, y una densidad en volumen de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 3.0 g/cm^3, o mayor.

Una vez que se forman, las partículas comprenden las moléculas de ácido nucleico que se pueden empacar en dosificación de unidades individuales o recipientes multidosis. La invención por consiguiente también provee un

receptáculo de dosificación para un dispositivo de distribución mediado por partícula que comprende partículas cubiertas de la invención. Dichos recipientes pueden comprender un contenedor herméticamente sellado que encasilla una cantidad adecuada de partículas. Las partículas se pueden empacar como una formulación estéril, y el contenedor herméticamente sellado puede de esta forma diseñarse para conservar la esterilidad de la formulación hasta el uso en la distribución a un sujeto. Los contendores preferiblemente se adaptan para uso directo en un dispositivo de distribución mediado por partícula. Típicamente dichos contenedores toman la forma de cápsulas, bolsillos de aluminio, almohadillas, de casetes y similares. Los dispositivos de distribución de partícula también pueden ser provistos en una condición precargada conteniendo una dosificación adecuada de las partículas. El dispositivo precargado entonces puede preempacarse en un contenedor herméticamente sellado.

El recipiente en donde las partículas se empacan además puede marcarse para identificar la composición y proveer la información de dosificación relevante. Además, el contenedor se puede marcar con una noticia en la forma prescrita a través de una agencia gubernamental, por ejemplo, la administración de alimentos y fármacos, en donde la noticia indica la aprobación por la agencia bajo la ley federal de la fabricación, uso o de venta de la preparación

de ácido nucleico contenida ahí para administración humana.

La invención también provee un dispositivo de distribución mediado por partícula cargado con partículas cubiertas de la invención. Preferiblemente, el dispositivo de distribución es una jeringa sin aguja. Los dispositivos de aceleración de partícula, adecuados para la distribución mediada por partícula son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los dispositivos de pistola de gen actuales utilizan un explosivo, una descarga de explosivo, eléctrica o gaseosa para propulsar las partículas portadoras cubiertas hacia las células objetivo. Las partículas portadoras cubiertas pueden estar liberablemente unidas a una hoja portadora movible, o removiblemente unidas a la superficie a lo largo de la cual pasa una corriente de gas, levantando las partículas de superficie y acelerándolas hacia el objetivo. Un ejemplo del dispositivo de descarga gaseosa se describe en la Patente de E. U. A. No. 5,204,253. Un dispositivo de tipo explosivo se describe en la Patente de E. U. A. No. 4,945,050. Un ejemplo de un aparato de descarga eléctrico adecuado para uso aquí se describe en la Patente de E. U. A. No. 5,120,657. Otro aparato de descarga eléctrico se describe en la Patente de los E. U. A. No. 5,149,655. La descripción de todas estas patentes se incorpora aquí por referencia en su totalidad.

Las partículas también se pueden administrar utilizando un dispositivo de jeringa sin aguja, tal como

aquel descrito en la Patente de E. U. A. No. 5,630,796 de Bellhouse y otros ("the PowderJect® needleless syringe device") y las publicaciones internacionales Nos. WO 94/24263, WO 96/04947, WO 96/12513 y WO 96/20022, todas las cuales se incorporan aquí por referencia.

Los dispositivos tales como aquellos descritos en la Patente de E. U. A. 5,630,796 se pueden proveer como un instrumento en forma de pluma que contiene, en la orden lineal el movimiento de la parte superior a la inferior, un cilindro de gas, un casete o un paquete de la partícula, y una boquilla supersónica con un medio silenciador asociado. Las partículas son provistas dentro de un contenedor adecuado, por ejemplo, un casete formado por dos membranas de polímero sujetas a ruptura que están selladas por calor a un a un espaciador en forma de arandela para formar una unidad sellada autocontenida. Los materiales de membrana se pueden seleccionar para lograr un modo específico de abertura y presión de ráfaga que dicta las condiciones a las cuales el flujo supersónico se inicia.

En operación, el dispositivo se activa para liberar el gas comprimido del cilindro en una cámara de expansión dentro del dispositivo. El gas liberado hace contacto con el casete de partículas y, cuando se forma suficiente presión, repentinamente fisura la membrana del casete intercambiando las partículas en la boquilla supersónica para la

distribución subsecuente. La boquilla está diseña para lograr una velocidad específica de gas y un patrón de flujo para distribuir una cantidad de partículas a una superficie objetivo del área predefinida. El silenciador se utiliza para atenuar el ruido producido por el flujo del gas supersónico.

El sistema de distribución descrito en la Publicación Internacional No. 96/20022 también utiliza la energía de una fuente de gas comprimida para acelerar y distribuir composiciones en polvo. Sin embargo, se distingue del sistema de la Patente de E. U. A. No. 5,630,796 en su uso de una onda de choque en lugar de un flujo de gas para acelerar las partículas. Más particularmente, surge una presión instantánea provista por una onda de choque generada por detrás del domo flexible que por golpear la parte trasera del domo, causando una eversión continua del domo flexible en la dirección de la superficie objetivo. Esta eversión repentina lanza con fuerza una composición en polvo (la cual está localizada en la parte exterior del domo) a una velocidad suficiente, de esta forma momentánea, para penetrar el tejido objetivo, por ejemplo, el tejido mucoso oral. La composición en polvo se libera en el punto de la eversión del domo completo. El domo también sirve para completamente contener el flujo de gas de alta presión el cual por consiguiente no se pone en contacto con el tejido. Debido a que el gas no se libera durante esta operación de

distribución, el sistema es inherentemente silencioso. Este diseño se puede utilizar en otras aplicaciones encasilladas o sensibles por ejemplo, para distribuir partículas a sitios quirúrgicos mínimamente invasivos.

Las partículas se pueden distribuir *in vivo* directamente a un sujeto, o *ex vivo* a células tomadas de un sujeto, las células transformadas después siendo reimplantadas el sujeto. Para la distribución *in vivo*, la inyección de la partícula es típicamente subcutánea, epidérmica, intradérmica, intramucosa (por ejemplo, nasalmente, rectalmente y/o vaginalmente), intraperitonealmente, intravenosamente, oralmente o intramuscular. Preferiblemente, la distribución es para diferenciar células terminalmente; sin embargo, las partículas también se pueden distribuir para las células no diferencias o parcialmente diferenciadas tales como células de tallo de fibroblastos de sangre y piel. Más preferiblemente, la distribución es para células epidérmicas.

Las partículas se administran a un sujeto en una forma compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad que será profiláctica y/o terapéuticamente efectiva. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" de la presentes composición en partículas será suficiente para causar el tratamiento o prevención de la enfermedad o síntomas de la condición, y caerá en un rango ampliamente relativo que puede

determinarse a través de ensayos de rutina. Generalmente las partículas se distribuyen en una cantidad de 0.001 a 1000 µg, más preferiblemente 0.01 a 10.0 µg de ácido nucleico por dosis. Sin embargo, la cantidad exacta necesaria variará dependiendo de la edad y condición general del individuo que se está tratado y de la secuencia de nucleótido particular seleccionada, así como otros factores. Una cantidad efectiva apropiada puede fácilmente determinarse a través de la prueba clínica. El "Physicians Desk Referente" y "Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics" son útiles para los propósitos de determinar la cantidad necesaria.

Ensayos

Ensayo de expresión comparativo

Una prueba adecuada para la utilidad del elemento determina el efecto que el elemento tiene sobre la expresión de un polipéptido. En una instancia preferida el péptido puede ser un antígeno de influenza, una variante del mismo o fragmento de cualquiera. La base de comparación para la prueba de utilidad de los elementos es un "vector base", generalmente (a menos que se indique lo contrario) un plásmido con un promotor hCMV, un exón 1 hCMV, 9 base del exón 2 hCMV, la UTR 5' de HBV preS2 y la región de poliadenilación de beta globina de conejo, colocados para conducir la expresión de una secuencia de codificación.

Típicamente, el vector base es pPJV7384, pPJV7401, pPJV7450 o pPJV7533. En algunas instancias, cualquiera de los vectores mencionados aquí con los elementos anteriormente mencionados se pueden utilizar como un vector base. En una instancia, se puede utilizar pPJV1671 como vector base. También se pueden utilizar pPJV2012, pPJV7788 y pPML7789 como vectores base.

El vector base, los intrones heterólogos y los UTR 3' se adicionan, o las secuencias promotoras, exones, UTR 5' y los sitios Poli A se intercambian en los vectores base para crear los vectores de expresión de prueba. Cualquiera de los elementos de los vectores explicados aquí se puede intercambiar con una secuencia de prueba y compararse con una secuencia base. De esta forma, las variantes o fragmentos funcionales se pueden probar.

Los vectores base y los vectores de prueba se transforman en células hospederas adecuadas y las células se analizan para los niveles de expresión del polipéptido. Preferiblemente se utilizan células hospederas de mamífero. Las células adecuadas incluyen las células HEK 293T, CHO, HeLa, BHK, 3T3 o COS de mamífero. En algunas instancias pueden utilizar las células SSC15 o B16.

Típicamente, un elemento funcional causa la expresión que es comparable con el vector base, por ejemplo por lo menos el mismo que o mayor. Preferiblemente la expresión se prueba en más de un tipo de célula y con más de

una secuencia de codificación. En algunas instancias, un elemento funcional puede causar la expresión que es ligeramente menor que el vector base tal como, por ejemplo, por lo menos 25%, particularmente por lo menos 50%, preferiblemente por lo menos 60%, más preferiblemente por lo menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente por lo menos 90% de la expresión del vector base. Típicamente, una variante o un fragmento de un elemento particular aún pueden considerarse para representar una variante o fragmento funcional de un elemento particular si muestra dichos niveles de expresión. Sin embargo, las variantes y fragmentos funcionales preferiblemente darán origen a expresiones más altas que el vector base como se explicó anteriormente. El incremento del porcentaje puede, por ejemplo, ser cualquier porcentaje mencionado anteriormente.

Se proveen los protocolos experimentales adecuados, por ejemplo en los ejemplos 1 a 18 siguientes.

Ensayo de inmunogenicidad comparativo

Cuando el polipéptido se va a expresar en un antígeno, puede llevar a cabo una prueba adicional para identificar los elementos de construcción funcionales o particularmente preferidos. En particular, dicha prueba se puede llevar a cabo cuando el antígeno es, por ejemplo, un antígeno de influenza, un fragmento del mismo o variante de

cualquiera. En el ensayo, el efecto de un elemento sobre la respuesta inmune se determina después de la distribución de un vector de expresión a un organismo de prueba. Los niveles del anticuerpo contra el antígeno son la forma más fácil de juzgar la respuesta inmune. Los grupos de ratones se vacunaron con vectores base o vectores de prueba construidos como anteriormente. El suero se recolectó después de una cantidad apropiada de tiempo y se analizó para niveles de anticuerpo.

Este experimento se llevó a cabo dos veces, y los niveles de anticuerpo de todos los grupos en ambos experimentos se graficaron. Los elementos funcionales típicamente dieron origen a por lo menos concentraciones de anticuerpo altas o tan altas en ambos experimentos para un antígeno particular que el vector base. Preferiblemente, el resultado se verá con más de un antígeno para demostrar el espíritu de utilidad del (de los) elemento(s) en ese panel de expresión. En algunas instancias, un elemento funcional puede dar origen a una concentración de anticuerpo que es ligeramente menor que la vista en el vector base, tal como, por ejemplo, al menos 25%, en particular al menos 50%, preferiblemente al lo menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y aún más de preferencia al menos el 90% de la concentración del anticuerpo vista con el

vector base. Típicamente, una variante o un fragmento de un elemento particular aún pueden considerarse que representa una variante o un fragmento funcional de un elemento particular si da origen a dicha concentración del anticuerpo. Sin embargo, las variantes y fragmentos funcionales preferiblemente darán origen a concentraciones más altas que las del vector base como se explicó anteriormente. Los incrementos del porcentaje pueden, por ejemplo, ser cualquiera de los porcentajes mencionados anteriormente.

Los vectores adyuvantes también se pueden evaluar a través de la comparación de un vector adyuvante de prueba con un adyuvante estándar, ambos siendo administrados con el mismo antígeno. Una comparación del efecto adyuvante de ambos vectores se hace utilizando el antígeno administrado solo como control. Cualquiera de los vectores adyuvantes mencionados aquí puede utilizarse como un estándar. El incremento o disminución del porcentaje en el efecto del adyuvante puede ser cualquiera de aquellos niveles mencionados anteriormente.

Los protocolos experimentales adecuados son provistos por ejemplo, en el Ejemplo 14 siguiente. Los protocolos adecuados también se describen en los Ejemplos 15 a 18 siguientes.

C. Experimental

A continuación están los ejemplos de modalidad específicas para llevar a cabo la presente invención. Los ejemplos se ofrecen para propósitos ilustrativos solamente, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en ninguna forma.

Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc.), pero algún error experimental o desviación deberá, por supuesto, permitirse.

Métodos

Condiciones PCR Estándar

Las condiciones PCR estándar utilizadas para la construcción de vectores fueron como sigue: 1x de regulador de pH central de PCR con 1.5 mM de $MgCl_2$ (Promega Corporation, Madison, WI), 0.400 µM de cada uno de los cebadores, 200 µM de cada dNTP (USB, inc., Cleveland, OH), 2.5 µ de polimerasa Taq (Promega Corporation, Madison, WI), 1.0 ng de ADN de plantilla, agua para 100 µl, y una cubierta de aceite mineral (Aldrich Chemical, Inc., Milwaukee, WI). El termociclador PTC-200 (MJ Research, inc., Waltham, MA) se programó para correr la siguiente rutina: 4'@95°C, 30 ciclos de (1'@95°C/1'15"@55°C/1'@72°C), 10'@72°C, 4°C fijo). Los productos de amplificación se removieron de la reacción PCR a través del uso de equipo de purificación QIAquickâPCR (Qiagen

inc., Valencia, CA) antes de cortarlo con enzimas de restricción (New England Biolabs, Beverly, MA).

Todos los productos PCR se secuenciaron después de la clonación para asegurar la fidelidad de la amplificación.

Ejemplo 1. Construcción de los paneles del vector del antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg)

Se construyeron un número de vectores de expresión de plásmido para la expresión de HBsAg.

Materiales de partida

(i) pWRG7128 (Roy, M, y otros *Vaccine* (2001) 19: 764-778), que contiene la secuencia promotora temprana inmediata del hCMV, el primer exón, el primer intrón, y un segundo exón parcial del gen temprano inmediato principal hCMV, la secuencia de codificación HBsAg con regiones de flanqueo (HBV preS2 5'UTR derivado de la secuencia y el elemento de respuesta post-transcripcional 3') y la región de poliadenilación de hormona de crecimiento de bovino (BGHpA)

(ii) pPJV7284, un derivado de pWRG7128 que intercambia la región del poliadenilación de globina de conejo (RBGpA) para BGHpA.

(a) pPJV7384 (CMV (no intrón), HBV preS2 5'UTR y RBGpA)

pWRG7128 se amplificó con PCR JF93 (SEC ID NO:15) y F110 (SEC ID NO: 16), utilizando condiciones estándares y cortando con *Sal*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto

316

conteniendo el promotor CMV, la secuencia del exón 1 y parte del exón 2. pAM6 (ATCC, Mannassas, VA) se cortó con *Bam*H1 y *Bst*X1 para aislar un fragmento del inserto que contuvo 5'-UTR de HBsAg, y aproximadamente 70% de la región de codificación HBsAg. pJV7284 se cortó con *Sal*1 y *Bst*X1 para generar un fragmento del vector dentro del cual los dos fragmentos de inserto se ligaron, resultando pJV7293.

pWRG7128 se amplificó con PCR con los cebadores GW1 (SEC ID NO:17) y JF254 (SEC ID NO:18) y se cortó con *Bst*X1 y *Bgl*2 para aislar un fragmento del inserto que contuvo el extremo 3' de la región de codificación HBsAg. pPJV7293 se cortó con *Bst*X1 y *Bgl*2 para generar un fragmento del vector dentro del cual el fragmento de inserto se ligó, dando como resultado el vector pPJV7384.

(b) pPJV7382 (CMV (no intrón), HBsAg 3' UTR, HBV preS2 5' UTR y RBGpA)

pPJV7293 se cortó con *Xho*1 y *Xba*1 para generar un fragmento del inserto conteniendo el promotor CMV/exones y la UTR 5' con el extremo 5' de la secuencia de codificación HBsAg. pWRG7128 se cortó con *Xba*1 y *Bcl*1 para generar un fragmento de inserto conteniendo la mayor parte de la secuencia de codificación HBsAg, y la UTR 3'. pPJV7284 se cortó con *Xho*1 y *Bgl*2 para generar el fragmento de vector dentro del cual los dos fragmentos de inserto se ligaron, resultando pPJV7382.

317

(c) pPJV7389 (CMV (RIA), HBsAg 3' UTR, HBV preS2 5' UTR y RBGpA)

El intrón de insulina de rata A (RIA) se amplificó con PCR del plásmido p5'rIns con los cebadores GW150 (SEC ID NO:19) y JF255 (SEC ID NO:20). El producto PCR se cortó con *Bam*H1 y se insertó en *Bam*H1 linearizado pPJV7382, dando como resultado pPJV7389.

(d) pPJV7387 (CMV (RIA), HBV preS2 5' UTR y RBGpA)

pPJV7384 se cortó con *Bst*X1 y *Eco*R1 para generar un fragmento de inserto conteniendo el extremo 3' de la región de codificación HBsAg, y RBGpA. pPJV7389 se cortó con *Bst*X1 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7387.

Ejemplo 2. Construcción de los paneles de vector del antígeno de glicoproteína D de virus simple de herpes (HSVgD)

Se construyeron un número de vectores de expresión de plásmido para la expresión de HSVgD.

Materiales de partida

(a) pPJV7334, un derivado de pWRG7284 (pPJV 7284) que reemplaza la secuencia de codificación HBsAg con un *Nhe*1 en marco directamente en dirección 3´ del codón de iniciación ATG, seguido sobre un fragmento circular con un *Bam*H1 inmediatamente 5' del HBV Enh (Potenciador).

(b) pWRG7202, un derivado de pGem3Z (Promega) con

un fragmento circular que permite la fusión de una secuencia de codificación al péptido de señal del activador de plasminógeno de tejido humano (TPA) en dirección 3´ de un sitio *Nhe*1.

(a) pPJV7392 (CMV(intrón nativo), HBsAg 3′ UTR, HBsAg 5′ UTR y RBGEA)

La región de codificación para HSV2 gD se amplificó por PCR de una existencia de ADN viral (Advance Biotech, Inc., Columbia, MD) utilizando los cebadores DS1 (SEC ID NO:21) y DA1 (SEC ID NO:22) y se cortó con *Neh*1 y *EcoR*1 para generar un fragmento de inserto. pWRG7202 se cortó con *Nhe*1 y *Eco*R1 para generar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7391.

pPJV7391 se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de inserto conteniendo la secuencia de codificación HSV2 gD. pPJV7334 se cortó con *Nhe*1 y *Bam*H1 para generar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7392. Este vector consiste de los siguientes elementos de expresión: la secuencia promotora temprana inmediata hCMV, el primer exón, el primer intrón, y un segundo exón parcial, del gen temprano inmediato principal hCMV, la UTR 5′ de HBsAg, la secuencia de codificación para el gen gD HSV2, El UTR 3′ de HBsAg, y RBGpA.

(b) pPJV7399 (CMV(no intrón), HBsAg 3′ UTR HBsAg

5'UTR y RBGpA)

Se construyó una versión sin intrón de pPJV7392 como sigue. pPJV7384 se cortó con *HindIII* y *Nde*1 para aislar un fragmento de inserto conteniendo los extremos 5' del gen de resistencia a canamicina y promotor CMV. pPJV7384 se cortó con *Nde*1 y *Ssp*1 para aislar un fragmento del inserto conteniendo el extremo 3' del promotor CMV, el exón CMV 1/2 y el extremo 5' de la UTR 5' de HBsAg. Estos fragmentos de inserto después se insertaron en pPJV7392 a partir de lo cual el fragmento *Hind*3-*Ssp*1 se removió, dando como resultado pPJV7399.

(c) pPJV7400 (CMV(RIA), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5' UTR y RBGpA)

Se construyó una versión RIA de pPJV7392 como sigue. pPJV7384 se cortó con *HindIII* y *Nde*1 para aislar un fragmento de inserto conteniendo los extremos 5' del gen de resistencia a canamicina y el promotor CMV. pPJV7387 se cortó con *Nde*1 y *Ssp*1 para aislar un fragmento de inserto conteniendo el extremo 3' del promotor CMV, el exón 1/2 CMV (parcial), RIA, y el extremo 5' de la UTR 5' de HBsAg. Estos fragmentos de inserto se insertaron en pPJV7392 a partir de lo cual el fragmento *Hind*3-*Ssp*1 se removió, dando como resultado pPJV7400.

(d) pPJV7401 (CMV(no intrón), HBsAg 5'UTR y RBGpA)

Se construyó una versión sin UTR 3' de pPJV7399,

como sigue. pPJV7391 se cortó con *Bsp*120I y *Bgl*2 para aislar un fragmento de inserto conteniendo el extremo 3' del gen HSV2 gD. pPJV7284 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar la señal RBGpA. Estos fragmentos de inserto se insertaron en pPJV7399 a partir de lo cual el fragmento *Bsp*120I-*Eco*R1 se removió, dando como resultado pPJV7401.

(e) pPJV7402 (CMV(RIA), HBsAg 5' UTR y RBGpA)

Se construyó una versión sin UTR 3' de PJV7400 como sigue. pPJV7391 se cortó con *Bsp*120I y *Bgl*2 para aislar el fragmento de inserto conteniendo el extremo 3' del gen HSV2 gD. pPJV7284 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar la señal RBGpA. Estos fragmentos de inserto se ligaron en pPJV7400 a partir de lo cual el fragmento *Bsp*120I-*Eco*R1 se removió, dando como resultado pPJV7402.

Ejemplo 3. Construcción de los paneles del vector del antígeno Flu M2

(a) pPJV7450 (CMV(no intrón), HBsAg 5' UTR y RBGpA

Se amplificó por PCR la región de codificación para Flu M2 del plásmido pFL-M2 (Joel Haynes, pPJV) utilizando los cebadores JF301 (SEC ID NO:23) y JF302 (SEC ID NO:24) y se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de inserto. pPJV7401 se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7450.

(b) pPJV7452 (CMV(no intrón), HBsAg 3' UTR y RBGpA)

Se amplificó por PCR un fragmento UTR 3' de pPJV7389 con los cebadores JF84 (SEC ID NO:25) y JF225 (SEC ID NO:26) se cortó *Bsp*120I, se rellenó con polimerasa de ADN T4, y se enlazó con los enlazadores *Bgl*2 (cat# 1036, New England Biolabs). El fragmento después se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento de inserto conteniendo la UTR 3' de la región HBsAg y RBGpA. pPJV7450 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, resultando en pPJV7452.

(c) pPJV7458 (CMV(RIA) HBsAg 5' UTR y RBGpA)

Se construyó una versión de pPJV7450 conteniendo el RIA como sigue: pPJV7389 se cortó con *Bam*H1 para aislar el fragmento de inserto conteniendo RIA. pPJV7450 se cortó con *Bam*H1 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento de inserto se ligó, resultando en pPJV7458.

(d) pPJV7468 (CMV(RIA), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5' UTR y RBGpA)

Se construyó una versión de pPJV7458 conteniendo la UTR 3' de HBsAg como sigue: pPJV7452 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para producir un fragmento de inserto conteniendo la UTR 3' HBsAg y RBGpA. pPJV7458 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, resultando pPJV7468.

322

Ejemplo 4. Construcción de los paneles del vector Beta-gal

(a) pPJV7488 (CMV(no intrón), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5' UTR y RBGpA)

Se amplificó por PCR CMV-beta (Clontech) con los cebadores JF335 (SEC ID NO:27) y JF336 (SEC ID NO:28) y se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para aislar un fragmento del inserto de codificación para beta-galactosidasa. pPJV7452 se cortó con *Nhe*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del insertó se ligó, dando como resultado pPJV7488.

(b) pPJV7S33 (CMV(no intrón), HBsAg 5' UTR y RBGpA)

pPJV7450 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento del inserto conteniendo RBGpA. pPJV7488 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento de inserto se ligó, resultando pPJV7533.

(c) pPJV7551 (CMV(RIA/NheI), HBsAg 3' UTR, HBsAg 5' UTR y RBGpA)

pPJV7530 (ver Ejemplo 5) se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento del inserto conteniendo el promotor CMV a través de RIA. pPJV7488 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para generar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, resultando pPJV7551.

(d) pPJV7SS2 (CMV(RIA/*Nhel*. HBsAg 5'UTR y RBGpA)

323

pPJV7530 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento del inserto conteniendo el promotor CMV a través de RIA. pPJV7533 con *Xho*1 y *Bam*H1 para generar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, resultando pPJV7552.

Ejemplo 5. Construcción de la expresión de pPJV (pPJV7563)

(a) PJV7496

pPJV7389 se amplificó a través de PCR con los cebadores JF357 (SEC ID NO: 29) y JF365 (SEC ID NO: 30), se trató con polimerasa de ADN T4 para despuntar los extremos, y se cortó con *Sal*1 para aislar un fragmento del inserto que codifica la resistencia a canamicina. pPJV7389 se cortó con *Ava*1, se trató con polimerasa de ADN T4 para despuntar los extremos, y se cortó con *Sal*1 para aislar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado PJV7496.

(b) pPJV7530

PJV7389 se amplificó a través de PCR con los cebadores JF393 (SEC ID NO: 31) y JF406 (SEC ID NO: 32) y se cortó con *Bgl*2 y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto conteniendo el RIA desprovisto de un sitio *Nhe*1 interno. pPJV7496 se cortó con *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7530.

(c) pPJV7549

pPJV7468 se cortó con *BamH1* y *Eco*R5 para aislar un fragmento de inserto conteniendo M2 y parte de HBV 3'ENH. pPJV7530 se cortó con *BamH1* y *Eco*R5 para preparar el fragmento de vector en el cual el fragmento del inserto se ligó, resultando pPJV7549.

(d) pPJV7563

Los cebadores JF256 (SEC ID NO:33) y JF257 (SEC ID NO:34) se templaron para preparar un fragmento de inserto que consiste de un sitio de clonación múltiple. pP JV7549 se cortó con Nhel y Bgl2 para preparar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, resultando pPJV7563. Un mapa de plásmido pPJV7563 se provee en la Figura 12. La composición base para el plásmido pPJV7563 es provista en la Figura 13. Los componentes y su posición en el plásmido pPJV7563 son como sigue:

1-44 Las secuencias del Transposon 903

45-860 Secuencia de codificación de resistencia a canamicina del Transposon 903

861-896 Secuencias del Transposon 903

897-902 Sitio Sall

903-1587 Promotor CMV

1588-1718 Secuencia líder no traducida del gen temprano inmediato de CMV

1719-1724 La fusión de las enzimas de restricción

325

BamH1 y de BglII

1725-1857 El intrón A de insulina de rata

1858-1863 Sitio BamH1

1864-1984 Líder no traducido 5′ del antígeno de superficie HBV

1985-1993 Codón de inicio sintético/sitio de clonación Nhe1

1994-2011 Sitios de clonación sintéticos

2012-2544 potenciador HBV

2545-2555 Secuencia del vector Old. Ningún acierto contra la base de datos NCBI

2556-2686 Región de poliadenilación de beta globina de conejo

2687-3759 Secuencia del vector pUC19

Ejemplo 6. Construcción de los Paneles de Expresión del Péptido de la Señal Utilizando Fosfatasa alcalina secretada de humano (SEAP) y el fragmento IgG Fc humano (hFc) como antígenos de modelo

(i) pPJV7507 (hTPAsp y SEAP)

Se amplificó a través de PCR pSEAP básico (Clontech) con los cebadores JF320 (SEC ID NO:35) y JF321 (SEC ID NO:36) después se cortó con *Nhe*1 y *Bgl2* para aislar un fragmento de inserto que consiste del fragmento SEAP humano. pPJV7079 (Macklin, y otros)se cortó con *Nhe*1 y *Bgl2* para preparar un fragmento de vector dentro del cual el

fragmento de inserto se ligó, resultando en pPJV7507.

(ii) pP JV7508 (hTPAsp y hFc)

El ADN humano se amplificó a través de PCR con los cebadores JF386 (SEC ID NO:37) y FcAS (SEC ID NO:38) después se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para aislar un fragmento del inserto que consiste del fragmento IgG Fc humano. pP JV7079 se cortó con *Nhe1* y *Bgl2* para preparar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7508.

(iii) Preparación de la Secuencia de Codificación de Péptido de Señal de Aprotinina

El oligo sintético JF354 (SEC ID NO:39) se amplificó por PCR con los cebadores JF355 (SEC ID NO:40) y JF356 (SEC ID NO:41) para generar la secuencia de codificación para el péptido de señal de aprotinina.

(iv) Preparación de la Secuencia de Codificación de Péptido de Señal de Extensina de Tabaco

El oligo sintético JF348 (SEC ID NO:42) se amplificó por PCR con los cebadores JF349 (SEC ID NO:43) y JF350 (SEC ID NO:44) para generar la secuencia de codificación para el péptido de señal de extensina de tabaco.

(v) Preparación de la Secuencia de Codificación de Péptido de Señal de Lisozima de Pollo

El oligo sintético JF351 (SEC ID NO:45) se amplificó por PCR con los cebadores JF352 (SEC ID NO:46) y

JF353 (SEC ID NO:47) para generar la secuencia de codificación para el péptido de señal de lisozima de pollo.

(a) Paneles de péptido de señal del antígeno Flu M2

pPJV7499 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA. aprotinina s.p.)

PJV7497 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, extensina de tabaco s.p.)

PPJV7500 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR RBGpA lisozima de pollo s.p.)

Las secuencias de codificación para los péptidos de señal se cortaron con *Spe*1 y *Nhe*1 para aislar los fragmentos de inserto. pPJV7450 se cortó con *Nhe*1 para preparar un fragmento de vector en el cual los fragmentos de inserto se ligaron, dando como resultado pPJV7499 (aprotinina), pPJV7497 (extensina de tabaco), y pPJV7500 (lisozima de pollo).

(b) Paneles de Péptido de señal SEAP

pPJV7513 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, aprotinina s.p.)

pP JV7512 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, extensina de tabaco sp.)

pPJV7510 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, lisosima de pollo s.p.)

pPJV7499, 7497, y 7500 se cortaron con *Xho*1 y *Nhe*1 para aislar un fragmento de inserto que consistiendo del

328

promotor CMV a través de la secuencia de codificación del péptido de señal de los plásmidos. pPJV7507 se cortó con *Xho*1 y *Nhe1* para preparar un fragmento del vector dentro del cual los fragmentos de inserto se ligaron, dando como resultado pPJV7513 (aprotinina), pPJV7512 (extensina de tabaco), y pPJV7510 (lisozima de pollo).

(c) Paneles del péptido de señal hFc

pPJV7524 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, aprotinina s.p.)

pP JV7525 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, extensina de tabaco sp.)

pPJV7526 (CMV (no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, lisosima de pollo s.p.)

pPJV7499, 7497, y 7500 se cortaron con *Xho*1 y *Nhe*1 para aislar un fragmento de inserto que consistiendo del promotor CMV a través de la secuencia de codificación del péptido de señal de los plásmidos. pPJV7508 se cortó con *Xho*1 y *Nhe1* para preparar un fragmento del vector dentro del cual los fragmentos de inserto se ligaron, dando como resultado pPJV7524 (aprotinina), pPJV7525 (extensina de tabaco), y pPJV7526(lisozima de pollo).

Ejemplo 7. Construcción de los paneles de fosfatasa alcalina secretada humana (SEAP)

(a) pPJV7531 (CMV no intrón), HbsAg 5'UTR, RBGpA, lisosima de pollo s.p.)

pPJV7510 se cortó con *Sal*1 y *Bgl*2 para aislar un

329

fragmento del inserto conteniendo el promotor CMV a través del péptido de señal del lisozima. pPJV7450 se cortó con *Sal*1 y *Bgl*2 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7531.

(b) pPJV7554 (CMV(RIA/*Nhe*I), HbsAg 5'UTR, RBGpA, lisosima de pollo s.p.)

pPJV7530 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento del inserto conteniendo el promotor CMV a través de RIA. pPJV7531 se cortó con *Xho*1 y *Bam*H1 para generar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7554.

(c) pPJV7568 (CMV no intrón), HBsAg 3'UTR, HbsAg 5'UTR, RBGpA, lisosima de pollo s.p.)

pPJV7563 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento de inserto conteniendo la UTR 3' HBV y RBGpA. pPJV7531 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*Rl para generar un fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7568.

(d) pPJV7572 (CMV(RIA/*Nhe*I), HBsAg 3'UTR, HbsAg 5'UTR, RBGpA, lisosima de pollo s.p.)

PJV7563 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*R1 para aislar un fragmento del inserto conteniendo UTR 3' de HBV y RBGpA. pPJV7554 se cortó con *Bgl*2 y *Eco*Rl para generar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado pPJV7572.

Ejemplo 8. Construcción de los Vectores Beta-gal y HBsAg Utilizando los intrones de queratina de pollo y actinia cardiaca de pollo

(a) pPJV7557 (Beta-gal, CMV (cA intrón), HbsAg 3'UTR, HbsAg 5'UTR y RBGpA)

El ADN de pollo se amplificó a través de PCR con los cebadores JF430 (SEC ID NO:48) y JF442 (SEC ID NO:48) y se cortó con *Bgl2* y *Bam*H1 para aislar un fragmento de inserto consistiendo de las secuencias de intrón y de exón de flanqueo a partir de actinia cardiaca de pollo. pPJV7488 se cortó con *Bam*H1 para preparar un fragmento del vector dentro del cual el fragmento de inserto se ligó, dando por resultado pPJV7557.

(b) pPJV7S58 (Beta-gal, CMV(cK intrón), HbsAg 3'UTR, HbsAg 5'UTR y RBGpA)

El ADN de pollo se amplificó a través de PCR con los cebadores JF421 (SEC ID NO:50) y JF444 (SEC ID NO:51) y se cortó con *Bgl2* y *Bam*H1 para aislar un fragmento del inserto consistiendo de las secuencias de intrón y de exón de flanqueo del gen de queratina de pollo. pPJV7488 se cortó con *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando por resultado pPJV7558.

(c) pPJV7578 (HBsAg, CMV (cA intrón), HbsAg 3'UTR, HbsAg 5'UTR y RBGpA)

pPJV7557 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para aislar un

fragmento del inserto consistiendo del promotor CMV a través de las regiones del intrón. pPJV7496 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para preparar un fragmento de vector dentro del cual el fragmento de inserto se ligó, dando como resultado pPJV7558.

(d) pPJV7579 (HBsAg, CMV (cK intrón), HbsAg 3'UTR, HbsAg 5'UTR y RBGpA)

pPJV7558 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para aislar un fragmento del inserto consistiendo del promotor CMV a través de las regiones del intrón. pPJV7496 se cortó con *Sal*1 y *Bam*H1 para preparar el fragmento del vector dentro del cual el fragmento del inserto se ligó, dando como resultado PJV7579.

Ejemplo 9. Análisis *In Vitro* de la Expresión del Antígeno a Través de los Paneles de Vector HBsAg

En el día uno, se colocaron en placas las células SCC15 (ATCC) o B16 (origen desconocido, versiones disponibles en ATCC) sobre placas de cultivo de tejido de 6 cavidades a 20-40% de confluencia, y se dejaron crecer durante la noche en una incubador. Las células hospederas se propagaron en medio recomendado por ATCC. En el día dos, se llevó a cabo la reacción de transfección. Para cada vector a ser probado, se agregaron 20µl del reactivo Lipofectin® (Life Technologies Inc, Grand Island, NY) a 180µl de medio Optimem® (Life Technologies, Grand Island, NY), y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 45 minutos. Para que cada vector

a ser probado, se mezclaron 2µg del vector en 200µl de Optimem® a los 40 minutos. A los 45 minutos, las soluciones y el vector Lipofectin® se mezclaron juntas y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos más. Durante esta incubación final, las células hospederas en las placas se removieron de incubador y se lavaron dos veces con medio Optimem®. A los 10 minutos, se agregaron 1.6ml de Optimem® a la mezcla de Lipofectin®/vector, y se agrego 1ml de la mezcla resultante a cada uno de las dos cavidades de célula. Las células hospederas se regresaron al incubador y se dejaron reposar sin cambios durante 5 horas, punto en el cual la mezcla de Lipofectin®/vector se removió y se reemplazó por medios de mantenimiento de célula estándar.

De las 18 a las 24 horas después del cambio de medio, se removieron de 50 al 100 µl del medio de mantenimiento de célula de las placas de cultivo de tejido y analizaron para la expresión de antígeno a través de la colocación de las muestras en los recipientes de reacción provistos en el Kit de Diagnóstico Monoclonal AUSZYME® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El volumen de las muestras de prueba se trajo a un volumen de 200µl con PBS, después 50µl de conjugado y se agregó una perla de reacción a cada muestra. El recipiente se incubó durante 80 minutos a 40°C, después de lo cual las cavidades se lavaron para limpiarlas de todos los componentes de reacción líquida. Las

perlas se transfirieron a nuevos tubos después de lo cual se agregaron 300µl de regulador de pH de desarrollo de color. A los 30 minutos, la reacción de desarrollo de color se detuvo a través de la adición de 1M de ácido sulfúrico, y se midió la absorbancia de la reacción a 490nm. Los datos mostrados en la Figura 1 son las lecturas de absorbancia promedio de las cavidades por duplicado de dos experimentos.

Como se muestra en la Figura 1, la adición de RIA, en UTR 3' HBV o ambos elementos a un vector base (promotor CMV, región de exón y poliadenilación) se incrementó la expresión de HBsAg en las células SCC15. Como se muestra en la Figura 2, la adición de cualquiera de la queratina de pollo, o el intrón de la actinia cardiaca de pollo al vector base (promotor CMV, exón, UTR 3' HBV y la región de poliadenilación) incrementó la expresión de HBsAg en las células SCC15.

Ejemplo 10. Análisis In Vitro de la Expresión del Antígeno a Través de los Paneles de Vector Beta-gal

Las células hospederas SSC-15 o B16 se transfectaron como se describió en el Ejemplo 9. De las dieciocho a las cuarenta horas después del cambio de medios, los sobrenadantes del medio se removieron y las células se lavaron con PBS. Después de la remoción del lavado, las células se lisaron a través de incubación de las células en 500µl de regulador de pH de lisis (50mM $NaPO_4$, 0.1%Triton X-

100, pH 7) durante 5 minutos, seguido por el raspado físico de las células del disco de plástico. Los lisados se microfugaron durante dos minutos para remover el resto de las células y se agregaron de 10 a 25µl de lisato aclarado a 500µl de regulador de pH de reacción (800ug/ml o-nitrofenilo galactopiranosida, 50mM $NaPO_4$, pH 7) y se incubaron a 37°C de 5 a 20 minutos. La reacción se detuvo a través de la adición de 500µl de IM Na_2CO_3 y la lectura a 405 nm. Los datos se presentan como la proporción de la expresión del vector mejorado (conteniendo un intrón, HBVenh, o ambos) para un vector base.

La adición de RIA, en UTR 3' HBV, o ambos elementos al vector base (promotor CMV, región de exón y poliadenilación) incrementó la expresión de beta-gal en ambas líneas celulares. Los resultados para las células SCC15 se muestran en la Figura 3. Además de la adición de cualquiera de la queratina de pollo o el intrón de la actinia cardiaca de pollo al vector base (promotor CMV, exón, la UTR 3' HBV y la región de poliadenilación) incrementó la expresión de beta-gal en ambas líneas celulares. Los resultados para las células B16 se muestran en la Figura 2.

Ejemplo 11. Análisis In Vitro de la Expresión del Antígeno a través del Panel del Vector HSV gD

Las células hospederas SCC15 o B16 se transfectaron como se describe en el Ejemplo 9. Dieciocho horas después de

la transfección, placas las placas se colocaron sobre hielo durante 15 minutos. Cada cavidad después se lavó con 2 ml de PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD). Las células se fijaron con 0.05% de gluteraldehído (Polysciences Inc, Warrington, PA) diluido en PBS y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Todas las incubaciones subsiguientes duraron 1 hora a temperatura ambiente y los lavados entre cada incubación fueron como se manifestó anteriormente. Las placas se bloquearon con 2 ml de leche seca al 5% (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) en PBS. Las incubaciones con 1 ml de una dilución de 1:1000 de monoclonal anti-gD (ABI, Colombia, MD) en la leche seca al 2%/PBS/0.05% de Tween-20®; (Sigma, St. Louis, MES) y 1 ml de una dilución de 1:2500 de HRP de anti-ratón de cabra (KPL, Gaithersburg, MD) en PBS/ 0.1% de Tween-20® siguieron. El color se desarrolló utilizando 1 ml de sustrato de microcavidad TMB (BioFX, Owings Mills, MD). Las reacciones se detuvieron con IM de H_2SO_4, el líquido se transferí a través de plástico y la lectura de la densidad óptica a 450nm. Los datos se presentan como la proporción de la expresión del vector mejorado (conteniendo un intrón, HBVenh, o ambos) para un vector base.

La adición de RIA con o sin la UTR 3' HBV al vector base (promotor CMV, región del exón y poliadenilación) incrementó la expresión de HSV gD en ambas líneas celulares. Los resultados para las células SC15 se muestran en la Figura

4.

Ejemplo 12. Análisis In Vitro de la Expresión del Antígeno a través de los Paneles de Vector SEAP

Las células hospederas SCC15 o B16 se transfectaron como se describe en el Ejemplo 9. De las dieciocho a cuarenta horas después del cambio de medios, los sobrenadantes de los medios se removieron y se calentaron a 70°C durante 30 minutos. Se incubaron de 10 a 25µl de sobrenadantes inactivados con calor durante 5 minutos con un volumen 1/10° de 10OmM de homoarginina. Se agregaron 500µl de regulador de pH de reacción de fosfatasa alcalina (# de catálogo 172-1063, Bio-Rad, preparado de acuerdo con las instrucciones) a los lisatos y se incubaron a 37°C de 10 a 20 minutos. La reacción se detuvo a través de la adición de 500µl IM NaOH y se leyeron a 405 nm. Los datos se presentan como la proporción de la expresión del vector mejorado (conteniendo un intrón, HBVenh, o ambos) para un vector base, o la proporción de la expresión de los péptidos de señal experimentales para el vector de péptido de señal TPA humano.

Como se muestra en la Figura 5, la adición del RIA, la UTR 3' HBV o ambos elementos para el vector base (promotor CMV, región de exón y poliadenilación) incrementó la expresión de SEAP células B16. Inesperadamente, solamente la adición de la UTR 3' HBV al vector base (promotor CMV, región de exón y poliadenilación) incrementó la expresión de SEAP en

células SCC15.

La adición de los péptidos de señal de cualquiera de aprotinina de bovino, lisozima de pollo, o de extensina de tabaco al término N de SEAP maduro permitió la secreción eficiente de SEAP en los sobrenadantes de los medios celulares de ambas líneas celulares. Los resultados para las células B16 se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 13. Análisis In Vitro de la Expresión del Antígeno a Través del Panel de Péptido de Señal del Fragmento IgG Fc Humano

Las células hospederas SCC16 o de B16 se transfectaron como se describió en el Ejemplo 9. Los sobrenadantes del medio se removieron de las dieciocho a cuarenta horas después del cambio de medio.

Se incubaron placas ELISA (Costar) durante la noche en 4°C con 100 µl de IgG anti-humano de cabra (Sigma #I3382, dilución 1/1000 en regulador de pH con capa de carbonato) por cavidad. Todas las incubaciones subsiguientes duraron 1 hora a temperatura ambiente con lavados (10mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Brij-35, pH 8.0) entre cada incubación. Las cavidades después se bloquearon con 100 µl de 5% seco en PBS, seguido por la incubación con sobrenadantes de medios serialmente diluidos en regulador de pH de dilución (2% de leche seca, PBS, 0.05% de Tween-20®). Esto fue seguido por la incubación con 100µl de IgG anti-humano de cabra HRP (Sigma #A6029,

dilución 1/5000 en regulador de pH de dilución) por cavidad, seguido por el desarrollo de color utilizando 100 µl de sustrato de microcavidad TMB. Las reacciones se detuvieron con 100µl de 1M de H_2SO_4, y se leyeron a 450 nm. Los datos se presentaron como la proporción de la expresión de los péptidos de señal experimentales al vector de péptido de señal TPA humano.

La adición de los péptidos de señal de cualquiera de aprotinina de lo bovino, lisozima de pollo, o extensina de tabaco al término N del fragmento Fc humano permitió la secreción eficiente de hFc en los sobrenadantes de medios celulares de ambas líneas celulares. Los resultados para las células B16 se muestran en la Figura 6.

Ejemplo 14. Uso de los vectores de expresión del plásmido HBsAg, HSVgD y Flu-M2 para la inmunización de ratones

(a) Preparación de cartuchos de inmunización

Para cada plásmido a ser probado, se pesaron 25mg de 2 micras de polvo de oro en un tubo de microfuga. Después de la adición de una alícuota de 250µl de 50 mM de espermidina (Aldrich Chemical, Inc, Milwaukee, WI), el tubo se sometió a vórtice y se sonicó brevemente. El oro se microfugó y el espermidina se reemplazó por una alícuota de 100 µl fresca. El oro se volvió a suspender mediante vórtice, después de lo cual se agregaron 25µg de ADN al tubo y se

mezclaron. Mientras el tubo se sometió a vórtice ligeramente, se agregaron 100µl de 10% de $CaCl_2$ (Fujisawa USA, Inc, Deerfield, IL) al precipitado del ADN sobre los perlas de oro. La reacción de precipitación se dejó proseguir por 10 minutos en la mesa, después de lo cual se recolectó el oro a través de un termo de microfuga y se lavó tres veces con etanol absoluto (Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) para remover el exceso de reactivos de precipitación. El lavado del complejo de oro/ADN después se volvió a suspender en 3.6 ml de 0.05 mg/ml de polivinilpirrolidona (360KD, Spectrum Quality Products, Inc, Gardena, CA) en etanol absoluto. Esta lechada después se inyectó en un tubo Tefzelâ (McMaster-Carr, Chicago, IL) localizado en el torneo del tubo (PowderJect Vaccines) que cubrió la parte interna del tubo Tefzelâ con el complejo de oro/ADN. Después de que se completó el procedimiento de torneado de tubo, el tubo se cortó en "piezas" de 0.5 de la vacuna que se cargaron en el dispositivo de XR1 (PowderJect Vaccines) para la distribución a los ratones.

(b) Procedimiento de vacunación

Se anestesiaron ratones de cuatro a seis semanas de edad con una mezcla de Ketasetâ (Fort Dodge) y Rompunâ (Bayer). Los abdómenes se rasuraron con un par de esquiladoras eléctricas para remover el pelo, y se distribuyeron dos "piezas de vacuna" no en traslape a través

del dispositivo XR1 (450psi) en área rasurada. Los animales se devolvieron a sus jaulas y se hicieron sangrar seis semanas después de la vacunación. Se utilizaron ratones de Balb/c para evaluar los vectores de expresión HBsAg, y los ratones Swiss Webster se utilizaron para evaluar los vectores de expresión HSV-gD y Flu M2.

Análisis de suero para anticuerpos Anti-HBsAg

Se cosecharon muestras sanguíneas a las seis semanas, de animales vacunados. Un volumen del suero aislado de estas muestras se colocó en cavidades de un recipiente de reacción suministrado con el Equipo de Diagnóstico AUSAB® EIA (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). El volumen de suero agregado depende la concentración del anticuerpo de la muestra, y la muestra se diluyó con regulador de pH de dilución de muestra para caer dentro de los valores obtenibles con un panel de cuantificación. Se agregaron 200µl de cada recipiente al panel de cuantificación AUSAB® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) las cavidades del recipiente de reacción. A cada cavidad se agregó una perla, después de lo cual el recipiente se sello y se incubó por dos horas a 40°C. Las cavidades después se lavaron de todos los componentes de reacción líquida. A cada cavidad lavada se adicionaron 200µl de la mezcla conjugada, después de lo cual el recipiente se sellado y se incubó por dos horas a 40°C. Las cavidades después se lavaron de todos los componentes de

341

reacción líquida. Los perlas se transfirieron a nuevos tubos después de lo cual se agregó 300µl de regulador de pH de desarrollo de color. A los 30 minutos, la reacción de desarrollo de color se detuvo a través de la adición de 1M de ácido sulfúrico, y la absorbancia de las reacciones se midió a 490nm en un espectrofotómetro Quantum II® (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL). Este espectrofotómetro calcula los niveles del anticuerpo de una muestra comparando la absorbancia de la muestra con una curva estándar generada con el panel de cuantificación. Estos niveles del anticuerpo después se corrigieron para factores de dilución. Los datos mostrados en la Figura 7 son las concentraciones promedio geométricas de todos los animales vacunados con el vector particular.

Análisis de Sueros para Anticuerpos del Antígeno Anti-Flu M2

Se cubrieron placas ELISA de enlace al medio Costar de 96 cavidades (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) con un péptido Flu M2sintético (QCB/Biosource, Hopkinton, MA) a una concentración de 1 ug/ml en PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) y se incubaron durante la noche a 4°C. Las placas se lavaron tres veces con 10 mM de Tris (Sigma, St. Louis, MO)/150mM de NaCl (Fisher Scientific)/0.1% Brij-35 (Sigma), después se bloquearon con 5% de leche seca (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) en PBS durante 1 hora a

342

temperatura ambiente. Todas las subsiguientes incubaciones fueron a temperatura ambiente por una hora y los lavados entre cada incubación fueron como se manifestó anteriormente. El suero de ratón de muestra, un control estándar (concentración alta de suero de ratón anti-M2) y negativo (suero de ratón anti-HBsAg) se diluyeron en 2% de leche seca/PBS/0.05% de Tween-20® (Sigma) y se incubaron en placas ELISA. El anticuerpo del conjugado de biotina IgG (H+L) anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology Asóciate, Birmingham, AL) se diluyó 1:8000 en 2% de leche seca/PBS/0.05% de Tween-20® y el conjugado de peroxidasa rábano picante de estreptavidina (Southern Biotechnology) se diluyó a 1:8000 en PBS/0.1% Tween-20 después. El color se desarrolló utilizando un substrato de TMB (BioFX, Owings Mills, MD). Las reacciones se detuvieron con 1M de H_2SO_4 y las placas se leyeron a 450nm con un lector de microplacas de precisión Emax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se utilizó el software SoftMax Pro 4.1 (Molecular Devices) para calcular las concentraciones de punto final utilizando un análisis de cuatro parámetros. Las concentraciones se normalizaron al suero estándar, que había sido un concentración pre-determinada, para minimizar la variación del ensayo a ensayo y de placa a placa. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Análisis de Sueros Para Anticuerpos del Antígeno Anti-HSV gD

Se cubrieron placas ELISA de enlace al medio Costar de 96 cavidades (Ficher Scientific, Pittsburgh, PA) con proteína HSV gD (Viral Therapeutics, Ithaca, NY)a una concentración en de 1ug/ml en PBS (Biowhittaker, Walkerville, MD) y se incubaron durante la noche en 4°C. Las placas se lavaron tres veces con 10mM Tris (Sigma, St. Louis, MO)/150mM NaCl (Fisher Scientific)/0.1% Brij-35 (Sigma), después se bloquearon con 5% de leche seca (Bio Rad Laboratories, Melville, NY) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Todas incubaciones subsiguientes fueron a temperatura ambiente por una hora y los lavados entre cada incubación fueron como se manifestó anteriormente. El suero de ratón de muestra, un control estándar (concentración alta, de suero de ratón anti-gD) y negativo (sueros de ratón anti HBsAg) se diluyó en 2% de leche seca/PBS/0.05% Tween-20 (Sigma) y se incubó en placas ELISA. El anticuerpo del conjugado de biotina IgG (H+L) anti-ratón de cabra (Southern Biotechnology Associate, Birmingham, AL) se diluyó 1:8000 en 2% de leche seca/PBS/0.05% Tween-20 y el conjugado de peroxidasa de rábano picante de estreptavidina (Southern Biotechnology) se diluyó 1:8000 en PBS/0.1% Tween-20 siguiente. El color se desarrolló utilizando un substrato TMB (BioFX, Owings Mills, MD). Las reacciones se detuvieron con 1M de H_2SO_4 y las placas

se leyeron a 450nm con un lector de microplacas de precisión de Emax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Se utilizó el software SoftMax Pro 4.1 (Molecular Devices) para calcular las concentraciones del punto final utilizando un análisis de cuatro parámetros. Las concentraciones se normalizaron a un suero estándar, el cual había sido una concentración predeterminada, para minimizar la variación de ensayo a ensayo y de placa a placa. Los resultados se muestran en la Figura 7.

Ejemplo 15. Construcción del Plásmido PPJV1671, el Vector de Vacuna de ADN de influenza

Se construyó el plásmido pPJV1671 el cual codifica y puede expresar el antígeno de Hemaglutinina (HA) de influenza A/Panama/2007/99 (H3N2).

La construcción de pP JV1671 mejor se describe en las tres etapas principales:

(i) Clonar el gen de expresión;

(ii) Modificar la estructura del vector; y

(iii) Modificar el plásmido final.

Clonación del gen de expresión

La secuencia de codificación para HA de influenza se obtuvo a través de la técnica de clonación de reacción de cadena transcriptasa-polimerasa inversa estándar (RT-PCR) utilizando una muestra del virus A/Panama/2007/99 obtenida de los centros del control de enfermedades y prevención

(Atlanta, GA) como una fuente del ácido ribonucleico plantilla (ARN).

Se utilizaron los siguientes pasos en la clonación del gen de expresión, HA:

- Producción RT-PCR del fragmento ADNds del segmento ARN 4 de A/Panama/2007/99 (H3N2);
- Propagación del clon de ADN del segmento 4 de ARN en un vector basado en pUC19 en *E. coli*;
- Análisis de secuencia de la secuencia de codificación HA H3 Panama dentro del clon del segmento 4 de ARN; y
- Una segunda reacción PCR para generar un fragmento de ADN que contiene la secuencia de codificación HA H3 Panama (sin su codón ATG) con extremos compatibles con el vector "vacío" de la vacuna de ADN pPJV7563 (Nhe I y Bsp 1201).

Modificación de la Estructura del vector, pPJV7563

La estructura del plásmido para pPJV1671 es pPJV7563. El mayor parte de las secuencias de la estructura del plásmido en pPJV7563 también se encuentran en pWRG7128, un vector de vacuna de ADN que había sido evaluado en varios ensayos clínicos humanos. Esta sección provee una sinopsis de la construcción de pPJV7563. Se provee una gráfica de flujo detallada en la Figura 14 de la construcción de pPJV7563 y de pPJV1671, y una comparación tabular más adelante (Tabla 2) de

346

los elementos claves en los plásmidos pWRG7128 y pPJV1671 se provee. El mapa de pPJV1671 se muestra en la Figura 16.

Tabla 2

Comparación de los Elementos Clave en las Estructuras del vector:

Plásmidos WRG7128 (HBsAg) y pPJV1671 (HA de influenza)

Descripción den cambio	**Razón o Propósito para el Cambio**	**Efecto biológico o significancia o Efecto posible del cambio**
El fragmento del gen de resistencia canamicina en pPJV1671 es 354 bases más pequeño que el utilizado en pWRG7128	Para remover las secuencias extrañas del vector	Ningún cambio negativo para la efectividad de la vacuna o previsión de seguridad
El enlazador Sph1-Pst1 en corriente ascendente del promotor CMV en pWRG7128 se removió	Para remover las secuencias extrañas del vector. Permitir que estos sitios de restricción sean más efectivamente utilizados en la construcción de futuras vacunas.	Ningún cambio negativo APRA la efectividad de la vacuna o previsión de seguridad
El intrón A de CMV se removió y en pPJV1671, el exón 1 CMV había sido fusionado con las 9 bases restantes del exón 2 CMV	Los exones CMV se fusionaron para recrear el UTR 5' de la transcripción pWRG7128 empalmada	Fusión de los exones CMV no deberá cambiar la efectividad de la vacuna o el perfil de seguridad.
El intrón A del gen de insulina de rata había sido insertado entre los exones CMV y el UTR 5' de HBsAg	Para reemplazar la secuencia del intrón A cMV con una alternativa funcional	La adición del intrón A de insulina de rata han demostrado que incrementan la expresión del antígeno y las subsiguientes respuestas del anticuerpo

Descripción den cambio	Razón o Propósito para el Cambio	Efecto biológico o significancia o Efecto posible del cambio
La región de poliadenilación había sido cambiada de hormona de crecimiento de bovino beta-globina de conejo	Para utilizar una señal de poliadenilación alternativa	Ningún cambio negativo para la efectividad de la vacuna o previsión de seguridad

Modificación del Plásmido final, pPJV1671

Se involucraron dos pasos principales en la modificación del plásmido final, pPJV1671, a partir la estructura, pPJV7563 (como se ilustra en la Figura 14) estos son:

- Eliminación del sitio de Nhe1-Bgl II de pP JV7563; y
- La inserción de la secuencia de codificación H3 Panama HA en pPJV7563 produciendo el pPJV1671 final del vector de la vacuna de ADN de H3 Panama HA.

Una análisis de secuencia completa de pPJV1671 confirmó la estructura del vector y todas las secuencias de codificación HA que se enumeran a continuación en la Tabla 3.

Comparación de pWRG7128 y pPJV1671

Las diferencias principales en las estructuras del vector entre los pWRG7128 que codifican HBsAg clínicamente probados y el vector pP JV1671 de la vacuna de influenza que codifica H3 Panama HA se muestran anteriormente en la Tabla 2. Estos incluyen el uso del intrón A de insulina de rata en

lugar del elemento del intrón A de Citomegalovirus humano (hCMV) y el uso de la secuencia del poliadenilación de beta-globina de conejo en lugar de la secuencia de poliadenilación de la hormona de crecimiento de bovinos. Los estudios en animales extensivos con pPJV1671 descritos han demostrado un buen funcionamiento de la vacuna de ADN de influenza tanto en animales grandes como pequeños. El plásmido pPJV1671 también funciona bien en seres humanos después de PMED de esta vacuna de ADN como se explica a continuación en el Ejemplo 16.

Característica y Mapa Funcional de pPJV1671

El mapa funcional de pPJV1671 se muestra en la Figura 16. Las características de este mapa se enumeran en la Tabla 3. El plásmido pPJV1671 utiliza el promotor temprano inmediato hCMV y las secuencias de no codificación 5′ de los exones 1 y 2. Este promotor está enlazado al intrón A de insulina de rata y la UTR 5′ del gen HBV pre-S2. La traducción de la secuencia de codificación Ha H3 Panama inicia el codón ATG que está al vector en el contexto de una secuencia de iniciación de traducción Kozak de consenso. La secuencia de codificación HA es seguida por un potenciador de trascripción de HBV (HBVenh). Finalmente, la terminación de la trascripción se facilita a través un sitio de poliadenilación de beta-globina de conejo.

Debido a que el codón de iniciación de traducción ATG natural del gen HA A/Panama/2007/99 (H3N2) no se adapta a

la secuencia del consenso Kozak para la iniciación de la traducción, se eligió utilizar el elemento ATG suministrado por el vector de vacuna ADN pPJV7563 para la iniciación de la traducción. La expresión del antígeno de los vectores de vacuna ADN se mejora utilizando los codones ATG que se adaptan al consenso Kozak. El uso del codón ATG suministrado por el vector (a través de la inserción en el sitio de Nhe I) da como resultado una inserción de 2-aminoácido menor en el término amino de la secuencia de codificación del gen HA como se describe en la Figura 16.

Origen de las Secuencias de Nucleótidos en pPJV1671

El historial de la construcción detallada y los reportes de la secuenciación para pPJV1671 permiten la asignación de origen a todas las posiciones del nucleótido dentro de este plásmido. Las alineaciones BLAST entre las secuencias componentes de vector y la base de datos GenBank se llevaron a cabo para verificar las asignaciones del componente correcto que ciertamente se había hecho.

Tabla 3

Identificación de los Componentes que Comprenden el Plásmido pPJV1671

Números Base	Identificación del Componente
1-896	Gen de resistencia a canamicina, flanqueado por las secuencias tn903 (Tn903, remanentes pUC4K 1-44 y 861-896)
897-902	Sitio de clonación Sal 1/pUC 19 MCS
903-1587	Promotor CMV
1588-1718	Exón 1/2 de fusión CMV
1719-1724	Fusión de BamH1/Bgl2
1725-1857	Intrón A de insulina de rata
1858-1863	Sitio de clonación BamH1
1864-1984	Región preS2 no de codificación de HbsAg
1985-1987	Codón de iniciación ATG
1988-1993	Sitio de clonación Nhe1
1994-3688	Secuencia de codificación HA H3N2
3689-3691	Codón de detención
3692	Nucleótido G y el UTR 3′ de H3 Panama
3693-3698	Sitio de clonación Bsp 120I
3699-4231	Potenciador HBV
4232-4242	Artefacto de clonación. Origen Desconocido
4243-4373	Región de poliadenilación de beta-globina de conejo
4374-4379	Sitio de clonación EcoR1
4380-5446	Vector PUC19

Secuencia de pPJV167 (Banco de Células Principal)

La secuenciación se llevó a cabo a través del departamento de investigación de PowderJect utilizando ADN Qiagen Megaprep preparado del plásmido pPJV1671 recién construido. Los datos de la secuencia actual estuvieron 100% de acuerdo con la secuencia teórica pronosticada por pPJV1671. La secuenciación durante el procedimiento de fabricación también mostró que la secuencia de plásmido también estuvo 100% de acuerdo con las secuencias teóricas y de investigación. Los varios elementos del plásmido y las posiciones en la secuencia se proveen en la Tabla 3 anterior.

Ejemplo 16. Evaluación de No Clínica de pPJV1671: Inmunogenicidad de la Vacuna pPJV1671 de ADN y de Influenza Monovalente en un Modelo de Animal Grande

Se utilizó un modelo de puerco doméstico para investigar la inmunogenicidad de pPJV1671 en la generación de el cual se describe anteriormente en el Ejemplo 15. Se utilizaron puercos blancos domésticos de ocho semanas de edad (machos y hembras) en este estudio. Se midieron las concentraciones del anticuerpo de inhibición de Hemaglutinación (HI) para los animales del estudio candidatos y fueron <1:10 para todos los animales que entraron en este estudio.

Se vacunaron dos grupos de 8 animales cada uno por medio de PMED de la vacuna de ADN pPJV1671. Ambos grupos

recibieron inmunizaciones primarias y de refortalecimiento separadas por 4 semanas. Cada inmunización consistió de dos administraciones paralelas en la piel. La dosis de la vacuna de ADN para cada administración fue de 1μg de DNA condensado sobre la superficie partículas de oro de 0.5 mg. La vacuna del ADN se distribuyó con el XR-1 clínico y dispositivos de investigación operados a 500 psi de presión de helio.

Los puercos, se vacunaron en el día 0, se refortalecieron en el día 28 se sangraron en el día 42, dos semanas después de la vacunación de refortalecimiento. El suero se probó para respuestas al anticuerpo HI utilizando un ensayo HI estándar. Los resultados de este estudio se muestran en la Figura 17 y demuestran que la vacuna de ADN pPJV167 indujo concentraciones de anticuerpo HI significativas en 100% de los animales de prueba con concentraciones de anticuerpo HI promedio bien en exceso del 1:40 de la concentración del anticuerpo HI sustituto para la protección contra la influenza en seres humanos.

Ejemplo 17. Evaluación del Ensayo Clínico de la Construcción de Vacuna de ADN de influenza en humanos

Introducción

Se llevó a cabo un estudio clínico con graduación de la dosis en la fase I para evaluar la seguridad y la inmunogenicidad de la vacuna de ADN de pPJV1671 que es una vacuna de ADN de influenza PMED monovalente conteniendo el

gen HA (hemaglutinina) de A/Panama/2007/99 (H3N2). La seguridad se evaluó monitoreando los eventos adversos locales y sistémicos de la vacunación hasta la terminación del estudio. La inmunogenicidad se evaluó midiendo niveles los niveles de anticuerpo de inhibición del suero de hemaglutinación (HI).

Tres grupos de los 12 sujetos adultos recibieron una sola dosis en el día 0 de ya sea 1, 2 ó 4 μg de la vacuna de ADN, distribuida como 1, 2 ó 4 administraciones PMED. La vacuna de ADN de influenza PMED provocó respuestas al anticuerpo de inhibición de hemaglutinación de suero (HI) en los 3 niveles de dosis, con las respuestas más altas y más consistentes en sujetos vacunados con el nivel de dosis más alto. Las respuestas al anticuerpo fueron mayores en el último punto en el tiempo probado, día 56. La reactogenicidad relacionada con el tratamiento se limitó a reacciones de media a moderada en el sitio de la vacuna, las cuales fueron principalmente auto-limitantes. Estos resultados proveen una indicación de la seguridad e inmunogenicidad de la vacuna del ADN para influenza generada.

Materiales y métodos

Vacuna y sistema de distribución

Para el plásmido clínico, la secuencia de codificación HA se obtuvo a través de una técnica de clonación de reacción de cadena de polimerasa transcriptasa

inversa (RT-PCR) utilizando una muestra de un virus A/Panama/2007/99 como la fuente de un ARN de plantilla (el virus fue una donación de J. Katz, Centros para el Control y Prevención de Enfermedades). La secuencia de codificación HA H3 Panamá se insertó en el vector pPJV7563 como se describe anteriormente en el Ejemplo 15 produciendo el vector de vacuna de ADN HA pPJV1671 H3 Panama final. La análisis de secuencia completo del pPJV1671 confirmó la estructura del vector y todas las secuencias de codificación HA. El plásmido pPJV1671 se fabricó bajo buenas prácticas de fabricación en Strathman GmbH (Hannover, Germany). El ADN de plásmido se recubrió con partículas de oro de 1-3 μm, y se formuló para PMED utilizando el dispositivo XR-1 PowderJect, utilizando métodos previamente descritos (Roy y otros, (2001) Vaccine 19:764-78). Cada dosis contuvo un valor nominal de 1 μg de ADN cubierto con 0.5 mg de oro. Los parámetros de calidad de la vacuna se analizaron incluyendo la cantidad de oro y ADN, la expresión *in vitro*, la inmunopotencia en ratones, y la ausencia de biocarga y endotoxina.

Población de pacientes y configuración

La fase clínica del estudio se condujo en MDS Pharma Services, Lincoln, NE, y se aprobó a través del comité de revisión institucional. Se enrolaron treinta y seis (36) voluntarios adultos (Tabla 4).

Tabla 4: Demográficos de la población de estudio

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Número por grupo	12	12	12
Edad promedio (años)	31	31	32
Intervalo de edad (años)	20-48	20-50	21-49
Hombres:Mujeres	7:5	4:8	5:7
Prevacunación HAI GMT (intervalo)	16 (5-40	17 (5-40)	12 (5-40)

Los sujetos se consideraron elegibles si estuvieron saludables, en edades de 19-50, no embarazado o en lactancia, capaces de proveer un consentimiento informado por escrito, y con concentraciones de inhibición de hemaglutinación de prevacunación (HI) para influenza A/Panama de ≥10 y ≤40.

Las razones para la exclusión incluyeron la terapia de inmunosupresión de los últimos 6 meses, el historial de enfermedades en la piel, cicatrización, lunares, cortes o tatuajes en el sitio de la inmunización, alergia al oro, historial de crisoterapia, receptor de la vacuna de influenza en los últimos 12 meses, síntomas de tipo influenza o influenza diagnosticada en la temporada actual, o la presencia de cualquier condición médica en donde no se recomienda la vacunación de influenza.

Todos los sujetos completaron el estudio y se evaluaron para seguridad e inmunogenicidad, con la excepción de dos sujetos. Un sujeto perdió el seguimiento y el otro sujeto no seguía las normas. Sin embargo, ya que los 36 sujetos proveyeron una muestra de pre-vacunación, recibieron vacunación, y se evaluaron por lo menos una vez después de la vacunación para seguridad e inmunogenicidad, los datos estuvieron disponibles para evaluación de seguridad e inmunogenicidad en todos los sujetos. Todos los procedimientos del estudio fueron de acuerdo con el declaración de Helsinki de 1975, con las últimas enmiendas de Edimburgo, Escocia (2000) y la conferencia internacional de instrucciones de armonización en las buena prácticas clínicas (paso 4, mayo 1 del 1996).

Diseño del Estudio Clínico

Los sujetos se asignaron a tres grupos de tratamiento, 12 por grupo, sobre bases secuenciales. Cada administración de vacuna de ADN PMED distribuyó 1 µg de ADN, el plásmido pPJV1671 (H3 Panama) en 0.5mg de oro. El primer grupo recibió una sola administración de vacuna en el aspecto interno del brazo superior en el día 0. Los sujetos en el grupo 2 recibieron dos vacunas de inmunización en el día 0, para un total de 2 µg de ADN, se administró en los sitios adyacentes en la parte interna superior del brazo. Los sujetos en el grupo 3 recibieron 4 administraciones en el día

4, para un total de 4 μg de ADN. Las vacunas se administraron utilizando el dispositivo XR-1 PowderJect a una presión de helio de 500 psi, una presión que demostró ser bien tolerada en los estudios anteriores (Roy y otros (2001) *Supra*, Rottinghaus y otros (2003) Vaccine 21(31):4604-8 y Tacket y otros (1999) Vaccines 17(22):2826-9).

Evaluaciones de la Seguridad e Inmunogenicidad Clínica

La seguridad se evaluó monitoreando las reacciones del sitio de vacunación y registrando la incidencia de eventos adversos locales y sistémicos durante el estudio. Todos los sujetos se evaluaron para seguridad de vacuna y tolerabilidad local en el momento de la inmunización, 1 hora y 2 horas después de la inmunización. Los sujetos además se evaluaron para la tolerabilidad local en los días 3, 7, 14, 21, 28, 56, y 180. Los eventos adversos sistémicos se monitorearon a través del examen físico, signos vitales, pruebas seguras de laboratorio, y la prueba del anticuerpo anti ADN de estructura de cadena doble. Estas pruebas se condujeron antes y después de la inmunización.

La inmunogenicidad de cada vacuna se determinó recolectando muestras sanguíneas en el día 0 (pre-inmunización), y en los días de 14, 21, y 56 después de la inmunización para la determinación de los concentraciones de HAI, contra A/Panama/2007/99, utilizando la modificación de

un método previamente descrito (Kendal, y otros (1982). Los conceptos y procedimientos para la vigilancia de la influenza basada en laboratorio. El Departamento de E.U.A. de salud y servicios de humanos, servicios de salud pública, centros para el control de enfermedades: B17-35).

Análisis de Datos Clínicos

Se tabularon los datos de seguridad. Cada concentración de HI fue reportada como un promedio geométrico (GMT) de las dos determinaciones independientes, que usualmente produjeron los mismos o similares resultados. Una concentración de 5 fue asignada si la muestra tuvo un concentración por bajo de 10, el límite de detección del ensayo. Para cada grupo, el GMT en cada punto en el tiempo y 95% del intervalo de confidencia (CI) se calculó utilizando concentraciones logarítmicamente transformadas. Para cada punto en el tiempo, la relación GMT de la línea base para cada grupo de dosificación se comparó mediante la prueba de chi-cuadrado utilizando el procedimiento CATMOD en SAS. Las diferencias en el GMT entre los tres grupos se compararon.

Se calculó la velocidad de seroconversión (porcentaje de sujetos con el ≥ incrementos de 4 veces en la concentración HAI sobre la concentración de pre-inmunización), y la velocidad de seroprotección (la proporción de sujetos que lograron una concentración de ≥40 después de la inmunización) se calcularon y se compararon

entre los grupos mediante la prueba chi-cuadrada utilizando el procedimiento CATMOD en SAS para comparar el % del respondedor con la función de enlace de la respuesta logit.

Resultados

Seguridad y Reactogenicidad

Se evaluaron las reacciones locales para los 84 sitios de administración de vacuna (Figura 18). Las puntuaciones de la reacción de la piel local de los tres grupos (sitios de vacunación totales 84) se promediaron. Las reacciones de la piel se calificaron de acuerdo con el siguiente criterio:

- Eritema: 0 = ninguno; 1 = enrojecido; 2 = bronceado ligero; 3 = rojo remolacha.
- Edema: 0 = ninguno; 1 = apenas más grueso; 2 = notablemente más grueso; 3 = colmena grande y firme.
- Decoloración: 0 = ninguno; 1 = se ve escasamente; 2 = notablemente decolorada; 3 = betún marrón.
- Descamado: 0 = ninguno; 1 = como caspa blanca fina; 2 = pelado como quemadura de sol; 3 = más grueso, amarillo, costroso.
- Picazón/molestia: 0 = ninguno; 1 = picazón ligera o ligeramente irritado cuando se toca; 2 = moderadamente picazón o irritado

Como se esperaba con base en los estudios previos (Roy y otros (2001), Rottinghaus y otros (2003) y Tacket y

otros (1999) todos *supra*), los sujetos experimentaron reacciones dérmicas locales, sin embargo no ocurrieron reacciones locales en un intervalo severo (puntuación = 3). No hubo sangrado o daño a la piel registrado. La reacción local típica se caracterizó por un eritema, de ligero a moderado, edema, y decoloración de la piel, y ocasionalmente picazón/molestias, seguido por un descamado de piel superficial ligero.

Las reacciones locales no frecuentes incluyeron hemorragia local (2/84 sitios), amoratamientos menores (2/84 sitios) y costras pequeñas (15/84 sitios). Ya que el edema generalmente se resolvió 14 días después de la vacunación, el eritema y la decoloración de la piel persistió durante 28 días. Del total de 84 sitios de vacunación, la decoloración ligera de la piel aún estuvo presente de los 30 a los 56 días y de los 21 a los 180 días después de la vacunación. Un sujeto también tuvo amoratamiento detectable en 2 sitios en el día 180.

Los eventos adversos sistémicos observados durante el estudio fueron ligeros y se consideraron no relacionados con el tratamiento. Los eventos reportados de los 7 a los 56 días después de la inmunización incluyeron dolor de cabeza (11 eventos en 10 sujetos), fatiga (4 eventos en 3 sujetos), mialgia (3 eventos en 1 sujeto), fiebre (2 eventos en 2 sujetos), sensación de frío en la mano (2 eventos en 2

sujetos), dolor de espalda (2 eventos en 1 sujeto) y náusea, artralgia, rigidez muscular, estremecimientos, hipertensión intermitente, e hipotensión intermitente (1 evento cada uno en 1 sujeto). No se detectaron anticuerpos anti-ADN de estructura de cadena doble. En general, el perfil del evento adverso local y sistémico para todos los grupos de estudio proveyó una indicación de la seguridad de la vacuna de ADN de influenza distribuida mediante PMED.

Respuestas al anticuerpo

Los sujetos se pre-clasificaron para concentraciones HI para la influenza A/Panama de ≥10 y ≤40, aún algunos sujetos tuvieron concentraciones de ≤10 en el día de la vacunación. Las concentraciones HI de la línea base todas fueron ≤40, y no hubo diferencias significativas en las concentraciones de la línea de base entre los grupos (p=0.439; ver Tabla 4 anterior).

La inmunización dio como resultado elevaciones significativas en las concentraciones promedio geométricas (GMT) en todos los puntos en el tiempo en los tres grupos (como se muestra en la Tabla 5 siguiente).

Tabla 5:

Respuestas del anticuerpo al suero, velocidad de seroconversión y seroprotección

Grupo	Día	Seroconversión(%)	Seroprotección[b](%)	Incremento GMT promedio (vez)
1	0	-	17(2/12)	-
	14	8(2/12)	42(5/12)	1.4
	21	17(2/12)	33(4/12)	1.7
	56	33(4/12)	58(7/12)	**2.8[c]**
2	0	-	33(4/12)	-
	14	17(2/12)	50(6/12)	1.7
	21	8(1/12)	58(7/12)	2.1
	56	**67(8/12)**	**92(11/12)**	3.9
3	0	-	8(1/12)	-
	14	17(2/12)	25(3/12)	1.8
	21	33(4/12)	67(8/12)	3.4
	56	**64(7/11)**	**100(11/11)**	**8.1**

[a] La seroconversión se definió ya sea como una concentración de pre-vacunación negativa (≤10) a una concentración de la post-vacunación ≥40, o un incremento significativo en la concentración del anticuerpo, es decir, por lo menos un incremento de cuatro veces entre las

concentraciones de la pre y post vacunación en donde la concentración de la pre-vacunación es ≥10

[b] Velocidad de la seroprotección se define como la proporción de los sujetos que lograron una concentración de post-inmunización de ≥40;

[c] Valores que cumplen con el criterio CPMP

Aunque hubo una tendencia hacia las concentraciones HI más altas y un % de seroconversión más alto en forma de dosis-respuesta, no hubo diferencias estadísticas en GMT, % de seroprotección o % de seroconversión entre los tres grupos. Para los tres niveles de dosis de vacuna, GMT, el % de seroconversión y % de seroprotección se incrementaron como una función del tiempo de post-vacunación, con las concentraciones más altas en el día 56 (ver la Tabla 5). En el grupo 1, el 33% de los sujetos se seroconvirtió en el día 56, con el 58% logrando concentraciones HAI seroprotectivas, y un aumento GMP de 2.8 veces. En el grupo 2, la velocidad de seroconversión en el día 56 fue de 67%, con el 92% de los sujetos seroprotegidos y un aumento GMT de 3.9 veces. Las concentraciones más altas y más consistentes se observaron para el grupo 3 en el día 56, en donde se observó el 100% de seroprotección, y el GMT se incremento 8.1 veces sobre la línea base. En ese grupo, la seroconversión fue menor del 100%, porque algunos sujetos seroprotegidos no mostraron un incremento de ≥4 veces en concentración, debido a las

concentraciones HAI de la línea base relativamente altas.

Explicación

El trabajo descrito en el ejemplo presente provee la primera generación exitosa de una respuesta a anticuerpo anti-influenza que se pronostica a ser efectivo para la profilaxis de influenza.

El análisis inmunológico demostró que todos los niveles de dosis produjeron respuestas anticuerpos anti-influenza. La comparación contra las instrucciones de CPMP (Comité para el Propietario de Productos Médicos) para la licenciación de vacunas contra la gripe anuales mostraron que el grupo con una dosis de 1μg logró el criterio en el día 56 en la Concentración Promedio geométrica (GMT), el grupo 2 grupos de una dosis de 2μg logró el criterio en el día 56 en los tres criterios (seroconversión, seroprotección y GMT) y en grupos con la dosis de 4μg logró el criterio en el día 21 a través de GMT y en el día 56 en los otros tres criterios.

Un total de 320 eventos adversos emergentes del tratamiento (AE), incluyendo las reacciones del sitio de vacunación, se reportaron en 34 (94%) de los 36 sujetos dosificados. Hubo 1 SAE reportado durante el estudio, una fractura de pie, considerada probablemente como estando relacionada con la vacuna del estudio. Siete (7) sujetos experimentaron AE reportables por FDA que fueron considerados probablemente como estando relacionados con la vacuna del

estudio. La mayor parte (71%) de los AE fueron ligeros en severidad. El AE más común reportado fue dolor de cabeza (53% de los sujetos). No se descontinuaron ningún sujeto del estudio debido a un AE. Un total de 89 AE de relacionado con el sitio de vacunación se reportaron por 27 de los 36 sujetos dosificados con dolor en el sitio de la aplicación ligero siendo el AE local más común, reportado por 12 sujetos (33%). No evaluaron medidas de reactogenicidad local como grado 3 (severo) y por consiguiente se consideraron eventos adversos. Las reacciones del sitio de vacunación típicas incluyeron enrojecimiento/eritema, edema, descamado, decoloración y formación de cicatriz/costra.

En conclusión la administración de pPJV1671 fue bien tolerada en todos los sujetos, y provocó respuestas al anticuerpo anti-influenza potentes. La dosis superior de 4 μg cumple con el criterio en el día 21 establecido por CPMP para el licenciamiento de las vacunas de gripe anuales.

Ejemplo 18. Evaluación No Clínica de la vacuna de ADN trivalente en puercos.

Se construyeron tres vectores de vacuna ADN que codifican las moléculas HA de las tres cepas de vacunas de influenza 2001- 2002 para evaluar la inmunogenicidad de una vacuna de ADN de influenza trivalente humana candidato en un modelo de animal relevante. Históricamente, el puerco doméstico había sido utilizado como un modelo para vacunas de

ADN PMED en humanos debido a las cercanas similitudes en las arquitecturas de la piel humana y de puerco. La relevancia del modelo de puerco como un predictor del funcionamiento de la vacuna de ADN PMED en humanos había sido demostrada por el ensayo clínico humano de fase I de una vacuna de ADN de antígeno de superficie de hepatitis B en donde el buen funcionamiento de la vacuna en puercos se reflejó en seres humanos.

Las muestras de tres cepas de vacunas de influenza humana 2001-2002 (A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), y B/Victoria/5/00) se obtuvieron de los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) y se utilizaron en experimentos de reacción de cadena de polimerasa/transcriptasa inversa (RT-PCR) para generar fragmentos de ADN que codifican los antígenos HA correspondientes. Se utilizaron los siguientes pasos en el desarrollo de los tres vectores de vacuna de ADN HA finales:

Producción RT-PCR de fragmentos de ADNds del segmento de ARN #4 de A/Panama/2007/99 (H3N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1), y B/Victoria/5/00.

- Propagación de los clones de ADN del segmento #4 de ARN en un vector basado en pUC19 estándar en E. coli.
- Análisis de secuencia de la secuencia de codificación HA dentro de los clones de segmento #4 de ARN.
- Una segunda serie de reacciones PCR (con base

en los datos de la secuencia de gen HA actual) para generar fragmentos de ADN de cada virus conteniendo la secuencia de codificación HA (sin los codones ATG) con los extremos compatibles con el vector de expresión de la vacuna de ADN PJV7563 (Nhe I y Bsp 120I).

- Inserción de los tres fragmentos de la secuencia de codificación HA en el vector pPJV7563 de vacuna de ADN clínico produciendo los tres vectores de vacuna de ADN finales.
- Análisis de secuencia de la secuencia de codificación HA en los tres vectores confirmado que no han ocurrido mutaciones.

Los vectores resultantes utilizan promotores quiméricos de la invención. De esta forma, el vector utiliza el promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano (hCMV) y las secuencias de de codificación 5′ de los exones 1 y 2tempranos inmediatos. Este promotor se enlaza al intrón A de insulina de rata y a la región no traducida 5′ (UTR) del gen pre-S2 del virus de hepatitis B (HBV). La traducción de la secuencia de codificación HA inicia en el codón ATG que esté fijo en el vector en el contexto de una secuencia de iniciación de traducción Kozak de consenso. La secuencia de codificación HA es seguida por un potenciador transcripcional de HBV (HBVenh). Finalmente, la terminación de la trascripción se facilita a través del sitio de

poliadenilación del beta-globina de conejo.

Como los codones de iniciación traducción ATG naturales de los genes HA no se adaptan a la secuencia del consenso Kozak para la iniciación de la traducción, se utilizó el elemento ATG suministrado por el vector de vacuna de ADN pPJV7563 para la iniciación de la traducción. La expresión del antígeno de los vectores de vacuna de ADN generalmente se mejora utilizando los codones ATG que se adaptan al consenso Kozak. El uso del codón ATG suministrado por el vector (a través de la inserción en el sitio Nhe I) da como resultado una inserción de dos amino ácidos menores en el término amino de la secuencia de codificación del antígeno HA.

La inmunogenicidad de estos vectores se evaluó en una formulación trivalente en el modelo de puerco doméstico. Los tres vectores se mezclaron 1:1:1 y se formularon en partículas de oro a una velocidad de 2μg de ADN total/mg de oro, utilizando 0.5 mg de oro por administración. Cada inmunización consistió de dos administraciones PMED tándem totalizando 2 μg de ADN y 1 mg de oro. El régimen de vacunación dos dichas inmunizaciones separadas en cuatro semanas. Los puercos nativos de influenza se dividieron en dos grupos de inmunización con base en el dispositivo de distribución actual utilizado. Un grupo de los animales recibió vacunaciones de ADN de influenza trivalente

utilizando el dispositivo PMED "de investigación" reutilizable que había sido exitosamente utilizado para inducir las respuestas inmunes a los numerosos antígenos en una variedad de animales. El segundo grupo de animales recibió inmunizaciones utilizando el dispositivo clínico que se utilizó para exitosamente vacunar a seres humanos utilizando una vacuna de ADN HBV. Este último dispositivo difiere del dispositivo de investigación en que utiliza una boquilla desechable plástica de "un solo tiro" en lugar de la boquilla reutilizable de 12 tiros asociada con el dispositivo de investigación.

Dos semanas después de la segunda inmunización, las muestras de suero se recolectaron y las concentraciones de anticuerpo de inhibición de hemaglutinación (HI) específicas para los virus H3, H1 y B homólogos se midieron. Estos datos se muestran en la Figura 19. Se observó el 100% de la seroconversión para los antígenos H3 y B utilizando ambos dispositivos con concentraciones HI promedio geométrica bien en exceso de 1:40 en el nivel sustituto comúnmente se cree que será requerido para la inmunogenicidad de la influenza. Los datos obtenidos indican que esta plataforma de tecnología será capaz de provocar respuestas significativas en seres humanos.

Las respuestas inmunes específicas de H1 fueron inferiores. Esto después de determinó debido a la

reconfiguración del gen HA H1 que ocurrió en el vector de vacuna ADN H1 durante la producción del plásmido. Esta reconfiguración pasó sin detectar en el análisis inicial del ADN antes de la formulación y vacunación, pero podría detectarse a través de un análisis más estricto. Con base en los resultados utilizando los vectores de H3 y B, es probable que las respuestas específicas H1 que habrían sido marcadamente mayores hubieran utilizado un plásmido funcional.

Ejemplo 19. Construcción del plásmido pPJV2012

El plásmido pPJV2012 se construyó. pPJV2012 expresa las subunidades A y B de la toxina lábil al calor (LT) de *Escherichia coli* enterotoxigénica. La expresión de la toxina LT funcional de pPJV2012 *in vivo* se puede utilizar para mejorar la respuesta inmune a otras proteínas expresadas de los plásmidos co-administrados con pPJV2012.

LT es una proteína multimérica de 84 kD compuesta por una sola subunidad A y un pentámero de subunidades B idénticas. LT expresa y se secreta de *E. coli* y se une a la gangliosida GM1 en las células intestinales a través del pentámero de las subunidades B. La toxina se internaliza y la subunidad A después activa la producción de cAMP excesivo y la interrupción del balance de electrólitos a través del lumen intestinal (Tauschek, y otros (2002) Proc Natl Acad Sci, USA 99: 7066-7071). De esta forma para la actividad

biológica de LT expresada *in vivo* la producción de las subunidades A y B es requerida junto con señales para mediar la secreción de las células de expresión. Los vectores de plásmido que codificaban las subunidades A y B LT han demostrado que aumentan la respuesta inmune inducida a varios antígenos virales cuando se co-distribuye utilizando la distribución epidérmica mediada particular (Arrington y otros (2002) J Virol 76 (9): 4536-46).

Además de las secuencias de codificación para las subunidades A y B de la toxina LT, pPJV2012 también incorpora las secuencias promotoras quiméricas de la invención para asegurar la efectiva expresión del gen, una secuencia poli A de beta globina de conejo, secuencias de señal para mediar la secreción de las células de expresión, un gen de resistencia a canamicina y un origen bacteriano de replicación. El plásmido se muestra en la Figura 22.

El plásmido pPJV2012 se construyó a través de los siguientes pasos:

- Amplificación PCR de la secuencia de codificación A LT del ADN genómico *E. coli* e inserción en el plásmido intermedios;
- Escisión de la secuencia de codificación A LT y la inserción en un plásmido "aceptador" bajo el control del promotor CMV.
- Amplificación de PCR de la secuencia de

codificación B LT del ADN genómico *E. coli* e inserción en un plásmido intermedio bajo el control de un promotor CMV truncado.

- Escisión del casete de expresión A LT.

El plásmido resultante, pPJV2012, la expresión de ambas subunidades de LT en células de mamífero.

Secuencias promotora y potenciadora en pPJV2012

La subunidad A LT se expresó del promotor temprano inmediato CMV (IE). La subunidad B LT se expresó de un promotor IE CMV truncado. Las secuencias adicionales se incluyeron para ambos genes para mejorar la expresión, específicamente la UTR 5' HBV pre-S2 (Moriarty y otros (1981) Proc Natl Acad USA 78:2606-2610), el exón 1/2 CMV (consistiendo de los dos primeros exones CMV IE empalmados juntos a través de la eliminación del intrón natural), el intrón A de insulina de rata (Lomedico y otros (1979) Cell 2: 545-558) y poli A de beta globina de conejo (rGpA). Para asegurar la secreción de las células de expresión el péptido de señal de lisozima de pollo (CLSP; número de acceso de Genbank CR390743) ha sido insertado para ambas subunidades LT. Además, el potenciador env HBV (Vannice y Levinson (1988) J Virol. 62: 1305-1313) se insertó después de la subunidad A para mejorar la expresión.

Clonación de las subunidades A y B LT

Se obtuvo la cepa E078:H11 *E. coli* de TCC (catálogo

#35401), y las subunidades A y B se amplificaron a través de reacciones PCR separado utilizando cebadores homólogos a los extremos 5′ y 3′, diseñados por la referencia al archivo de acceso GenBank AB011677. Las secuencias de codificación generadas para ambas subunidades no incluyen las secuencias de codificación de los péptidos de señal bacterianos encontrados en el término amino. Los fragmentos de la subunidad A y B se ligaron separadamente en el plásmido WRG7054.

Construcción de pPJV2012

La secuencia de codificación A LT se extirpó y se ligó con la estructura del vector de pPJV7592, y un fragmento derivado de pPJV7572 que incluyó el promotor CMV, y las regiones no traducidas 5′ y CLSP. El plásmido resultante se designo A1. A1 se cortó y se ligó con un fragmento de pPJV7592 para recrear un sitio de clonación múltiple, y el plásmido resultante se designó como aceptor; esto proveyó el componente A LT de pPJV2012.

La secuencia de codificación B LT se extirpó y se ligó con la estructura del vector de pPJV7591 y a un fragmento derivado de pPJV7572 que contuvo el extremo 3′ de las regiones no traducidas y el CLSP. El plásmido resultante se designó como donante y proveyó el componente B LT de pPJV2012. Para generar pPJV2012 se ligó un fragmento del donador conteniendo el casete de expresión B LT con un

fragmento de vector derivado del aceptador. El plásmido resultante expresó tanto A y B LT en células de mamífero.

Origen de las Secuencias de Nucleótido en pPJV2012

pPJV2012 se secuenció y alineó completamente con las bases de datos para asignar el origen de cada secuencia. Las secuencias derivadas, mostradas en la Tabla 6 siguiente, fueron como se esperaba.

Tabla 6: Identificación de Componentes que Comprenden el Plásmido pPJV2012

Números Base	**Identificación del Componente**
1-905	Secuencia derivada de pUC4K incluyendo el gen de resistencia a canamicina
906-1038	Poli A de beta globina de conejo
1039-1351	Secuencia de codificación de la subunidad B LT
1352-1357	Secuencia enlazadora
1358-1417	Secuencia de señal de lisozima de pollo
1418-1538	UTR 5' de HBV pre-S2
1539-1544	Secuencia enlazadora
1545-1677	Intrón A de rata
1578-1683	Secuencia enlazadora
1684-1814	Exón ½ CMV
1815-1935	Promotor IE CMV truncado
1936-1947	Secuencia enlazadora
1948-2632	Promotor CMV
2633-2763	Exón ½ CMV
2764-2769	Secuencia enlazadora
2770-2902	Intrón A de insulina de rata
2903-2908	Secuencia enlazadora
2909-3029	UTR 5' de HBV pre-S2

3030-3089	Péptido de señal de lisozima de pollo
3090-3095	Secuencia enlazadora
3096-3818	Secuencia de codificación A LT
3819-3830	Secuencia enlazadora
3831-4363	Secuencia potenciadora HBV
4364-4374	Secuencia desconocida
4375-4050	Poli A de beta globina de conejo
4051-5578	Secuencia derivada de pUC19

Además de la búsqueda BLAST se llevó a cabo para homologías de secuencia para el genoma humano completo, buscando las similitudes de secuencia en alargamientos tan cortos como 19 bases. No hubo "similitudes significativas encontradas"; el grado más alto de homología fue con una secuencia de 68 bases de rGpA, aunque el alargamiento más largo de la secuencia idéntica fue solamente de 18 bases.

Comparación de la secuencia pPJV1671 con pPJV2012

La secuencia de pPJV2012 ha sido comparada con la de pPJV1671. Los resultados se demuestran en la Tabla 7 abajo.

376

Tabla 7: Comparación de la secuencia de pPJV2012 con pPJV1671

Números bases de la secuencia en pPJV2012	Secuencia también presente en la vacuna de ADN de influenza pPJV1671
1-896	Si
897-905	No
906-1038	Si
1039-1351	No
1352-1357	Si
1358-1417	No
1418-1538	Si
1539-1544	Si
1545-1677	Si
1578-1683	Si
1684-1814	Si
1815-1935	Si
1936-1947	Si
1948-2632	Si
2633-2763	Si
2764-2769	Si
2770-2902	Si
2903-2908	Si
2909-3029	Si
3030-3089	No
3090-3095	Si
3096-3818	No
3819-3830	Si
3831-4363	Si
4364-4374	Si
4375-4050	Si
4051-5578	Si

El análisis demuestra que 4418 de los 5578 pares de bases (79%) en pPJV2012 también están presentes en la vacuna de la DNA de influenza pPJV1671. Exclusivo para las secuencias de codificación para las subunidades A y B LT, 4418 de los 4544 bases par (97%) de pPJV2012 también están presentes en pPJV1671.

Observar que pPJV1671 ha experimentado estudios de biodistribución/integración y en cada caso no se encontró evidencia integración.

Ejemplo 20 - Construcción del plásmido pPJV7788 un plásmido que expresa las subunidades LT *E. coli* en células de mamífero

El plásmido pPJV7788 se generó utilizando los siguientes plásmidos:

pPJV7563 y pPJV7592 que son plásmidos derivados de pPJV7275, pPJV7284, pPJV7389, pPJV7586 y pPJV7293.

pPJV7590 que es un derivado de pPJV7389 que incluye un sitio de clonación múltiple (MCS) inmediatamente en dirección 5´ del promotor CMV.

pPJV7572 que es un derivado de pPJV7389 que contiene la secuencia de codificación para el péptido en señal del lisozima del pollo (CLSP) directamente en corriente ascendente del antígeno codificado. Esto permite la secreción extracelular de los antígenos fusionados c-terminalmente fundidos.

(i) Construcción de pPJV7785 (Plásmido aceptor LTA)

pPJV7563 se cortó con Sal1, se terminó en forma roma, y cortó con Nde1 para crear un fragmento de vector. pPJV7590 se cortó con Sph1, terminó en forma roma, y cortó con Nde1 para crear un fragmento de inserto conteniendo un MCS y los cinco extremos cebadores del promotor CMV. Estos fragmentos se ligaron para generar pPJV7592. pPJV7592 se cortó con Nco1 y Bgl2 para crear un fragmento de vector. pPJV7572 se cortó con Nco1 y Nhe1 para crear un fragmento de inserto conteniendo el extremo 3' del CMV, las regiones no traducidas 5', y el CLSP. pPJV2004 se cortó con Nhe1 y BamH1 para crear un fragmento de inserto conteniendo la subunidad LTA. Estos fragmentos se ligaron para generar el plásmido pPJV7785.

(ii) Construcción de pPJV7787 (Plásmido donador LTB)

pPJV7389 se cortó con Nco1 y EcoR1 para crear el fragmento vector. pPJV7572 se cortó con Nco11 y Nhe1 para crear un fragmento de inserto conteniendo el extremo 3' del promotor CMV, las regiones no traducidas 5', y el CLSP. pPJV2005 se cortó con Nhe1 y BamH1 para crear un fragmento de inserto conteniendo la subunidad LTB. pPJV7586 se cortó con Bgl2 y EcoR1 para crear un fragmento de inserto conteniendo la región de poliadenilación de beta-globina de conejo. Estos

fragmentos se ligaron para generar pPJV7787.

(iii) Construcción de pPJV7788

pPJV7785 se cortó con Xho1 y Mfe1 para crea un fragmento de vector conteniendo el casete de expresión LTA. pPJV7787 se cortó con Xho1 y EcoR1 para crear un fragmento de inserto conteniendo el casete de expresión LTB. Estos fragmentos se ligaron para generar pPJV7788 que expresará las subunidades LTA y LTB cuando se introducen en células de mamífero.

La Tabla 8 siguiente provee la ubicación de los varios elementos en la construcción pPJV7788.

Tabla 8: ID del Componente para pPJV7788

Números Bases	**Componente**
1-44	Tn903, remanentes pUC4K
45-860	KanR (Tn903)
861-983	Tn903, remanentes UC4K
984-1001	pUC19 MCS
1002-1686	CMV Pro
1687-1817	Exón 1/2 CMV
1818-1823	Fusión de Bam/Bgl
1824-1956	Intrón A de insulina de rata
1857-1962	Sitio BamH1
1963-2083	UTR 5' de HBV pre-S2
2084-2143	Lisozima SP

380

2144-2149	Sitio Nhe1
2150-2462	LTB
2463-2593	RBGpA
2594-2623	Sitio de Clonación Múltiple
2624-3308	CMV Pro
3309-3439	Exón ½ CMV
3440-3445	Fusión Bam/Bgl
3446-3578	IntA de Ins de Rata
3579-3584	BamHl
3585-3705	UTR 5' de HBV pre-S2
3706-3765	Lisozima SP
3766-3671	Sitio Nhe1
3772-4494	LTA
4495-4506	Polienlazador
4507-5039	HBV enh
5040-5050	Origen desconocido
5051-5181	rGlob pA
5182-5187	Sitio EcpR1
5188-6254	pUC19

Ejemplo 21 - Construcción de pPML7789, un Plásmido que Expresa la Proteína de Hemaglutinina H5/VN1194 en células de mamífero

Se generó una construcción adicional, pPML7789, capaz de expresar H5/proteína hemaglutinina VN1194 utilizado

381

un promotor quimérico de la invención. La construcción pPJV7563 descrita en el Ejemplo 5 se utilizó como la estructura para la construcción pPML7789.

Se utilizó un plásmido conteniendo la secuencia de codificación para el gen HA H5/VN1194 como la plantilla para PCR. Los cebadores PCR se diseñaron con sitios en el quinto y tercer extremos primeros para permitir la inserción en pPJV7563. pPJV7563 se cortó con Nhel y Bspl20I para generar un fragmento de vector. El fragmento PCR amplificado de la plantilla H5/VN1194 se cortó con las mismas enzimas para generar un fragmento de inserto. Estos dos fragmentos se ligaron para producir pPML7789. Las secuencias de codificación y flanqueo se verificaron a través de secuenciación.

Las posiciones del nucleótido de los varios elementos en pPML7789 se indican en la Tabla 9 siguiente.

Tabla 9: Componentes de la Construcción pPML7789

Posición del Nucleótido	**Elemento**
Inicio: 1 Final: 44	Tn903, Remanentes pUC4K
Inicio: 45 Final: 860	Kano (Tn903)
Inicio: 861 Final: 896	Tn903, Remanentes pUC4K
Inicio: 897 Final: 902	pUC19 MCS
Inicio: 903 Final: 1587	CMV Pro
Inicio: 1588 Final: 1718	CMV Exón ½
Inicio: 1719 Final: 1724	Fusión Bam/Bg1

Inicio: 1725 Final: 1857	Intrón A de Insulina de Rata
Inicio: 1858 Final: 1863	Sitio BamH1
Inicio: 1864 Final: 1984	UTR 5' de HBV pre-S2
Inicio: 1985 Final: 1993	ATG-Nhe
Inicio: 1994 Final: 3699	VN1194H5

Ejemplo 22. Respuestas inmunes celulares protectoras potentes generadas a través de la inmunización de ADN con HSV-2 ICP27 y la toxina lábil al calor E. coli

Materiales y métodos

Virus

Se hicieron crecer los virus HSV-2 (cepa MS, ATCC VR-540 y cepa G HG52 donación de Nancy Sawtell, Universidad of Cincinnati) en las células VERO (ATCC CCL-81) y se purificaron en gradientes de sacarosa antes de uso.

Vacuna de ADN y vectores DEI

El plásmido que codifica HSV-2 ICP27 (Figura 27) se generó a través de la inserción de un fragmento PCR incorporando el gen ICP27 completo (UL54) en un pTarget (Promega, Madison WI). El fragmento PCR se amplificó del ADN genómico purificado de la cepa MS de HSV-2 utilizando los cebadores 5' (GCCACTCTCTTCCGACAC, SEC ID NO:63) y 3' (CAAGAACATCACACGGAAC, SEC ID NO:64). Las secuencias amplificadas correspondieron a los nucleótidos 114,523 a 116,179 de la secuencia del genoma publicada del clon HG52 de HSV-2 (número de acceso al GenBank NC_ 001798). El pICP27 se

secuenció en su totalidad a través de la instalación central de secuenciación de ADN en la Universidad de Wisconsin, Madison.

El Plásmido PJV2012 codifica ambas subunidades A y B de LR de un solo vector y se demuestra en La Figura 22. La construcción de pPJV2012 se describe en el Ejemplo 19. En pPJV2012, el gen de la subunidad A LT se expresó a partir de una unidad de transcripción que consiste de los siguientes componentes: el promotor temprano inmediato de citomegalovirus (hCMV), los exones 1 y 2 fusionados de hCMV (no de codificación), intrón A de insulina de rata, la región no-codificación 5' del virus de la hepatitis B (HBV) del gen pre-S2, el codón ATG, la secuencia de codificación de péptido de señal del lisozima, la secuencia de codificación de subunidad A LT, la región mejoradora transcripcional HBV no-codificación 3', y la secuencia de poliadenilación de beta globina de conejo.

pPJV2012 también codifica el producto de la subunidad B LT de una segunda unidad de transcripción que corre en dirección opuesta (Figura 22). La unidad de transcripción B LT es similar a aquella que codifica el producto A LT pero no contiene copias adicionales de los elementos potenciadores transcripcionales hCMV y HBV. Los elementos potenciadores hCMV localizados en la unidad de transcripción A LT también sirven a la unidad de

transcripción B LT.

El plásmido PJV2013 (no mostrado) es similar a pPJV2012 pero codifica ambos productos de la subunidad A y B de la toxina del cólera de un solo vector. El mapa funcional pPJV2013 es idéntico a aquel mostrado para pPJV2012 en la Figura 22.

Vacunación de ADN a través de distribución epidérmica mediada por partícula (PMED)

La vacunación de ADN PMED de ratones Balb/c hembras de 6 a 8 semanas de edad fue como previamente se describió (Arrington y otros, J. Virol. 76, 4536-4546, 2002) excepto que cada inmunización consistió de una sola distribución PMED en la piel abdominal ventral en donde cada distribución contuvo 0.5 mg de oro cubierto con un total de 0.5 µg de la vacuna de ADN/formulación de vector DEI. Se administraron dos inmunizaciones de "una sola inyección" en 4 semanas separadas, y los animales se sacrificaron o se atacaron 2 semanas después de la segunda inmunización o inmunización de "refortalecimiento".

Grupos de péptido y péptidos

Las secuencias de aminoácido derivadas de ICP27 del virus de la cepa MS se utilizaron como una plantilla para la colección. La proteína ICP27 está altamente conservada entre las secuencias HG52 y MS (ver Figura 28 y SEC ID NO:65) de esta forma la colección podría capaz de detectar respuestas

de ambas cepas. Una colección de péptidos se sintetizó (Mimotopes, Fisher Scientific) para abarcar la secuencia completa de ICP27 utilizando péptidos de 18 aminoácidos en longitud que tuvieron un traslape de 11 aminoácidos con el péptido adyacente. Se hicieron un total de 72 péptidos.

Para facilitar la identificación de los péptidos positivos la colección se dividió en grupos de péptido utilizando la estrategia descrita por Tobery y otros J. Immunol. Methods 254, 59-66, 2001. Los grupos de péptidos se generaron utilizando el patrón mostrado en la Tabla 10. Hubo 12 grupos (nominados C1-C12) con 6 péptidos por grupo y 6 grupos (R1-R6) con 12 péptidos por grupo. Los grupos conteniendo los péptidos #45 y #46 están en tipo en negritas.

Tabla 10: Composiciones de Grupo de Péptidos

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
R1	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
R2	25	27	29	31	33	35	37	39	41	43
R3	49	51	53	55	57	59	61	63	65	67
R4	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22
R5	28	30	32	34	36	38	40	42	44	**46**
R6	52	54	56	58	60	62	64	66	68	70

	C11	C12
R1	21	23
R2	45	47
R3	69	71
R4	24	26
R5	48	50
R6	72	2

Ensayos ELISPOT

Los ensayos de IFN-γ ELISPOT se llevaron a cabo en esplenocitos frescos y células de nodo linfoide como se describió previamente excepto que los antígenos para la estimulación fueron péptidos individuales o grupos de péptidos como se definió para cada experimento en la sección de resultados. En algunas instancias, antes del ensayo ELISPOT, las poblaciones de células T se redujeron a través de perlas magnéticas (Dynal) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Ensayos del arreglo de perlas citométricas (CBA)

Se recolectaron esplenocitos frescos dos semanas después de la segunda inmunización y se volvieron a suspender a 1 x 10^7 células por ml en SM (medio RPMI + 10% de suero bovino fetal suplementado con piruvato de sodio MEM, aminoácidos no esenciales, y el 2-mercaptoetanol (Invitrogen, Carlsbad, CA)). Las muestras de célula se colocaron en placas a 1 x 10^6 células (100 µl) por cavidad en 96 placas de fondo plano de 96 cavidades. Los esplenocitos se trataron con 100 µl de alícuotas del péptido ICP27 en SM o medio solo. La concentración de péptido final fue de 10^{-8} M. Los esplenocitos de control de animales y de expertos también se colocaron en placas con o sin péptido y con y sin Con-A (2.5 mg/ml concentración final) para servir como controles negativo y positivo, respectivamente.

Las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas y después se recolectaron 160 µl de cada muestra y se almacenaron a -20°C hasta que se ensayaron utilizando el kit Th1/Th2 de ratón del arreglo de perlas Citométrico BD (CBA) (BD Biosciences, San Jose, CA (cat. #551287)). Brevemente, este equipo utilizó 5 poblaciones de perlas con distintas intensidades de fluorescencia cubiertas con anticuerpos de captura específicos para ratón IL-2, IL-4, IL-5, INF-γ, y TNF-α. Las cinco poblaciones de perla se mezclaron para formar el arreglo que se resuelve en el canal FL3 del citómetro de flujo de BD FACSCalibur. Las perlas capturadas por la citosina se mezclaron con los anticuerpos de detección conjugados con PE y después se incubaron con muestras estándares o de prueba para formar complejos emparedados. El software de análisis BD CBA se utilizó para generar los resultados después de la adquisición de la muestra. La intensidad de la muestra para cada citocina se comparó con las curvas estándar para facilitar la cuantificación de las concentraciones de citocina. Las muestras se corrieron puras o a una dilución de 1:10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Reto del virus HSV-2

Los ratones Balb/c anestesiados se retaron intranasalmente con 30 µl de PBS conteniendo aproximadamente $50LD_{50}$ (2×10^6 PFU) de la cepa HSV SM. Los ratones fueron

seguidos durante 20 días después de la infección y se clasificaron para morbidez y la mortalidad. La morbidez se clasificó sobre una escala de 0 a 4 de acuerdo con el siguiente programa: 4, saludable; 3, pelo rizado, estornudo; 2, erupción en los ojos o pata trasera, movimiento reducido; 1, encorvado, poco movimiento; 0, muerto. Los ratones después se trataron con IFN-γ (eBioscience, San Diego, CA (cat. # 16-7311) y/o anticuerpos monoclonales específicos TNF-α (cat. # 16-7332) alrededor del tiempo del ataque recibido inyecciones intraperitoneales conteniendo 90 µg del anticuerpo en los días -2, 0, 2, 4, 6, y 8 con relación al ataque del virus. En los experimentos, de eliminación de la célula T, los ratones recibieron inyecciones intraperitoneales conteniendo 200 µg del anticuerpo específico para cualquiera de las poblaciones CD4 o CD8 en los días -2 y 0 con relación al ataque del virus (CD4 anti-ratón purificado de grado funcional, eBioscience Cat#: 16- 0041; CD8 anti-ratón purificado de grado funcional, eBioscience; Cat#: 16-0081).

Resultados

Identificación de un epítopo CD8 fuerte en ratones Balb/c.

Para identificar las respuestas de la célula T contra la proteína ICP27, se llevó a cabo un ensayo IFN-γ ELISPOT sobre células recuperadas de ratones Balb/c y C57B1/6 infectados con una cepa atenuada de HSV-2 (cepa G HG52). Se

utilizó una colección de péptidos compuesta de péptidos que abarcan la longitud completa de la secuencia de codificación ICP27 para estimular las células T. Los péptidos fueron de 18 aminoácidos en longitud y se traslaparon los péptidos contiguos por 11 aminoácidos. Los grupos de péptido se compusieron de ya sea 6 péptidos (grupos C1-C12) o 12 péptidos (grupos R1-R6) como se describe en materiales y métodos y la Tabla 10, una configuración que facilita la identificación de péptidos positivos dentro de la colección. Se recuperaron las células del bazo y nodos linfoides de los ratones Balb/c 7 días después de la infección que mostraron respuestas muy fuertes a los péptidos dentro de los grupos C10, C11, R2 y de R5 (Figura 29A) con respuestas más débiles en varios otros grupos. Solamente se detectaron las respuestas débiles en células recuperadas de ratones C57B1/6. El patrón de respuestas positivas se encontró que es similar a las poblaciones de células de bazo y de nodo linfoide ensayadas.

Con base en los resultados de IFN-γ ELISPOT, se pronosticaron dos péptidos adyacentes (#45, #46) para contener el epítopo de célula T dominante. Esto se confirmó a través de la prueba de cada péptido individualmente (datos no mostrados). Los péptidos 45 y 46 estimularon una secreción IFN-γ fuerte y contuvieron una secuencia de 9 aminoácido homólogos HGPSLYRTF (Figura 29B, SEC ID NO:68) que se

pronostica que se une al alelo Dd. Interesantemente, el péptido 46 también contiene una región que corresponde a un epítopo descrito previamente en los ratones de Balb/c para ICP27 de HSV-1 (Banks y otros, J. Virol. 67, 613-616, 1993). La comparación de las secuencias ICP27 en HSV-1 y HSV-2 mostraron que la regiones difieren por un solo aminoácido; el residuo de alanina (a) en HSV-2 ICP27 (LYRTF AANPRA, SEC ID NO:69) se remplazó por una glicina (G) en HSV-1 (LYRTF AGNPRA, SEC ID NO:70). La región, sin embargo, no está presente en el péptido 45 aún cuando que este péptido estimula una respuesta extremadamente fuerte.

Para determinar la importancia relativa de los dos epítopos potenciales en el péptido 46 en el ensayo de IFN- γ ELISPOT, los péptidos LYRTF AANPRA y el HGPSLYRTF se sintetizaron y se probaron. Las células de bazo aisladas de los ratones infectados respondieron fuertemente al péptido HGPSLYRTF, pero no se detectó ninguna respuesta por arriba del fondo para la secuencia LYRTFAANPRA. Al utilizar perlas magnéticas para eliminar las poblaciones de célula T antes del ensayo IFN-γ ELISPOT, dio como resultado una respuesta CD8+ ICP27 fuerte. Los datos indican que se genera una respuesta CD8 fuerte en ratones Balb/c hacia la proteína HSV-2 ICP27 que es específica para la secuencia HGPSLYRTF.

Respuestas inmunes in vitro a la vacuna ICP27

Se generó una vacuna de ADN, "pICP27", utilizando

las secuencias ICP27 de la cepa MS de HSV-2 (Figura 27). La construcción secuenciada tuvo solamente dos diferencias del nucleótido de la secuencia de gen HG52 ICP27 publicada (Figura 28). Hubo un cambio de G a A en el nucleótido 57 que podría ser silencioso, y un cambio de A a C en 484 que podría cambiar una lisina en la cepa HG52 a una asparagina en la versión del MS. De esta forma, la proteína ICP27 de la cepa MS expresada de la vacuna de ADN podría ser casi idéntica a la versión de la cepa HG52 de la proteína sin diferencias en la región del epítopo CD8 putativo.

La vacuna de ADN pICP27 se utilizó para inmunizar ratones Balb/c y C57B1/6 a través de PMED. Los esplenocitos y las células de nodos linfoides se probaron en el ensayo IFN-γ ELISPOT contra el panel de grupos descritos en La Figura 29. El patrón de las respuestas positivas a los péptidos ICP27 encontrado en ratones inmunizados ADN fue iguales que aquellos encontrados en los ratones infectados (datos no mostrados).

Respuestas in vivo a la vacuna de ICP27

La actividad in vivo de las respuestas inmunes generadas por la vacunación de ADN pICP27 se estudió en un modelo de infección intranasal profiláctico en ratones de Balb/c. La infección con las varias dosis de la cepa MS de HSV-2 en ratones Balb/c de 12 semanas de edad estableció un LD_{50} de aproximadamente 3×10^4 PFU (datos no demostrados). En

los experimentos de protección de ADN, se utilizó una dosis de ataque de virus de 50 LD_{50} porque esta dosis consistentemente dio como resultado 100% de mortalidad en animales sin experiencia.

Una serie de experimentos demostró que la inmunización con ADN pICP27 solo (principal y refortalecimiento) tuvo habilidad limitada para proteger a los ratones. Por consiguiente, para mejorar los vectores de protección DEI que codifican la toxina de cólera (CT) o la toxina lábil al calor de E. coli (LT) se co-distribuyeron con la vacuna de ADN ICP27. Las subunidades de la toxina A y B se expresaron del mismo plásmido para cada una de las dos toxinas.

Los ratones se inmunizaron con la vacuna de ADN ICP27, ya sea sola, o suplementada con los vectores CT o LT DEI a una relación de 9:1 (0.45 µg de ADN de antígeno + 0.05 µg de ADN del vector DEI). Se utilizan un total de 16 animales por el grupo de inmunización, la mitad de los cuales se ataco con el virus y la otra mitad se sacrificó en el momento del ataque para producción de citosina específica del ICP27.

Los resultados de este estudio se muestran en La Figura 31. Los resultados muestran que la inmunización con ICP27 + de CT y ICP27 solamente proveen una protección parcial y no protección, respectivamente, mientras el 100% de

la protección se observó para la formulación ICP27 + LT (Figura 31A). Estos resultados confirman que la co-distribución de los vectores DEI con el vector ICP27 mejora la protección y refuerza la superioridad de LT sobre CT como un immunoestimulador en la inmunización de la ADN. La cuantificación de la producción de citocina después de la estimulación in vitro con el péptido epítopo CD8 utilizando el kit CBA demostró una buena correlación entre la supervivencia del ataque y los niveles tanto de INF-γ (Figura 31B) y TNF-α (Figura 31C).

El papel de las citocinas y las poblaciones de célula T

El papel de la producción específica de ICP27 de IFN-γ o TNF-α en la protección de animales atacados se evaluó. Los animales vacunados con pICP27 + pPJV2012 (LT) se trataron con INF-γ y/o anticuerpos monoclonal específicos de TNF-α por varios días alrededor del tiempo del ataque para neutralizar las citocinas in vivo. Los datos de morbidez se muestran en La Figura 32. Como antes, los animales que recibieron dos vacunaciones ICP27 + de LT DEI estuvieron completamente protegidos del ataque y exhibieron solamente una morbidez temporal ligera (pelo rizado en 1 de 4 animales) mientras el 100% de los ratones inexpertos o ratones inmunizados con el vector pICP27 solo sucumbieron al ataque. En el grupo inmunizado con la formulación ICP27 + de LT DEI y

subsecuentemente tratados con anti-TNF-α, se observó una muerte inmediatamente después de la inoculación del ataque intranasal debido a las complicaciones de la anestesia. De forma importante, los tres ratones restantes mostraron solamente el rizado de pelo temporal y recuperaron completamente indicando que la producción de TNF-α probablemente no contribuye significativamente a la protección. En contraste, los dos grupos de ratones inmunizados con ICP27+LT DEI que recibieron anti-IFN-γ o anti-IFN-γ + anti-TNF-α en el momento del ataque se hicieron intensamente mórbidos y 7 de los 8 animales murieron, demostrando claramente la importancia de IFN-γ como mediador esencial de la protección.

Para examinar el papel de las poblaciones CD4 y CD8 en la protección, se utilizaron los anticuerpos CD4 o CD8 para eliminar estas poblaciones antes del ataque infeccioso (Figura 33). Cuando los ratones fueron seguidos para mortalidad durante 20 días emergió un patrón interesante. Como se esperaba, a los ratones que se les dio pICP27 con un vector vacío no estuvieron significativamente protegidos de la infección. La vacunación pICP27+LT DEI proveyó 100% de supervivencia, mientras la remoción de ambas células CD4 y CD8 de los ratones inmunizados similarmente abrogaron los efectos protectores de la vacunación e hicieron a los ratones susceptibles de aproximadamente el mismo nivel que los

ratones sin experiencia. En los ratones inmunizados con la vacuna pICP27+LT DEI, la eliminación de la población CD8 antes de la infección causó que los ratones sucumbieran a la infección indicando un papel importante de estas células en la protección de la infección o encefalitis. En los ratones vacunados con pICP27+LT DEI, la eliminación de la población CD4 introdujo un retraso de nueve (con relación a los ratones no experimentados) antes de que estos ratones también se enfermaran y murieran, sugiriendo un papel de las células T CD4 para una supervivencia a largo plazo.

Ejemplo 23: Inmunogenicidad de la vacuna de ADN a H5N1 de Influenza en ratones

Materiales y métodos

El plásmido de ADN pPML7789 (Ejemplo 21, Figura 20) codifica el HA del virus de influenza A/Vietnam/1194/2004 [H5N1] se precipitó sobre partículas de oro y se distribuyó a los ratones a través de una distribución epidérmica mediada por partícula (PMED) utilizando la tecnología de distribución propietaria de PowderMed. La distribución se efectuó con o sin, como un adyuvante, un plásmido pPJV2012 adicional (Ejemplo 19, Figura 22) codificando las subunidades A y B de toxina lábil al calor E. coli. Cuando pPJV2012 está presente, este plásmido adicional y el plásmido pPML7789 se precipitaron en las mismas partículas de oro. Se logró primero premezclando pPJV2012 y pPML7789 en una forma líquida

a una relación de peso de 1:9 y después co-precipitando los plásmidos sobre una población de partículas de oro. Con un control negativo, las partículas del oro en las cuales no se había precipitado ningún plásmido se distribuyeron a través de PMED. Los ratones fueron como sigue:

Cepa: ratones Balb/C

Número: 36

Género: Hembras

Escala de peso: 15.0-19.6 g (en el día del primer procedimiento)

Edad: 42-49 días (en el día de la llegada)

Dieta: gránulos RM1

Proveedor: Charles River UK Ltd

Los ratones se dividieron en seis grupos como se muestra en la Tabla 11 siguiente. Los procedimientos se llevaron a cabo en los ratones y en los días en los cuales los procedimientos tomaron lugar se muestran en la Tabla 12 siguiente. Se llevó a cabo un ensayo HAI en el suero de acuerdo con procedimientos estándares.

Tabla 11: Asignación del Grupo de Tratamiento para Animales

No. de Grupo	Ruta de Administración	No. de animales en cada grupo	Tratamiento
1	Epidemialmente	6	Control negativo 1 dosis Día de sangrado-1, sangrado y selección Día 14
2	Epidemialmente	6	Control negativo 2 dosis Día de sangrado-1 y 21, sangrado y selección Día 36
3	Epidemialmente	6	pPML7789 1 dosis Día de sangrado-1, sangrado y selección Día 14
4	Epidemialmente	6	pPML7789 2 dosis Día de sangrado-1 y 21, sangrado y selección Día 36
5	Epidemialmente	6	pPML7789+pPJV2012 1 dosis Día de sangrado-1, sangrado y selección Día 14
6	Epidemialmente	6	pPML7789+pPJV2012 2 dosis Día de sangrado-1 y 21, sangrado y selección Día 36

Tabla 12: Se llevaron a cabo los siguientes Procedimientos en los Días Marcados con X

Día del Estudio	0	14	21	35
Implantación del transpondedor	X			
Peso corporal	X	X	X[-b]	X[-b]
Vacunación	X		X[-b]	
Puntuación de salud	X	X	X[-b]	X[-b]
Suero para anticuerpo	X	X[-a]	X[-b]	X[-b]
Bazos de cosecha		X[-a]		X[-b]
Clasificación		X[-a]		X[-b]

[a] Grupos 1, 3 y 5 solamente

[b] Grupos 2, 4 y 6 solamente

Resultados

Se determinaron las concentraciones de HAI contra el virus NIBRG-14 [H5N1]

Todos los controles se observaron estando dentro los límites aceptables. El artículo del control negativo (virus NIBRG-14 [H5N1]) fue negativo en todas las placas. El artículo del control positivo (glóbulos rojos de pavo) fue positivo en todas las placas. El segundo artículo de control positivo (suero conteniendo anticuerpos al virus de influenza A/Pollo/Escocia/59 [H5N1]) corrieron en todas las placas a una media geométrica de 28, de 40, de 56 o de 80HAIU (dentro de los límites aceptables de 40 HAIU +/- 2 veces). Todas las muestras en los días 0, 14 y 21 fueron <10HAIU (por debajo del límite de detección) con la excepción ID:1074 (grupo 6) en el día 21 que no se pudo sangrar, y ID:1059 (grupo 4) en el día 21 para el cual se obtuvo suero insuficiente para llevar a cabo el ensayo.

Para los sangrados del día 35, con la excepción de ID: 1074 (grupo 6) que no se pudo sangrar, la concentración promedio geométrica de cada muestra se calculó, junto con la media aritmética por grupo, la desviación media y estándar para cada grupo. Estos se muestran en la Tabla 13 siguiente.

Tabla 13: Concentración HAI para los Grupos 2, 4 y 6 del Suero obtenido en el Día 35

Grupo	No. de Muestra	Concentración Promedio GEO	Media Aritmética	Media	SD
2	1047	<10			
	1048	<10			
	1049	<10	<10	<10	0
	1050	<10			
	1051	<10			
	1052	<10			
4	1059	28			
	1060	40			
	1061	40	28	24	10
	1062	20			
	1063	20			
	1064	20			
6	1071	160			
	1072	226			
	1073	160	164	160	40
	1074	*			
	1075	160			
	1076	113			

* Datos no disponibles debido a la muerte prematura de un animal

Los resultados muestran que el plásmido pPML7789 es inmunogénico en ratones y que esta inmunogenicidad se mejora a través de la inclusión de pPJV2012.

Por consiguiente, las construcciones de ácido nucleico novedosas, composiciones que comprenden varias construcciones, y las técnicas de inmunización de ácido nucleico utilizan estas construcciones se han descrito. Aunque las modalidades preferidas del tema de la invención han sido descritas con algún detalle, se entiende que se pueden hacer variaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

400

REIVINDICACIONES

1.- Una construcción de ácido nucleico adecuada para distribuirla a un sujeto para inducir una respuesta inmune contra el antígeno de hemaglutinina del virus de influenza (HA), caracterizada porque comprende:

(iii) una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en el lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV;

(iv) una secuencia de codificación operablemente enlazada con el promotor quimérico, en donde la secuencia de codificación codifica un antígeno de hemaglutinina del virus de influenza (HA), un fragmento inmunogénico del mismo, o una variante inmunogénica de dicho antígeno o fragmento que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido al antígeno o fragmento;

(iii) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia del antígeno HBVpreS2, la secuencia del e-antígeno HBV o la secuencia del antígeno del tipo 2gD HSV y que está operablemente enlazada al promotor quimérico;

y

(iv) la secuencia potenciadora que se deriva de la región no traducida 3' (UTR) de una secuencia HBsAg o de una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, que está operablemente enlazada con el promotor quimérico y que está en corriente descendiente de la secuencia de codificación.

2.- La construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica más de una de la HA, fragmento o variante inmunogénica.

3.- La construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica una HA, fragmento o variante de cada una de las tres a cinco cepas de influenza diferentes.

4.- La construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica una HA, fragmento o variante de cada una de las tres o cuatro cepas de influenza no-pandémicas.

5.- La construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica una HA, fragmento o una variante de una cepa de influenza pandémica.

6.- Las partículas portadoras caracterizadas porque están cubiertas con una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

7.- Las partículas portadoras caracterizadas porque están cubiertas con al menos dos diferentes construcciones de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 1, en donde cada construcción codifica una HA, fragmento o variante de una cepa de influenza diferente.

8.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 7, caracterizadas porque están cubiertas con de tres a cinco diferentes construcciones.

9.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 8, caracterizadas porque tres o cuatro de las construcciones codifican una HA, fragmento o variante de diferentes cepas de influenza no pandémicas.

10.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizadas porque están cubiertas con una construcción que codifica un HA, fragmento o variante de la cepa de influenza pandémica.

11.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 6 a 10, caracterizadas porque también están cubiertas con una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada con el

promotor, en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con una actividad adyuvante o una variante de cualquiera de las mismas que tienen actividad adyuvante y que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido con la subunidad o fragmento.

12.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 11, caracterizadas porque la secuencia promotora es una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal del hCMV.

13.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 11 o 12, caracterizadas porque la subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP se selecciona de la subunidad A de toxina de cólera, de la subunidad B de toxina de cólera, de la subunidad A de toxina lábil al calor E. coli y de la subunidad B lábil al colar E. de coli.

14.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 11 a 13, caracterizadas porque la construcción de ácido nucleico comprende dos secuencias de

codificación cada una comprendiendo una subunidad, fragmento o variante diferente.

15.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 14, caracterizadas porque las dos secuencias de codificación codifican la subunidad A de toxina del cólera y la subunidad B de toxina de cólera respectivamente o la subunidad A de toxina lábil al calor E. coli, y la subunidad B lábil al calor E. respectivamente.

16.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizadas porque la construcción de ácido nucleico además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia del antígeno HBVpreS2, una secuencia e-antígeno HBV o una secuencia de antígeno de tipo 2gD HSV y que está operablemente enlazada con el promotor quimérico; y

(b) una secuencia potenciadora que se deriva de la región no traducida 3' (UTR) de una secuencia HBsAg o la secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, que está operablemente enlazada con el promotor quimérico y que está en dirección 3'de la secuencia de codificación.

17.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 6 a 16, caracterizadas porque son partículas de oro.

18.- Un receptáculo de dosificación para un dispositivo de distribución mediado por partícula

caracterizado porque comprende partículas cubiertas de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17.

19.- Un dispositivo de distribución mediado por partículas caracterizado porque está cargado con partículas cubiertas de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 17.

20.- Un dispositivo de distribución mediado por partículas de conformidad con la reivindicación 19, caracterizado porque es una jeringa sin aguja.

21.- Una construcción de ácido nucleico para distribuirla a un sujeto para inducir una respuesta inmune contra el antígeno de hemaglutinina del virus de influenza (HA), caracterizada porque la construcción comprende:

(i) una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) el intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(iii) una secuencia de codificación operablemente enlazada con el promotor quimérico, donde la secuencia de codificación codifica un antígeno de hemaglutinina del virus

406

de influenza (HA), un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica del antígeno o fragmento que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido para el antígeno o fragmento.

22.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque además comprende:

(iii) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia e-antígeno HBV, o la secuencia de antígeno de tipo 2gD HSV y que está operablemente enlazada con el promotor quimérico; o

(iv) una secuencia del potenciador que se deriva de la región no traducidas 3' (UTR) de una secuencia HBsAg o de una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, que está operablemente enlazada con el promotor quimérico y que está en dirección 3´ de la secuencia de codificación.

23.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 21 o 22, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica más de una de la HA, fragmento o la variante inmunogénica.

24.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 23, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica una HA, fragmento o variante de cada una de las tres a cinco diferentes cepas de influenza.

25.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 24, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica una HA, fragmento o variante de cada una de las tres o cuatro cepas de influenza no pandémicas.

26.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica una HA, fragmento o variante de una cepa de influenza pandémica.

27.- Las partículas portadoras caracterizadas porque están cubiertas con una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 26.

28.- Las partículas portadoras caracterizadas porque están cubiertas con al menos dos diferentes construcciones de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 21, caracterizada porque cada construcción codifica una HA, fragmento o variante de una cepa de influenza diferente.

29.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 28, caracterizadas porque que están cubiertas con de tres a cinco diferentes construcciones.

30.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 29, caracterizadas porque tres o cuatro de

las construcciones codifican una HA, fragmento o variante de diferentes cepas de influenza no pandémicas.

31.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30, caracterizadas porque están cubiertas con una construcción que codifica un HA, fragmento o variante de la cepa de influenza pandémica.

32.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 27 a 31, caracterizadas porque también están cubiertas con una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada con la promotora, en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con una actividad adyuvante o una variante de cualquiera de las mismas que tienen actividad adyuvante y que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido con la subunidad o fragmento.

33.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 32, caracterizadas porque la secuencia promotora es una secuencia promotora quimérica que comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la

región del intrón A del gen temprano inmediato principal del hCMV.

34.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 32 o 33, caracterizadas porque la subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP se selecciona de la subunidad A de toxina de cólera, de la subunidad B de toxina de cólera, de la subunidad A de toxina lábil al calor E. coli y de la subunidad B lábil al calor E. de coli.

35.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 32 a 34, caracterizada porque la construcción de ácido nucleico comprende dos secuencias de codificación cada una comprendiendo una subunidad, fragmento o variante diferente.

36.- Las partículas portadoras de conformidad con la reivindicación 35, caracterizadas porque las dos secuencias de codificación codifican la subunidad A de toxina del cólera y la subunidad B de toxina de cólera respectivamente o la subunidad A de toxina lábil al calor E. coli, y la subunidad B lábil al calor E. respectivamente.

37.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 36, caracterizadas porque la construcción de ácido nucleico además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia del antígeno HBVpreS2, una secuencia e-antígeno HBV o una secuencia de antígeno de tipo 2gD HSV y

que está operablemente enlazada con el promotor quimérico; y/o

(b) una secuencia potenciadora que se deriva la región no traducidas 3' (UTR) de una secuencia HBsAg o la secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, que está operablemente enlazada con el promotor quimérico y que está en corriente descendiente de la secuencia de codificación.

38.- Las partículas portadoras de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 27 a 37, caracterizadas porque son partículas de oro.

39.- Un receptáculo de dosificación para un dispositivo de distribución mediado por partícula caracterizado porque comprende partículas cubiertas de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 38.

40.- Un dispositivo de distribución mediado por partículas caracterizado porque está cargado con partículas cubiertas de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 27 a 38.

41.- Un dispositivo de distribución mediado por partículas de conformidad con la reivindicación 40, caracterizado porque es una jeringa sin aguja.

42.- Una construcción de ácido nucleico caracterizada porque comprende una secuencia promotora quimérica y una secuencia de codificación operablemente

enlazada con el promotor quimérico, en donde la secuencia de codificación codifica un antígeno del virus de influenza, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica del antígeno o fragmento que tiene al menos 80% de homología de aminoácido al antígeno o fragmento y la secuencia promotora quimérica comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en el lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV.

43.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 42 caracterizada porque el antígeno codificado es hemaglutinina de influenza (HA), un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica con al menos 80% homología de secuencia de aminoácido a cualquiera.

44.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque el antígeno codificado es neuraminidasa de influenza (NA), M2, un fragmento inmunogénico de ambos o una variante inmunogénica que tiene al menos 80% de homología de secuencia de aminoácido a cualquiera de NA, M2 o fragmento.

412

45.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, caracterizada porque el antígeno de influenza, el fragmento inmunogénico o la variante es de una cepa de influenza pandémica.

46.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 45, caracterizada porque la construcción codifica más de un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico o una variante inmunogénica.

47.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 46, caracterizada porque la construcción codifica un antígeno de influenza pandémica, un fragmento inmunogénico del mismo, o una variante inmunogénica del antígeno o fragmento y uno o más antígenos de influenza no pandémicos, fragmento(s) inmunogénico del mismo o variante(s) inmunogénica del antígeno(s) o fragmento(s).

48.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 46 o 47, caracterizado porque al menos dos de los diferentes antígenos, fragmentos o variantes codificados son del mismo polipéptido de influenza de diferentes cepas del virus de influenza.

49.- Una construcción de ácido nucleico caracterizada porque comprende una secuencia promotora quimérica y una secuencia de codificación operablemente

413

enlazada con el promotor quimérico, en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con una actividad adyuvante o una variante de cualquiera de estos que tiene actividad adyuvante y que tiene al menos 80% de homología de aminoácido con la subunidad o fragmento y la secuencia promotora quimérica comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata del hCMV;

(b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV.

50.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49, caracterizado porque la subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP se selecciona de la subunidad A de toxina de cólera, la subunidad B de toxina de cólera, la subunidad A de toxina lábil al calor E. coli, y la subunidad B lábil al calor E. coli.

51.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49 o 50, caracterizada porque la construcción de ácido nucleico comprende dos secuencias de codificación con cada una comprendiendo una

subunidad diferente, fragmento o variante y cada una operablemente enlazada al promotor quimérico.

52.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 51, caracterizada porque las dos secuencias de codificación codifican una subunidad A de toxina de cólera, y una subunidad B de toxina de cólera respectivamente o una subunidad A de toxina lábil al calor E. coli y la subnidad B lábil al calor E. coli respectivamente.

53.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 51 o 52, caracterizada porque las dos secuencias de codificación están en orientación inversa.

54.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 51 o 52, caracterizada porque las dos secuencias de codificación están en la misma orientación.

55.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 54, caracterizada porque la secuencia promotora temprana inmediata hCMV (a) comprende:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID NO:1, los nucleótidos 903 a 1587 de SEC ID NO:54, los nucleótidos 1815 a 1935 de SEC ID NO:65, los nucleótidos 1948 a 2632 de SEC ID NO:61, los nucleótidos 1002 a 1686 de SEC ID NO:62 y/o los nucleótidos 2624 a 3308 de SEC ID NO:62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótidos a una o más de las secuencias de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

56.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 55, caracterizada porque la secuencia de exón (b) comprende:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID NO:2, la secuencia de nucleótidos de los nucleótidos 1588 a 1718 de SEC ID NO:54, los nucleótidos 1684 a 1814 de SEC ID NO:61, los nucleótidos 2633 a 2763 de SEC ID NO:61, los nucleótidos 1687 a 1817 del SEC ID NO:62 y/o los nucleótidos 3309 a 3439 de SEC ID NO:62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene por al menos 80% homología de secuencia de nucleótidos a una o más de las secuencias de (i); o

(iii) el fragmento funcional de (i) o de (ii).

57.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 56, caracterizada porque el intrón heterólogo (c) comprende una secuencia seleccionada de la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata, de la secuencia del intrón A del gen de queratina de pollo, la secuencia del intrón A del gen de actinia cardiaca de pollo, un fragmento funcional de cualquiera de estos o de una variante funcional de cualquiera

de los anteriores.

58.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 57, caracterizada porque la secuencia del intrón A del gen de insulina de rata comprende:

(i) la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:3, la secuencia de nucleótidos de 1725 a 1857 de SEC ID NO:54, los nucleótidos 1545 a 1677 de SEC ID NO:61, los nucleótidos 2770 a 2902 de SEC ID NO:61, los nucleótidos 1824 a 1956 de SEC ID NO:62 y/o los nucleótidos 3446 a 3578 de SEC ID NO:62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido a una o más de las secuencias de (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

59.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 58, caracterizada porque la secuencia promotora quimérica comprende:

(i) la secuencia de nucleótido de SEC ID NO:4 o la secuencia de nucleótido de los nucleótidos 903 a 1857 de SEC ID NO:54;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido a (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

60.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 59,

caracterizada porque además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia e-antígeno HBV o la secuencia de antígeno del tipo 2gD HSB y que está en enlace operable con la promotora quimérica; y/o

(b) una secuencia potenciadora que se deriva de la región no traducida 3' (UTR) de una secuencia de HBsAg o de una secuencia del gen inmediato temprano CMV de simio y que está operablemente enlazada con el promotor quimérico, en donde la secuencia potenciadora está en dirección 3´ del sitio de clonación.

61.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque comprende:

(i) la secuencia del vector pPJV7563 provisto como SEC ID NO:14, o

(ii) una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencia con la secuencia de (i); y

la secuencia que codifica el antígeno, fragmento o variante se provee en la secuencia (i) o (ii) de tal forma que está operablemente enlazada al promotor quimérico.

62.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 61, caracterizada porque la secuencia de codificación codifica un antígeno HA, una variante inmunogénica del mismo, o un fragmento inmunogénico

418

de cualquiera.

63.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque comprende la secuencia del vector pPJV1671 provisto como SEC ID NO:54 o una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencia al mismo.

64.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque comprende la secuencia del vector pPML7789 provisto como SEC ID NO:59 o una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencia al mismo.

65.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque comprende la secuencia del vector pPJV2012 provisto como SEC ID NO:61 o una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencia al mismo.

66.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 49, caracterizada porque comprende la secuencia del vector pPJV7788 provisto como SEC ID NO:62 o una secuencia con al menos 60% de identidad de secuencia al mismo.

67.- Una construcción de ácido nucleico caracterizada porque comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada al promotor, en donde la secuencia de codificación codifica un antígeno de

virus de influenza, un fragmento inmunogénico del mismo o una variante inmunogénica del antígeno o fragmento que tiene al menos 80% de homología de aminoácido al antígeno o fragmento y la construcción además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia de antígeno HBVpreS2, la secuencia e-antígeno HBV o la secuencia de antígeno del tipo 2gD HSV, que está operablemente enlazada a la secuencia de codificación y al promotor que es heterólogo a la secuencia de codificación; y/o

(b) la secuencia potenciadora 3' de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de un UTR 3' de una secuencia HBsAg o de una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, y la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadora 3'.

68.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 67, caracterizada porque el antígeno codificado es hemaglutinina de influenza (HA), un fragmento inmunogénico de la misma o una variante inmunogénica con al menos 80% de homología de secuencia de aminoácido a cualquiera.

69.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 67, caracterizada porque el antígeno codificado es neuraminidasa de influenza (NA) o M2,

un fragmento inmunogénico de cualquiera o una variante inmunogénica con al menos 80% de homología de la secuencia de aminoácido al NA, M2 o fragmento.

70.- Un ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 67 a 69, caracterizado porque el antígeno de influenza codificado, el fragmento inmunogénico del mismo, o la variante inmunogénica de cualquiera es de una cepa de influenza pandémica.

71.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 67 a 70, caracterizada porque la construcción codifica más de un antígeno de influenza, un fragmento inmunogénico o una variante inmunogénica.

72.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 71, caracterizada porque la construcción codifica un antígeno de influenza pandémica, un fragmento inmunogénico del mismo, o una variante inmunogénica del antígeno o fragmento y uno o más antígenos de influenza no pandémicos, fragmento(s) inmunogénico del mismo o variante(s) inmunogénica del antígeno(s) o fragmento(s).

73.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 71 o 72, caracterizado porque al menos dos de los diferentes antígenos, fragmentos o variantes codificados son del mismo polipéptido de influenza de diferentes cepas del virus de influenza.

74.- Una construcción de ácido nucleico caracterizada porque comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada al promotor, en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con una actividad adyuvante o una variante de cualquiera de estos que tiene actividad adyuvante y que tiene al menos 80% de homología de aminoácido con la subunidad o fragmento y la construcción además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia del antígeno HBVpreS2, una secuencia de e-antígeno HBV o una secuencia del antígeno de tipo 2gD HSV y que está operablemente enlazada con la secuencia de codificación y el promotor que es heterólogo a la secuencia de codificación; y

(b) una secuencia potenciadora 3' de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de un UTR 3' de la secuencia HBsAg o una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, y la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadora 3'.

75.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 74, caracterizado porque la subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP se selecciona de la subunidad A de toxina de cólera, la

subunidad B de toxina de cólera, la subunidad A de toxina lábil al calor E. coli, y la subunidad B lábil al calor E. coli.

76.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 74 o 75, caracterizada porque la construcción de ácido nucleico comprende dos secuencias de codificación con cada una comprendiendo una subunidad diferente, fragmento o variante y cada una operablemente enlazada al promotor quimérico.

77.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 76, caracterizada porque las dos secuencias de codificación codifican una subunidad A de toxina de cólera, y una subunidad B de toxina de cólera respectivamente o una subunidad A de toxina lábil al calor E. coli y la subnidad B lábil al calor E. coli respectivamente.

78.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 76 o 77, caracterizada porque las dos secuencias de codificación están en orientación inversa.

79.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 76 o 77, caracterizada porque las dos secuencias de codificación están en la misma orientación.

80.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 67 a 79,

caracterizada porque el promotor se selecciona de la secuencia promotora temprana inmediata hCMV, la secuencia promotora del virus de Pseudorabia y la secuencia promotora del virus de sarcoma Rous.

81.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 67 a 80, caracterizada porque la secuencia líder no-traducida comprende:

(i) la secuencia de nucleótidos SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7 o los nucleótidos 1864 a 1984 de SEC ID NO:54;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótido a (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

82.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 67 a 81, caracterizada porque la secuencia potenciadora comprende:

(i) la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, los nucleótidos 3699 a 4231 de SEC ID NO:54, los nucleótidos 3831 a 4363 de SEC ID NO:61 y/o 4507 a 5038 de SEC ID NO:62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos 80% de homología de secuencia de nucleótidos a secuencia (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o de (ii).

83.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 82, caracterizada porque además comprende una secuencia del poliadenilación.

84.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 83, caracterizada porque la secuencia del poliadenilación es una secuencia de poliadenilación de un gen seleccionado de un gen de betaglobina de conejo, un gen temprano o tardío del virus humano de papiloma (HPV), el gen HSV-2gB, el gen temprano inmediato CMV de simio y el gen tardío HSVgD.

85.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 83, caracterizada porque la secuencia de poliadenilación se selecciona de:

(i) la secuencia de nucleótidos de SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, SEC ID NO:13, los nucleótidos 4243 a 4373 de SEC ID NO:54, los nucleótidos 906 a 1038 de SEC ID NO:61, los nucleótidos 4375 a 4050 de SEC ID NO:61 o los nucleótidos 2463 a 2593 de SEC ID NO:62;

(ii) una variante funcional de (i) que tiene al menos un 80% de homología de secuencia de nucleótidos a la secuencia dicha (i); o

(iii) un fragmento funcional de (i) o (ii).

86.- Una construcción de ácido nucleico de

conformidad con la reivindicación 42, caracterizada porque comprende la secuencia de SEC ID NO:14.

87.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 86, caracterizada porque además comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido de señal que está operablemente enlazado a la secuencia de codificación del antígeno, la subunidad de exotoxina, fragmento o la variante.

88.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 87, caracterizada porque el péptido de señal se selecciona del péptido de señal activador de plasminógeno de tejido humano (hTPAsp), el péptido de señal de aprotinina, el péptido de señal de extensina de tabaco y el péptido de señal de lisozima de pollo.

89.- Una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 42 a 88, caracterizada porque es un plásmido.

90.- Una población de construcciones de ácido nucleico caracterizada porque la población comprende por lo menos dos diferentes construcciones de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 89.

91.- Una población de construcciones de ácido nucleico caracterizada porque comprende por lo menos dos diferentes construcciones de conformidad con cualquiera de

las reivindicaciones 42 a 48, 61 a 64 y 67 a 73 que codifican diferentes antígenos de influenza, fragmentos inmunogénicos de los mismos o variantes inmunogénicas de los antígenos o fragmentos.

92.- Una población de las construcciones de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 91, caracterizada porque comprende por lo menos tres diferentes construcciones, cada una codificando un antígeno de influenza, fragmento inmunogénico o variante inmunogénica diferente.

93.- Una población de las construcciones de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 91 o 92, caracterizada porque al menos dos de los diferentes antígenos son del mismo polipéptido de influenza de diferentes cepas influenza.

94.- Una población de las construcciones de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 91 a 93, caracterizada porque al menos dos de los diferentes antígenos, fragmentos o variantes son de diferentes polipéptidos de influenza de la misma o diferente cepa de influenza.

95.- Una población de las construcciones de ácido nucleico según de las reivindicaciones 90 a 94, caracterizada porque comprende al menos una construcción de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 49 a 54, 65, 66 y 74 a 79

que codifican la subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma o variante de la misma.

96.- Una población de construcciones de ácido nucleico caracterizada porque:

(i) al menos una construcción codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de de la misma con actividad adyuvante o una variante de cualquiera que tiene actividad adyuvante y tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido a la subunidad o fragmento; y

(ii) por lo menos una construcción que codifica un antígeno de virus de herpes simple (HSV);

en donde la secuencia que codifica la subunidad, fragmento o variante y/o el antígeno HSV está operablemente enlazada a un promotor quimérico que comprende:

(a) la secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y al menos parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) el intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV.

97.- Una población de construcciones de ácido nucleico caracterizada porque donde:

(i) por lo menos una construcción que codifica una

subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con actividad adyuvante o una variante de cualquiera que tiene actividad adyuvante y que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido a la subunidad o fragmento; y

(ii) por lo menos una construcción que codifica un antígeno HSV, en donde al menos una de dichas construcciones además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia del antígeno HBVpreS2, una secuencia e-antígeno HBV o una secuencia del antígeno de tipo 2gD HSV y que está operablemente enlazada con la secuencia de codificación y el promotor que es heterólogo a la secuencia de codificación; y

(b) una secuencia potenciadora 3' de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de un UTR 3' de la secuencia HBsAg o una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, y la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadora 3'.

98.- Una población deconstrucciones de ácido nucleico caracterizada porque comprende:

(i) una primera construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora quimérica y una secuencia de codificación operablemente enlazada al promotor quimérico,

en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con actividad adyuvante o una variante de cualquiera que tiene actividad adyuvante y que tiene por lo menos 80% de homología de aminoácido a la subunidad o fragmento y la secuencia promotora quimérica comprende:

(a) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV;

(b) el exón 1 y por lo menos parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(c) un intrón heterólogo provisto en lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV; y

(ii) una segunda construcción de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno HSV.

99.- Una población de construcciones de ácido nucleico caracterizada porque comprende:

(i) una primera construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora y una secuencia de codificación operablemente enlazada al promotor, en donde la secuencia de codificación codifica una subunidad de toxina bacteriana de ribosilación ADP, un fragmento de la misma con actividad adyuvante o una variante de cualquiera que tiene actividad adyuvante y que tiene al menos 80% de homología de aminoácido para la subunidad o fragmento y la construcción

430

además comprende:

(a) una secuencia líder no-traducida que se deriva de la secuencia del antígeno HBVpreS2, una secuencia e-antígeno HBV o una secuencia del antígeno de tipo 2gD HSV y que está operablemente enlazada con la secuencia de codificación y el promotor que es heterólogo a la secuencia de codificación; y

(b) una secuencia potenciadora 3′ de y operablemente enlazada a la secuencia de codificación, en donde la secuencia potenciadora se deriva de un UTR 3′ de la secuencia HBsAg o una secuencia del gen temprano inmediato CMV de simio, y la secuencia de codificación es heteróloga a la secuencia potenciadora 3′.

(ii) una segunda construcción de ácido nucleico que codifica por lo menos un antígeno HSV.

100.- Una población de construcciones de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 99, caracterizada porque comprende:

(i) una primera construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia del vector pPJV2012 provisto por SEC ID NO:61 o una secuencia con al menos 60% identidad de la secuencia del mismo; y

(ii) una segunda construcción de ácido nucleico que codifica un antígeno HSV.

101.- Una secuencia promotora quimérica aislada

purificada caracterizada porque la secuencia promotora quimérica es una definida en cualquiera de las reivindicaciones 42 y 55 a 57.

102.- Las partículas cubiertas caracterizadas porque comprenden partículas portadoras cubiertas con una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 89 o una población de construcciones de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 90 a 100.

103.- Las partículas cubiertas de conformidad con la reivindicación 102, caracterizadas porque las partículas cubiertas son partículas de oro.

104.- Un receptáculo de dosificación para un dispositivo de distribución mediado por partícula caracterizado porque comprende partículas cubiertas como se define en la reivindicación 102 o 103.

105.- Un dispositivo de distribución mediado por partículas caracterizado porque está cargado con partículas cubiertas de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 102 o 103.

106.- Un dispositivo de distribución mediado por partículas de conformidad con la reivindicación 105, caracterizado porque es una jeringa sin aguja.

107.- Una composición farmacéutica caracterizada porque comprende una construcción de ácido nucleico de

conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 89 o una población de construcciones de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de reivindicaciones 90 a 100 junto con un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

108.- Una composición de vacuna caracterizada porque comprende una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 89 o una población de construcciones de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 90 a 100.

109.- Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 108, caracterizada porque es una vacuna multivalente que comprende al menos dos diferentes construcciones de conformidad con cualquiera reivindicaciones 42 a 48, 61 a 64, y 67 a 73 que codifican diferentes antígenos de influenza, fragmentos inmunogénicos de los mismos, o variantes inmunogénicas de cualquiera de estos.

110.- Una composición de vacuna de conformidad con la reivindicación 109, caracterizada porque es una vacuna de influenza trivalente, tetravalente o pentavalente.

111.- El uso de una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 89, de una población de construcciones de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 90 a 95 o partículas cubiertas de conformidad con las reivindicaciones 102 o 103 en la fabricación de un medicamento para la

prevención de influenza.

112.- El uso de conformidad con la reivindicación 111, en donde el medicamento se va a distribuir a través de inyección, distribución de partícula transdérmica, inhalación, tópicamente, oralmente, intranasalmente, o transmucosalmente.

113.- El uso de conformidad con la reivindicación 111 o 112, en donde los medicamentos se van a distribuir a través de inyección sin aguja.

114.- Un método *in vitro* para la obtención de la expresión en células de mamífero de un polipéptido de influenza del interés, caracterizado porque comprende transferir en las células una construcción de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 42 a 89, de una población de construcciones de ácido nucleico de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 90 a 95 o partículas cubiertas de conformidad con las reivindicación 102 o 103.

4B4

CONSTRUCCIONES DE ACIDO NUCLEICO

RESUMEN DE LA INVENCION

Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia promotora quimérica y un sitio de clonación para la inserción de una secuencia de codificación en enlace operable con el promotor quimérico, en donde la secuencia promotora quimérica comprende: (a) una secuencia promotora temprana inmediata hCMV; (b) el exón 1 y al menos una parte del exón 2 del gen temprano inmediato principal hCMV; y (c) un intrón heterólogo provisto en el lugar de la región del intrón A del gen temprano inmediato principal hCMV.

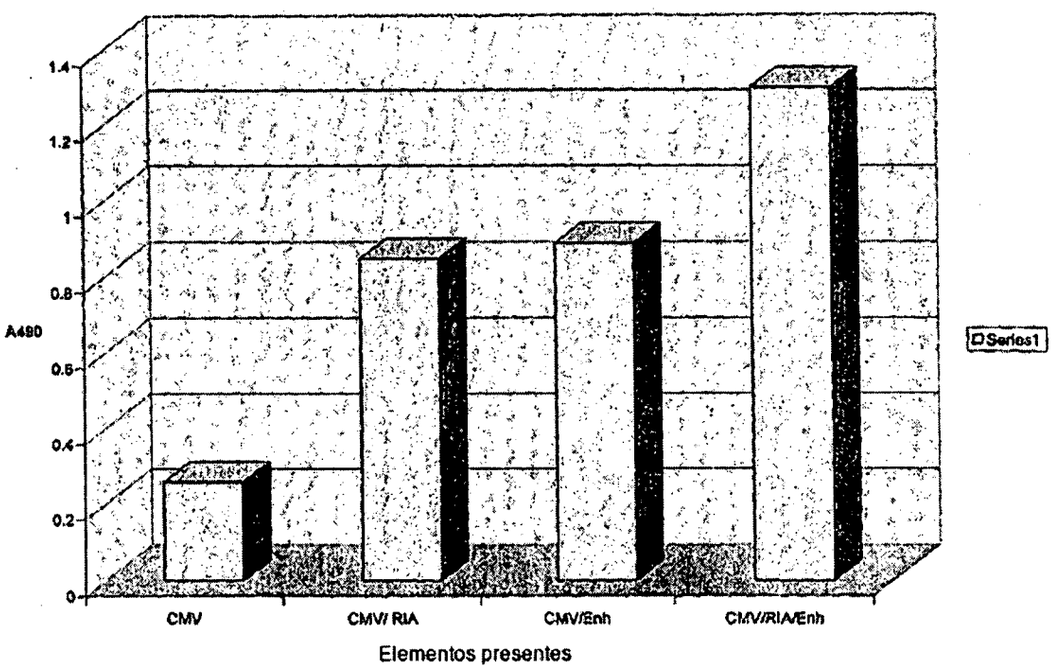

1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
A490
CMV
CMV/ RIA
CMV/Enh
CMV/RIA/Enh
Elementos presentes
Series1

Figura 1

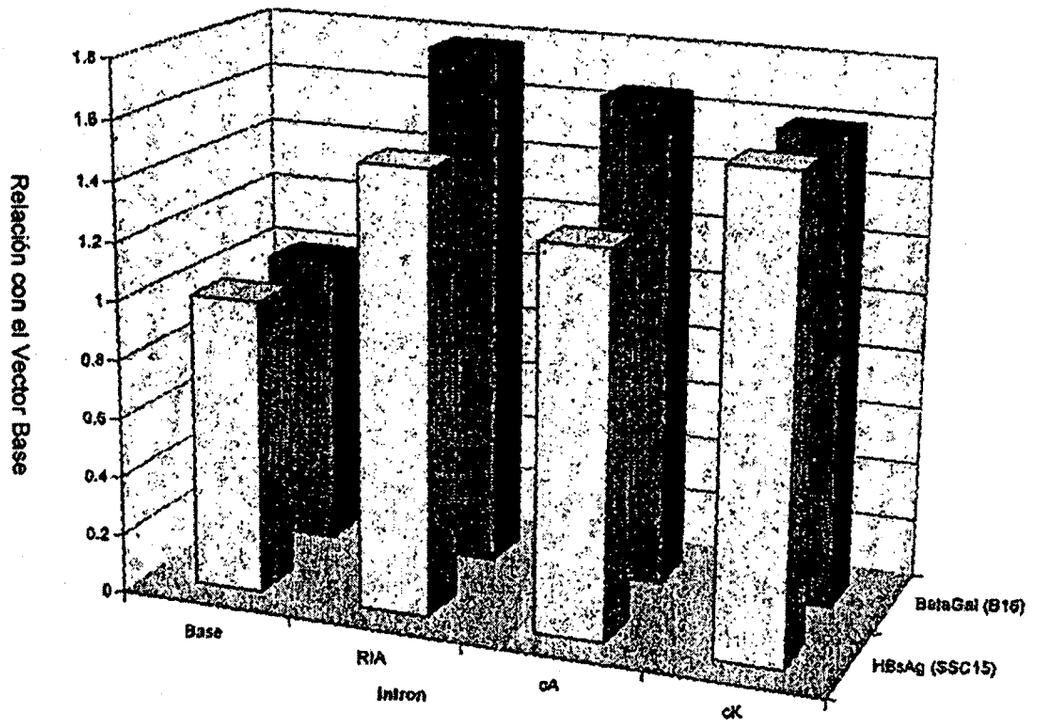

Relación con el Vector Base
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
RIA
Intron
cA
cK
BetaGal (B16)
HBsAg (SSC15)

Figura 2

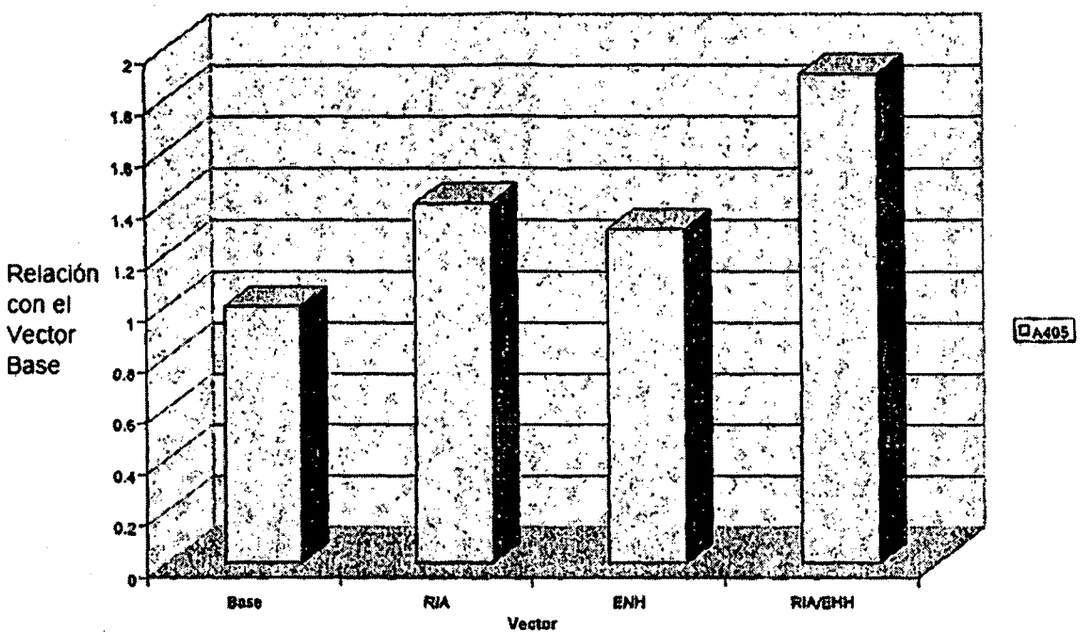

Relación con el Vector Base
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
RIA
ENH
RIA/ENH
Vector
A405

Figura 3

438

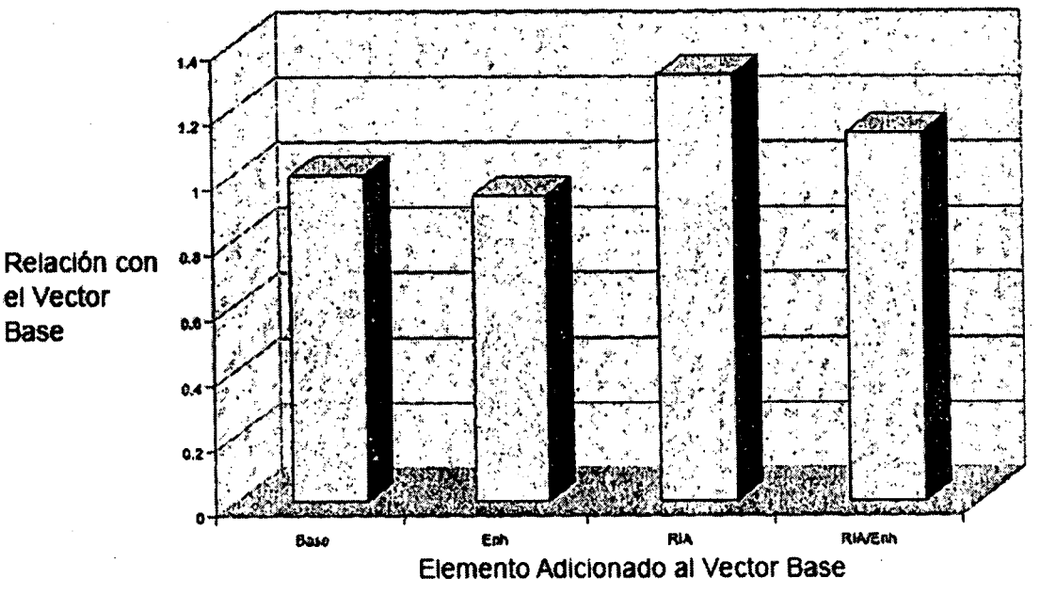

Relación con el Vector Base
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
Enh
RIA
RIA/Enh
Elemento Adicionado al Vector Base

Figura 4

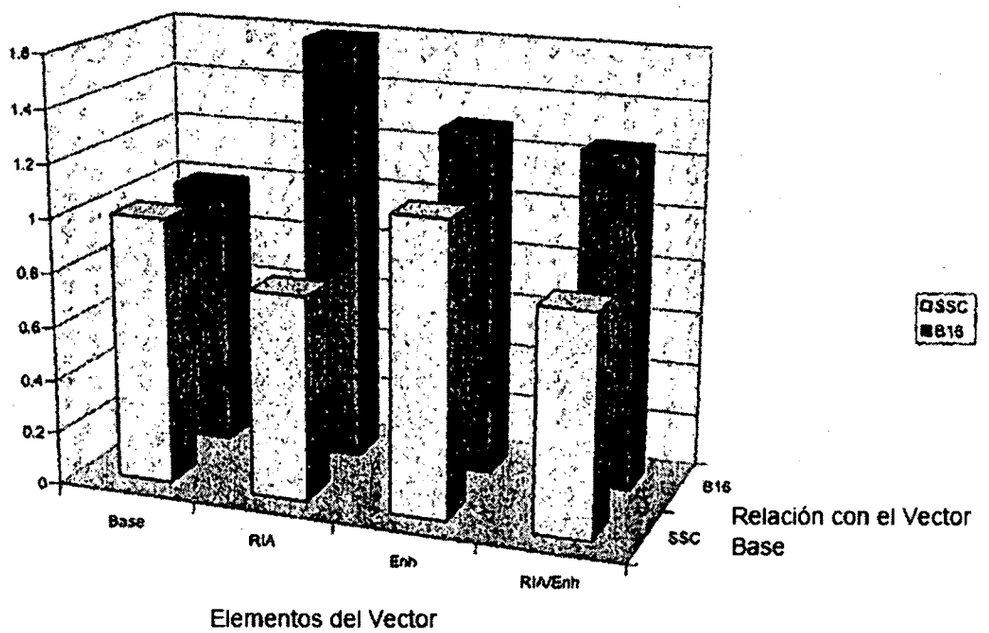

1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Base
RIA
Enh
RIA/Enh
B16
SSC
SSC
B16
Relación con el Vector Base
Elementos del Vector

Figura 5

440

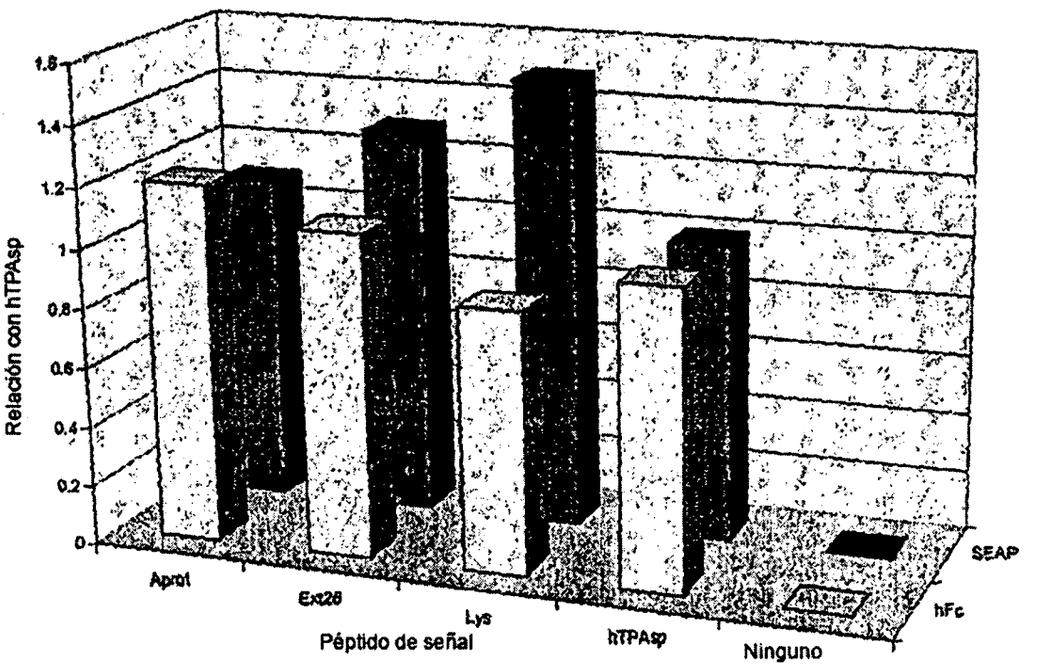

Relación con hTPAsp
1.8
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Aprot
Ext28
Lys
hTPAsp
Ninguno
Péptido de señal
SEAP
hFc

Figura 6

041

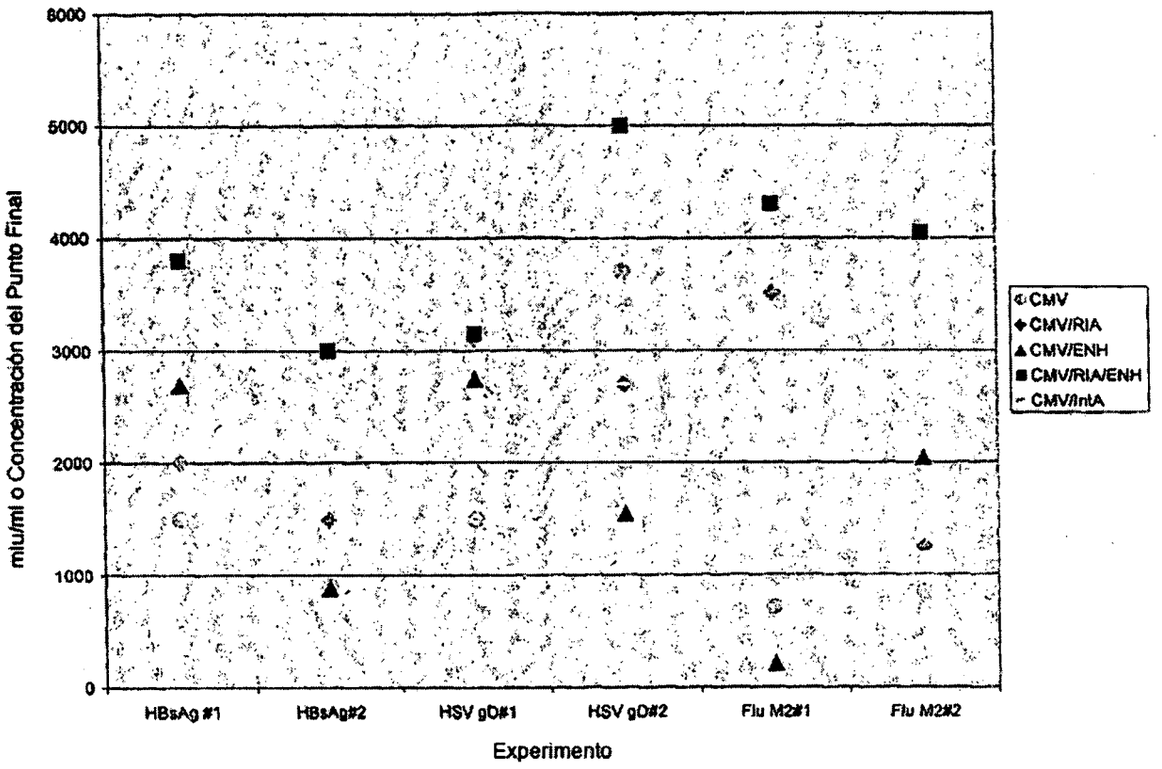

8000
5000
4000
3000
2000
1000
0
miu/ml o Concentración del Punto Final
HBsAg #1
HBsAg#2
HSV gD#1
HSV gD#2
Flu M2#1
Flu M2#2
Experimento
CMV
CMV/RIA
CMV/ENH
CMV/RIA/ENH
CMV/IntA

Figura 7

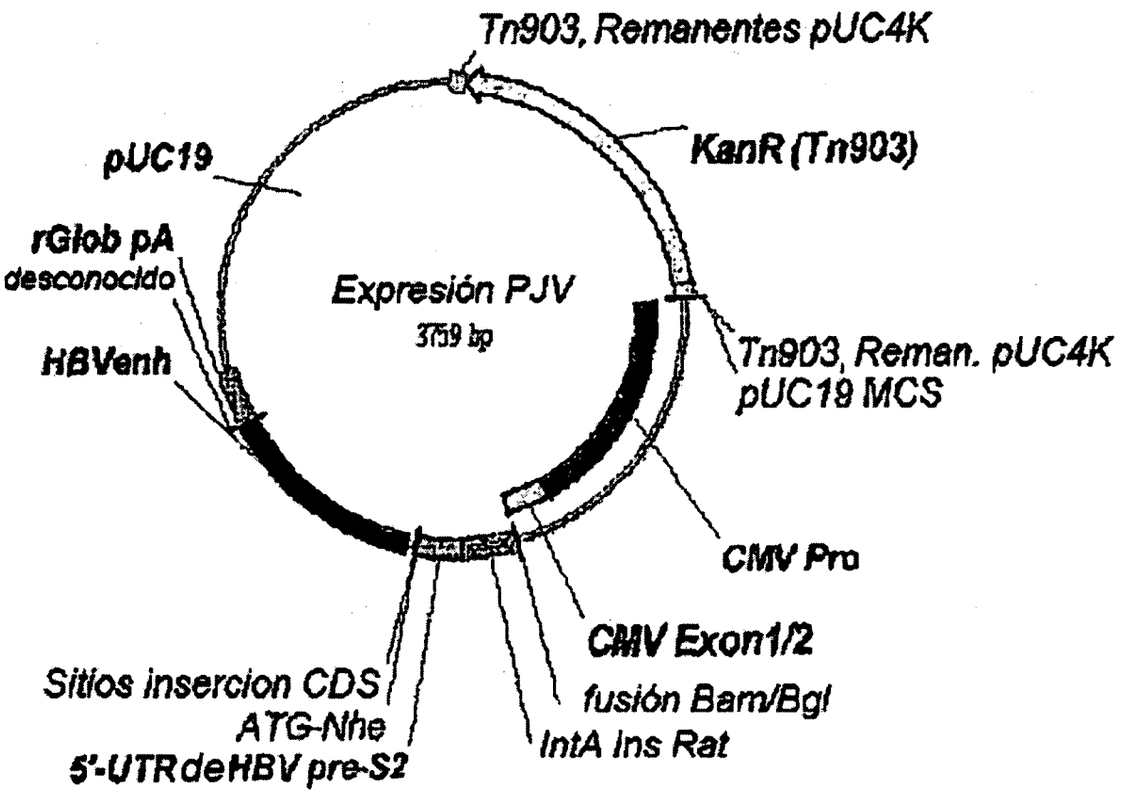

Tn903, Remanentes pUC4K
KanR (Tn903)
pUC19
rGlob pA
desconocido
Expresión PJV
3759 bp
HBVenh
Tn903, Reman. pUC4K
pUC19 MCS
CMV Pro
CMV Exon1/2
fusión Bam/Bgl
Sitios insercion CDS
ATG-Nhe
5'-UTR de HBV pre-S2
IntA Ins Rat

Figura 8

Z43

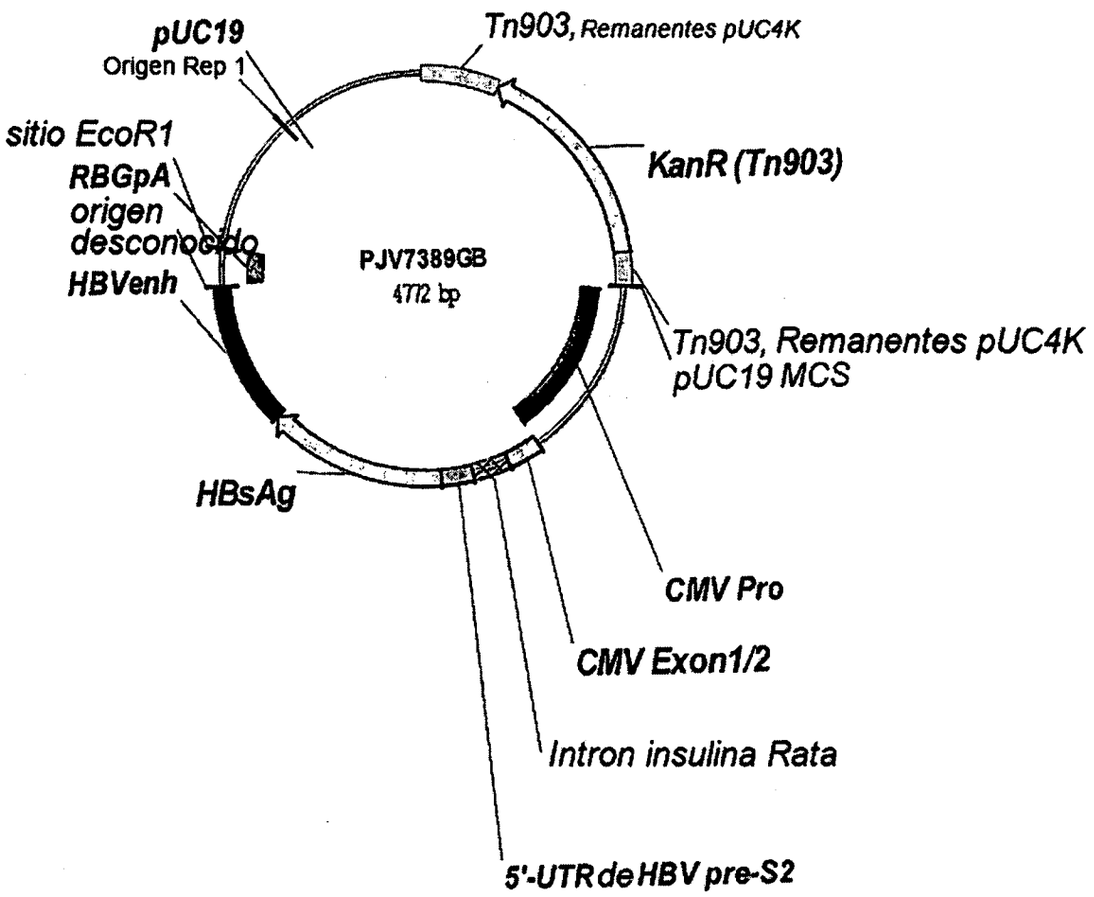

pUC19
Origen Rep 1
Tn903, Remanentes pUC4K
sitio EcoR1
RBGpA
origen
desconocido
HBVenh
KanR (Tn903)
PJV7389GB
4772 bp
Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19 MCS
HBsAg
CMV Pro
CMV Exon1/2
Intron insulina Rata
5'-UTR de HBV pre-S2

Figura 9

444

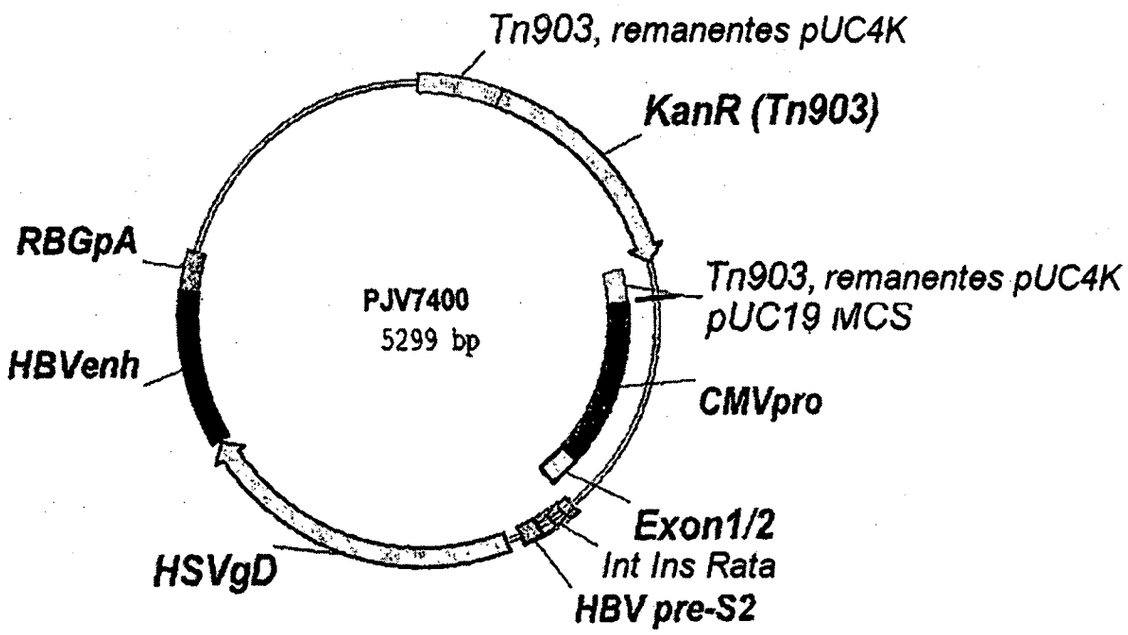


Figura 10

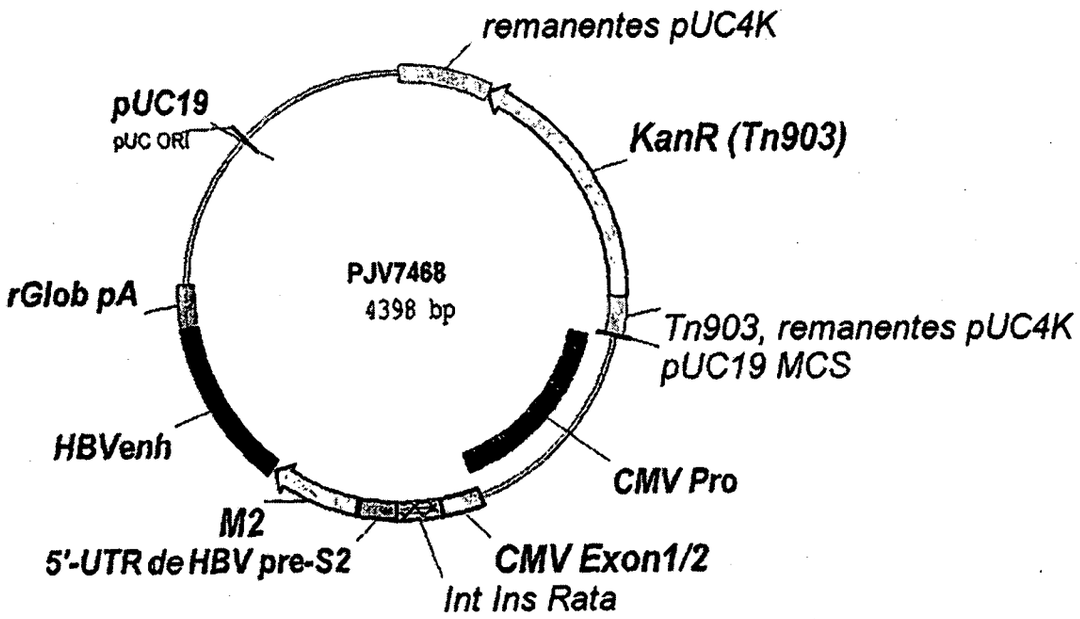

remanentes pUC4K
pUC19
pUC ORI
KanR (Tn903)
PJV7468
4398 bp
rGlob pA
Tn903, remanentes pUC4K
pUC19 MCS
HBVenh
CMV Pro
M2
5'-UTR de HBV pre-S2
CMV Exon1/2
Int Ins Rata

Figura 11

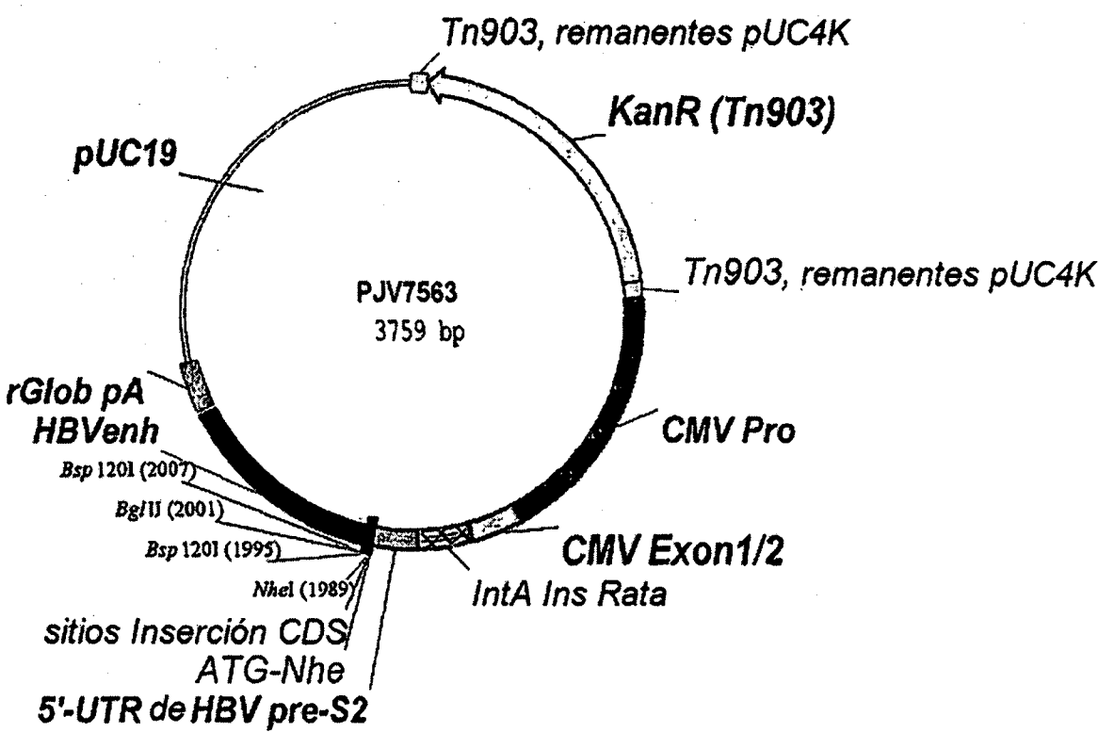

Tn903, remanentes pUC4K
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, remanentes pUC4K
PJV7563
3759 bp
rGlob pA
HBVenh
CMV Pro
Bsp 1201 (2007)
BglII (2001)
Bsp 1201 (1995)
CMV Exon1/2
NheI (1989)
IntA Ins Rata
sitios Inserción CDS
ATG-Nhe
5'-UTR de HBV pre-S2

Figura 12

Figura 13

ggcgtaatgctctgccagtgttacaaccaattaaccaattctgattagaaaaactcatcgagcatcaaatgaaactgcaatttattcatat
caggattatcaataccatatttttgaaaaagccgtttctgtaatgaaggagaaaactcaccgaggcagttccataggatggcaagatcc
tggtatcggtctgcgattccgactcgtccaacatcaatacaacctattaatttcccctcgtcaaaaataaggttatcaagtgagaaatca
ccatgagtgacgactgaatccggtgagaatggcaaaagcttatgcatttctttccagacttgttcaacaggccagccattacgctcgtc
atcaaaatcactcgcatcaaccaaaccgttattcattcgtgattgcgcctgagcgagacgaaatacgcgatcgctgttaaaaggacaa
ttacaaacaggaatcgaatgcaaccggcgcaggaacactgccagcgcatcaacaatattttcacctgaatcaggatattcttctaata
cctggaatgctgttttccccggggatcgcagtggtgagtaaccatgcatcatcaggagtacggataaaatgcttgatggtcggaagag
gcataaattccgtcagccagtttagtctgaccatctcatctgtaacatcattggcaacgctacctttgccatgtttcagaaacaactctgg
cgcatcgggcttcccatacaatcgatagattgtcgcacctgattgcccgacattatcgcgagcccatttatacccatataaatcagcat
ccatgttggaatttaatcgcggcctcgagcaagacgtttcccgttgaatatggctcataacaccccttgtattactgtttatgtaagcaga
caggtcgacaatattggctattggccattgcatacgttgtatctatatcataatatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgcca
tgttgacattgattattgactagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgttacataactta
cggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaata
gggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtccgcc
ccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagtacatgaccttacgggactttcctacttggcagtacatct
acgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacaccaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggatttcca
agtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaataaccccgccccgtt
gacgcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctcgtttagtgaaccgtcagatcgcctggagacgc
catccacgctgttttgacctccatagaagacaccgggaccgatccagcctccgcggccgggaacggtgcattggaacgcggattc
cccgtgccaagagtgactcaccgtccggatctcagcaagcaggtatgtactctccagggtgggcctggcttccccagtcaagactc
cagggatttgagggacgctgtgggctcttctcttacatgtacctttgcttgcctcaaccctgactatcttccaggtcaggatcccagag
tcaggggtctgtatttttcctgctggtggctccagttcaggaacagtaaaccctgctccgaatattgcctctcacatctcgtcaatctccg
cgaggactggggaccctgtgacgaacatggctagcgggcccagatctgggccctaacaaaacaaaaagatggggttattccctaa
acttcatgggttacgtaattggaagttgggggacattgccacaagatcatattgtacaaaagatcaaacactgttttagaaaacttcctg
taaacaggcctattgattggaaagtatgtcaaaggattgtgggtcttttgggcttgctgctccatttacacaatgtggatatcctgccttа
atgcctttgtatgcatgtatacaagctaaacaggcttcacttctcgccaacttacaaggccttttctaagtaaacagtacatgaacctta
ccccgttgctcggcaacggcctggtctgtgccaagtgtttgctgacgcaacccccactggctggggcttggccataggccatcagc
gcatgcgtggaacctttgtggctcctctgccgatccatactgcggaactcctagccgcttgttttgctcgcagccggtctggagcaaa
gctcataggaactgacaattctgtcgtcctctcgcggaaatatacatcgtttcgatctacgtatgatcttttccctctgccaaaaattatg
gggacatcatgaagcccccttgagcatctgacttctggctaataaaggaaatttatttttcattgcaatagtgtgttggaatttttgtgtctct
cactcggaaggaattctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttgcgtattgggcgctcttccgcttcctcgctc
actgactcgctgcgctcggtcgttcggctgcggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtaatacggttatccacagaatcagg
ggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgcgttgctggcgttttttcca
taggctccgcccccctgacgagcatcacaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagatacca
ggcgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttaccggatacctgtccgcctttctcccttcgggaa
gcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaaccccc
cgttcagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagc
cactggtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggcggtgctacagagttcttgaagtggtggcctaactacggctacactagaa
gaacagtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctcttgatccggcaaacaaaccaccgc
tggtagcggtggtttttttgtttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacggggtct
gacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatcttcacctagatccttttaaattaaaaa
tgaagttttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaacttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatct
gtctatttcgttcatccatagttgcctgactc

448

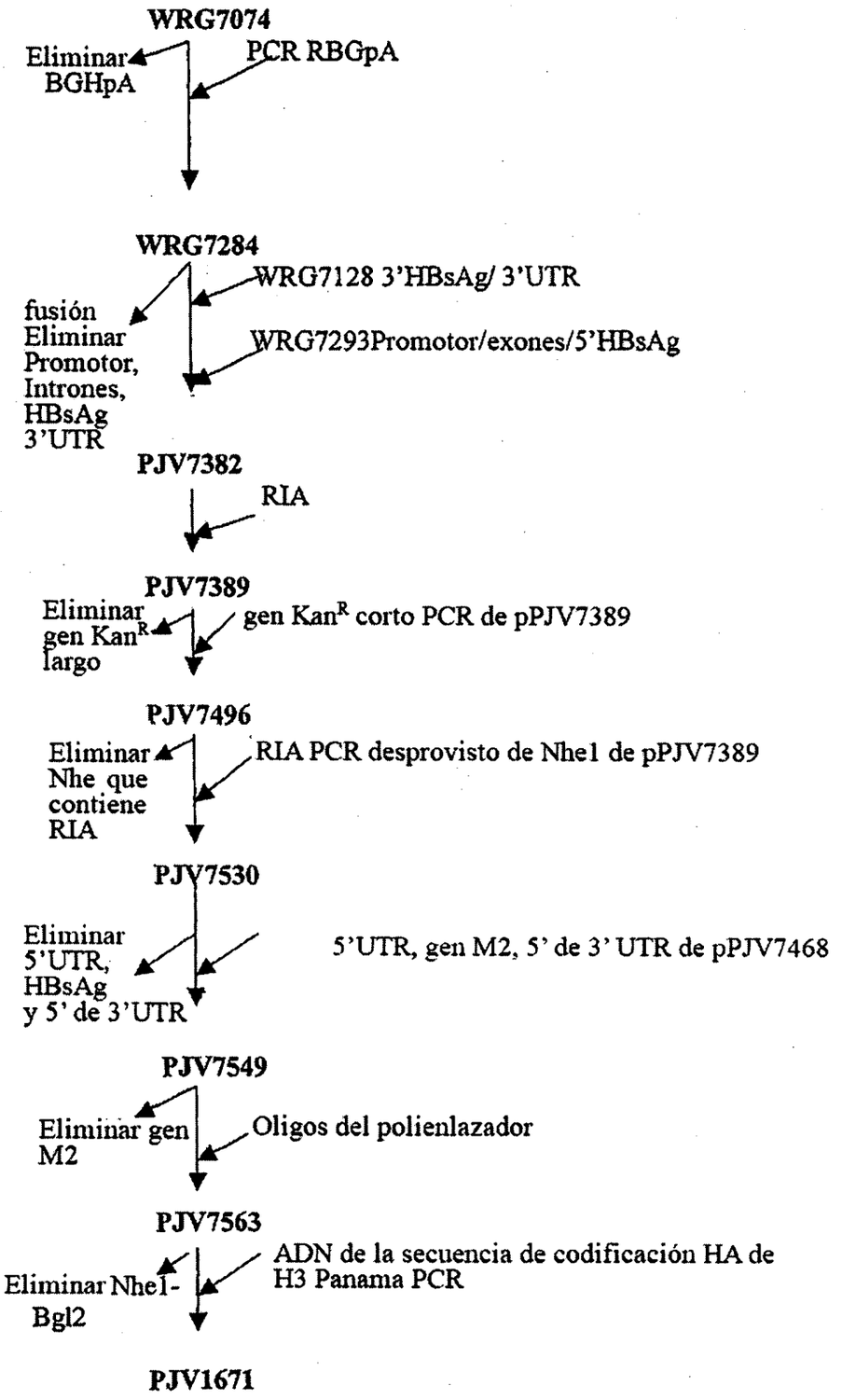


Figura 14

449

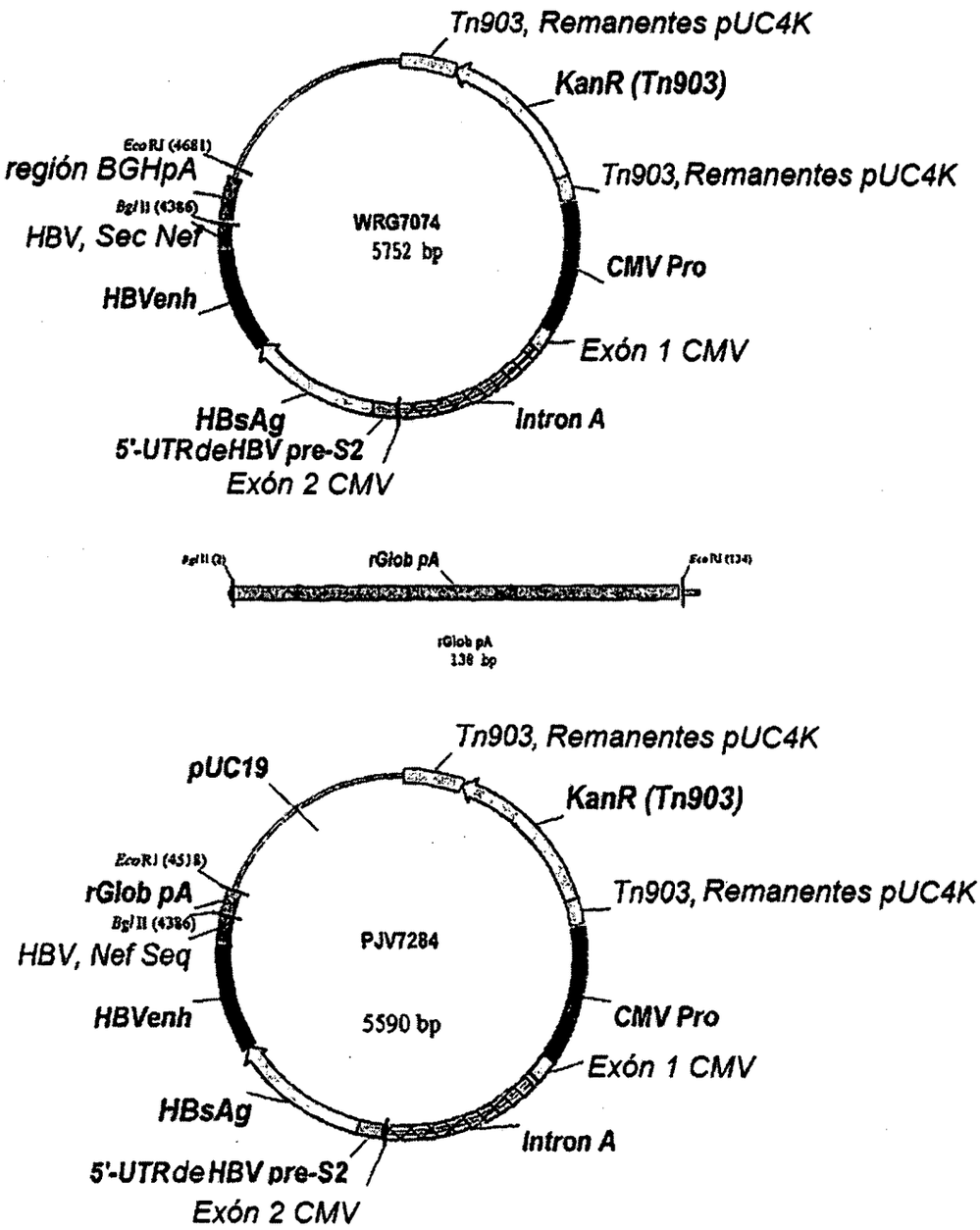
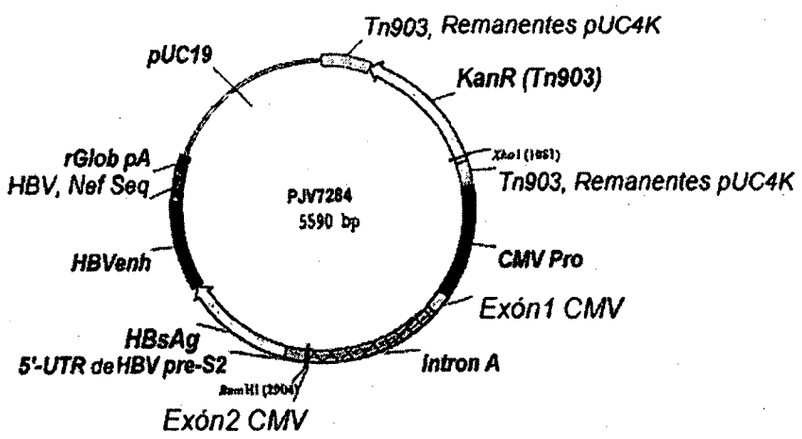
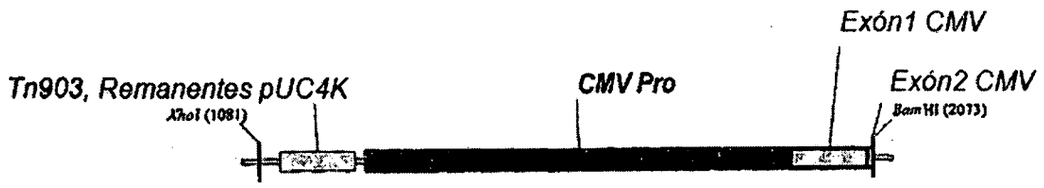


Figura 15(a)





Fragmento de WRG7128
1050 vp (molécula 4759 bp)

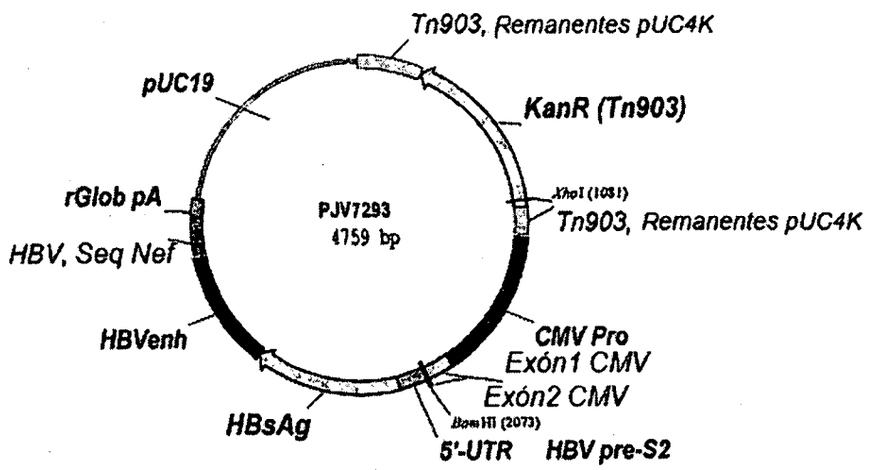


Figura 15(b)

451

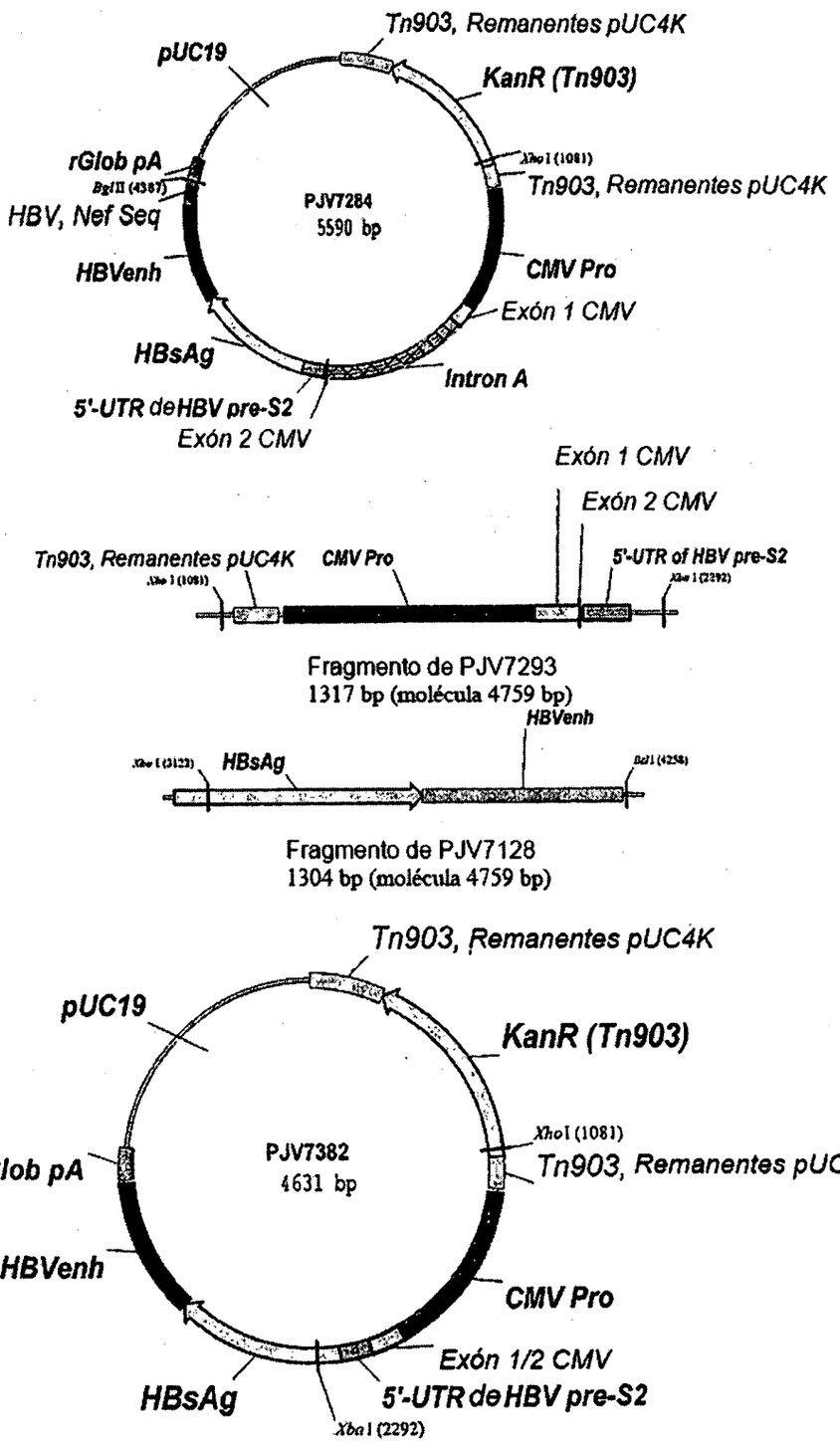


Figura 15(c)

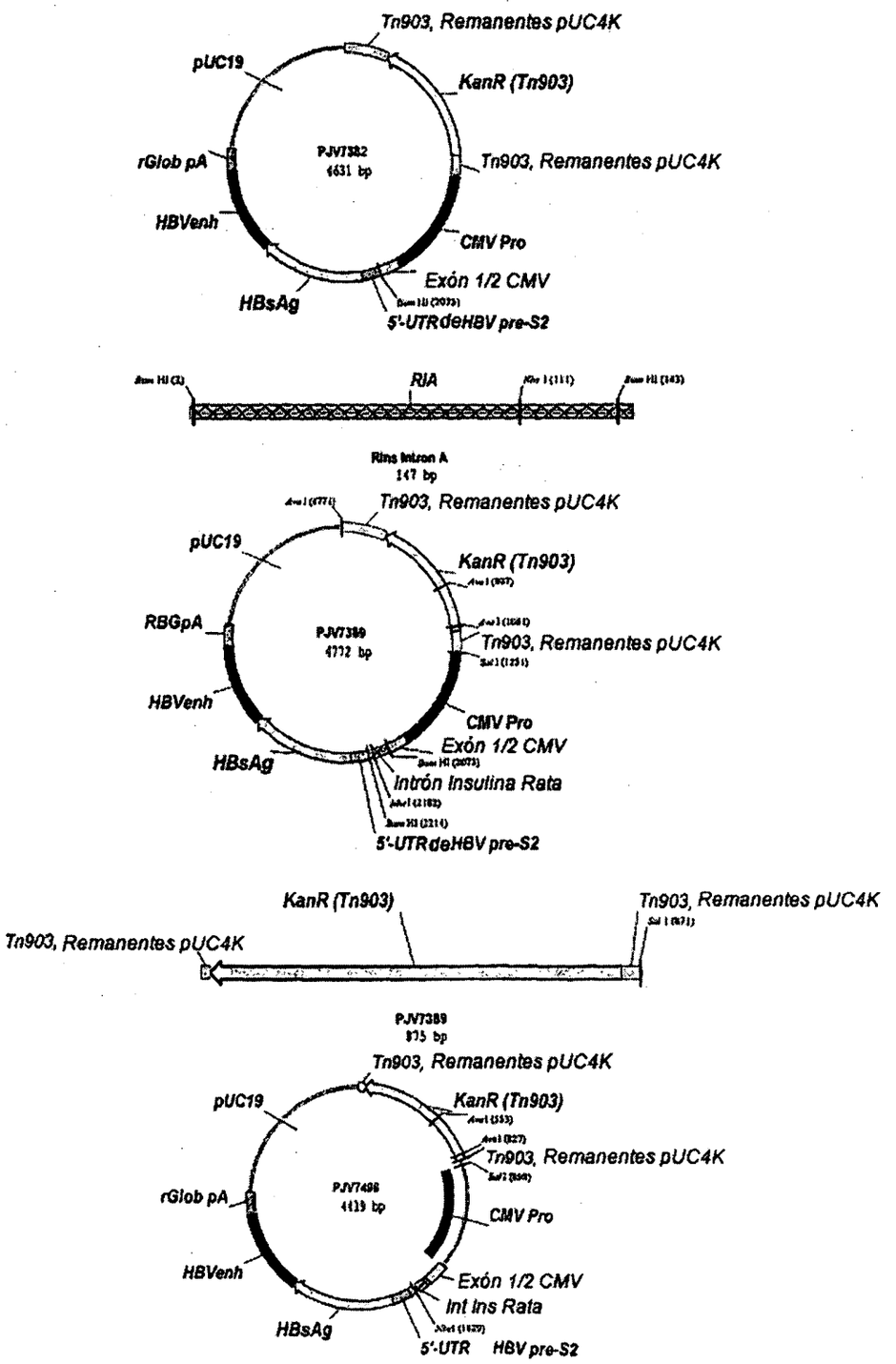

Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
PJV7382
4631 bp
rGlob pA
Tn903, Remanentes pUC4K
HBVenh
CMV Pro
Exón 1/2 CMV
HBsAg
5'-UTR deHBV pre-S2
RIA
Rins Intron A
147 bp
Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
RBGpA
PJV7389
4772 bp
Tn903, Remanentes pUC4K
HBVenh
CMV Pro
Exón 1/2 CMV
HBsAg
Intrón Insulina Rata
5'-UTR deHBV pre-S2
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
Tn903, Remanentes pUC4K
PJV7389
875 bp
Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
PJV7498
4119 bp
rGlob pA
CMV Pro
HBVenh
Exón 1/2 CMV
Int Ins Rata
HBsAg
5'-UTR
HBV pre-S2

Figura 15(d)

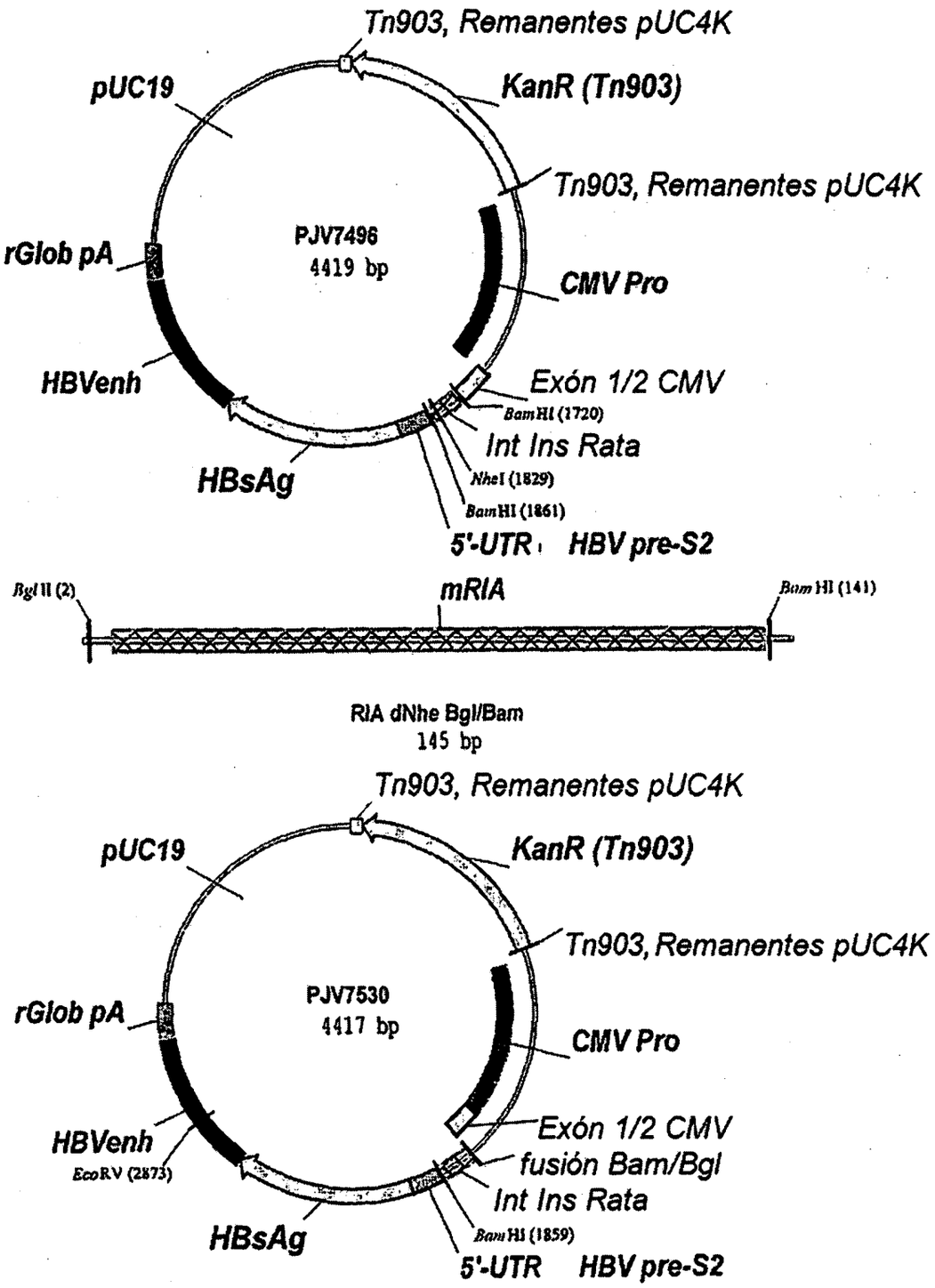

Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
PJV7496
4419 bp
rGlob pA
CMV Pro
HBVenh
Exón 1/2 CMV
BamHI (1720)
Int Ins Rata
NheI (1829)
HBsAg
BamHI (1861)
5'-UTR
HBV pre-S2
BglII (2)
mRIA
BamHI (141)
RIA dNhe Bgl/Bam
145 bp
Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
PJV7530
4417 bp
rGlob pA
CMV Pro
Exón 1/2 CMV
HBVenh
fusión Bam/Bgl
EcoRV (2873)
Int Ins Rata
HBsAg
BamHI (1859)
5'-UTR
HBV pre-S2

Figura 15(e)

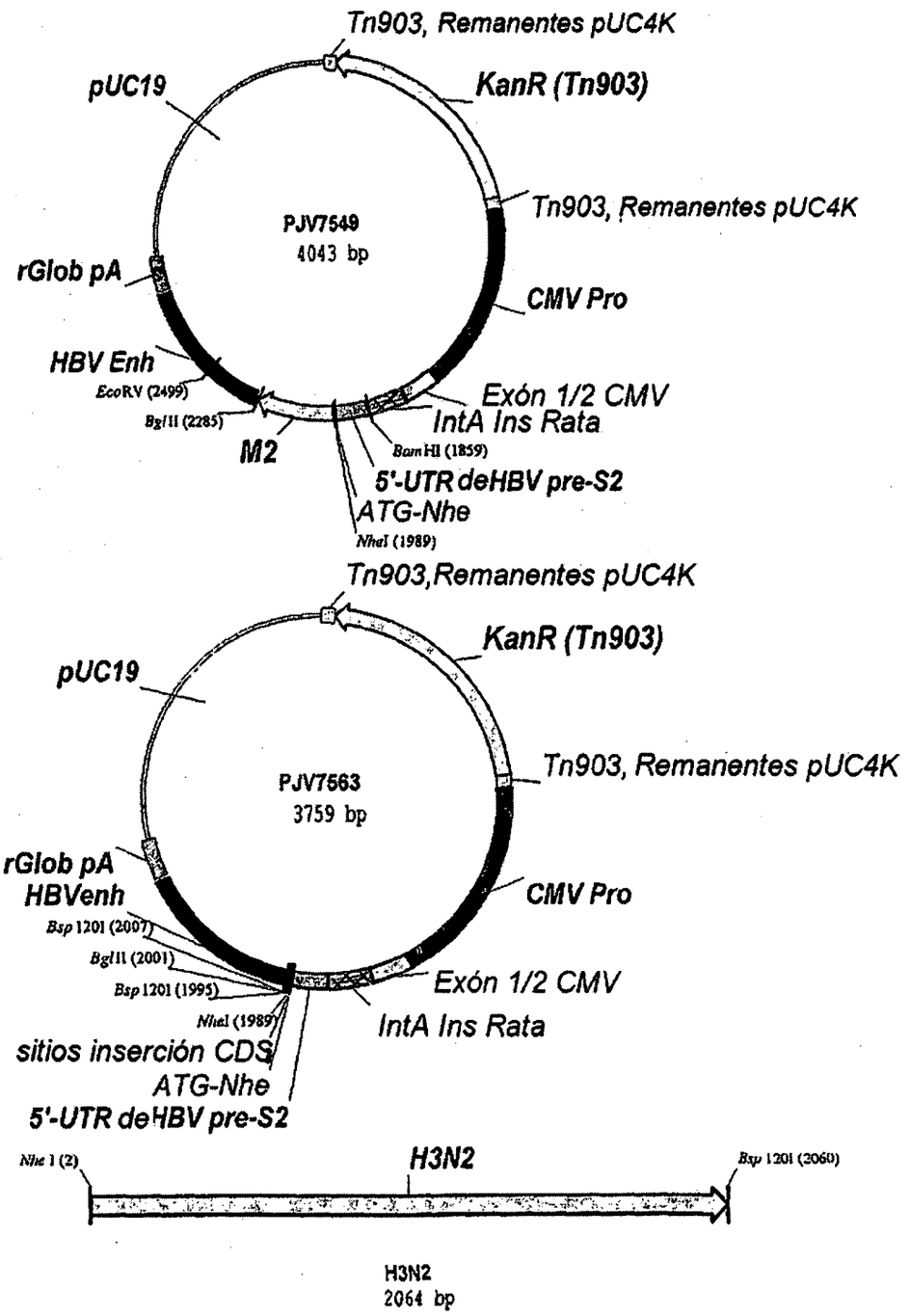
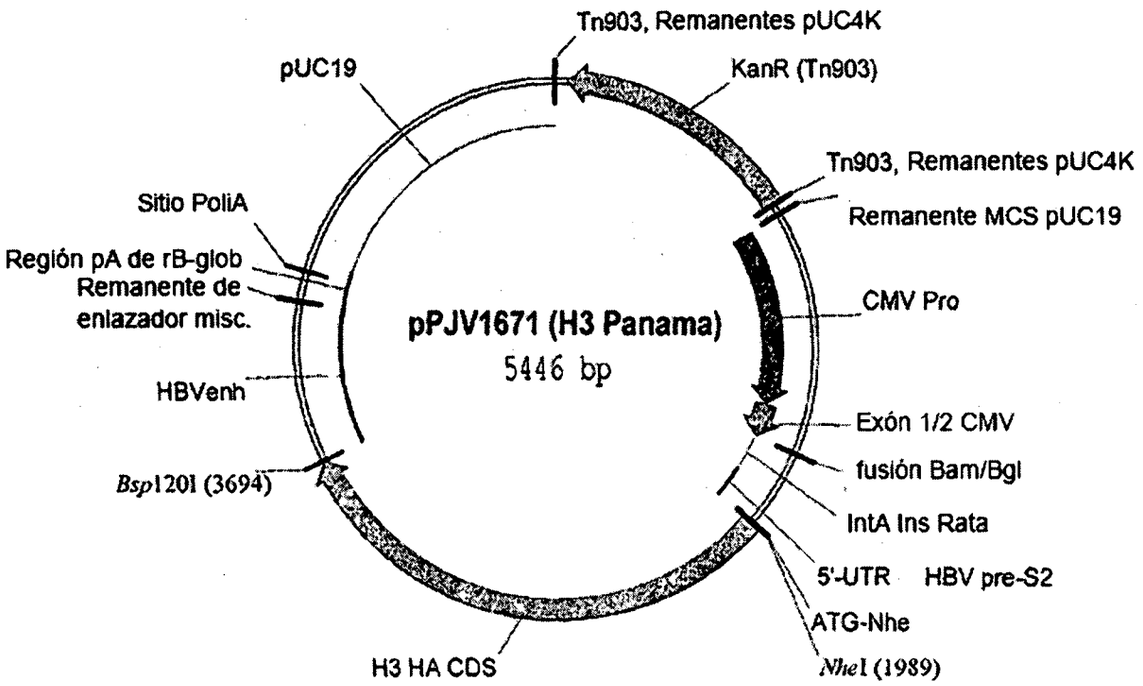

Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
PJV7549
4043 bp
rGlob pA
CMV Pro
HBV Enh
EcoRV (2499)
Exón 1/2 CMV
BglII (2285)
IntA Ins Rata
M2
BamHI (1859)
5'-UTR deHBV pre-S2
ATG-Nhe
NheI (1989)
Tn903,Remanentes pUC4K
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, Remanentes pUC4K
PJV7563
3759 bp
rGlob pA
HBVenh
CMV Pro
Bsp 1201 (2007)
BglII (2001)
Exón 1/2 CMV
Bsp 1201 (1995)
NheI (1989)
IntA Ins Rata
sitios inserción CDS
ATG-Nhe
5'-UTR deHBV pre-S2
Nhe I (2)
H3N2
Bsp 1201 (2060)
H3N2
2064 bp

Figura 15(f)




```
                    (1) 1        10        20        30        40        50        65
Secuencia Natural HA H3 Panamá (1) --MKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSS
HA H3 Panama codificado por PJV1671 (1) MASKTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSS
                Consenso (1)     KTIIALSYILCLVFAQKLPGNDNSTATLCLGHHAVSNGTLVKTITNDQIEVTNATELVQSSS
```

Figura 16

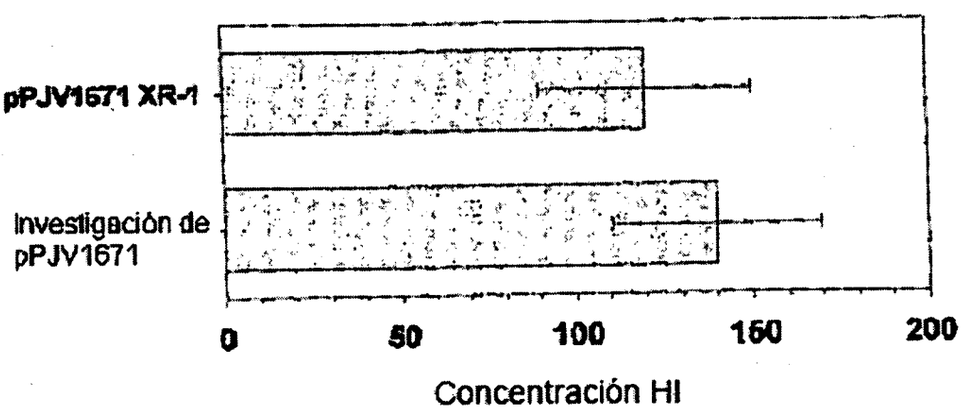

pPJV1671 XR-1
Investigación de pPJV1671
0
50
100
150
200
Concentración HI

Figura 17

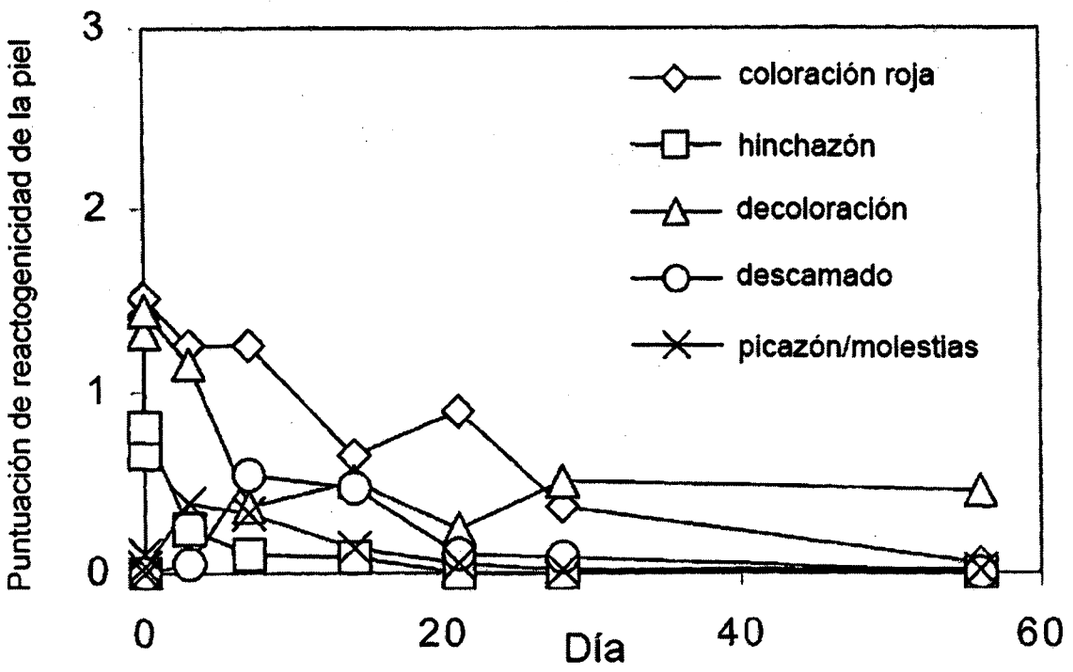

Puntuación de reactogenicidad de la piel
3
2
1
0
0
20
40
60
Día
coloración roja
hinchazón
decoloración
descamado
picazón/molestias

Figura 18

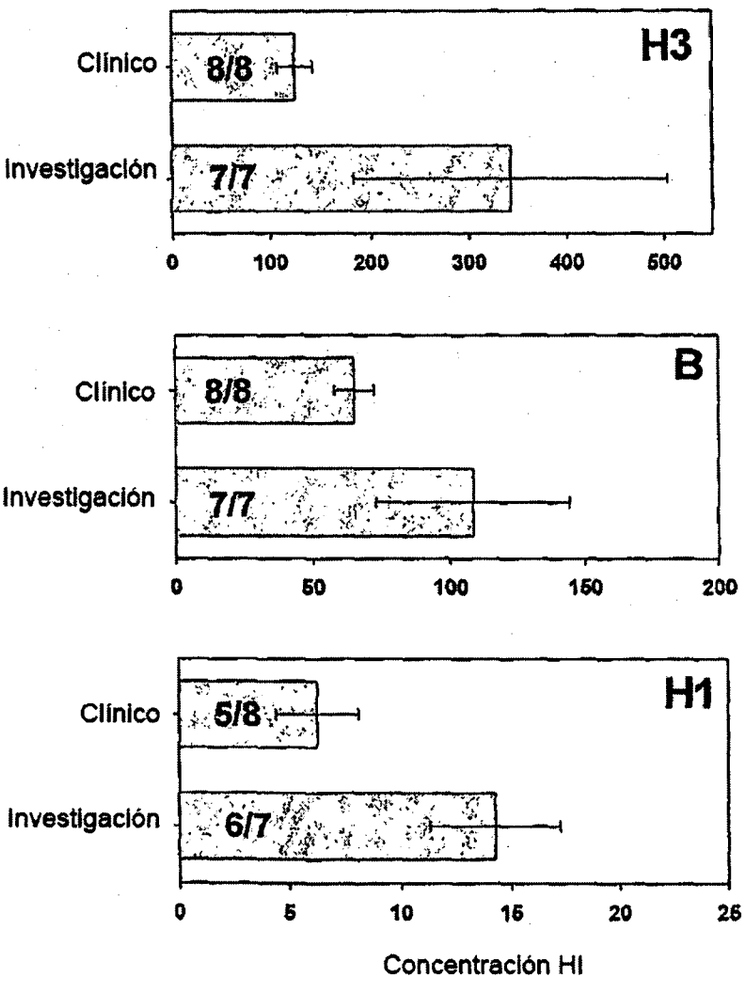

H3
Clínico
8/8
Investigación
7/7
0
100
200
300
400
500
B
Clínico
8/8
Investigación
7/7
0
50
100
150
200
H1
Clínico
5/8
Investigación
6/7
0
5
10
15
20
25
Concentración HI

Figura 19

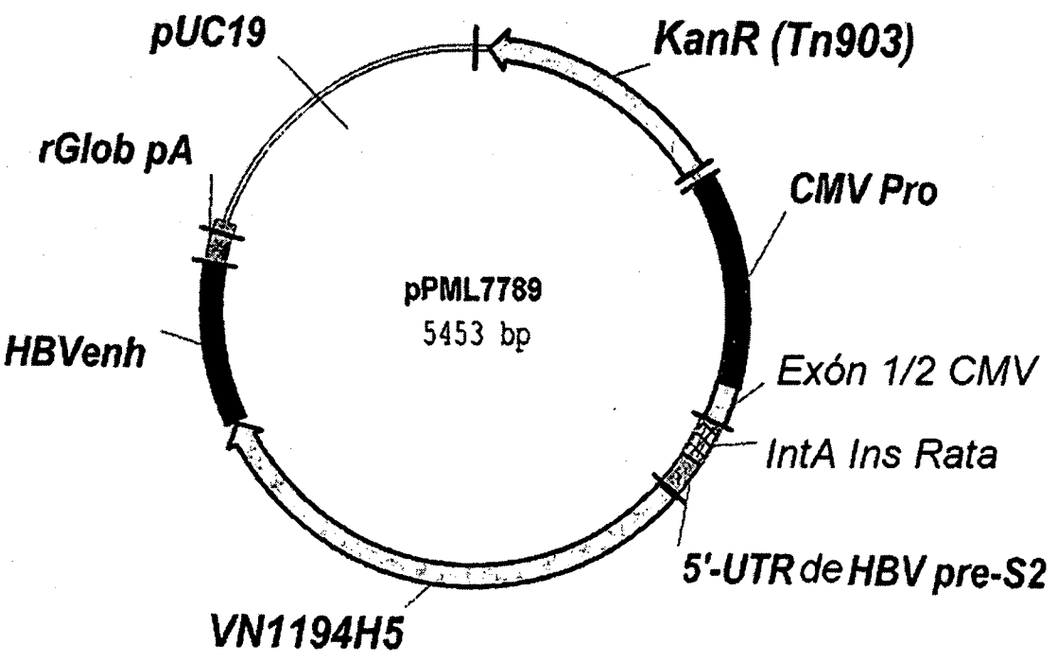

pUC19
KanR (Tn903)
rGlob pA
CMV Pro
pPML7789
5453 bp
HBVenh
Exón 1/2 CMV
IntA Ins Rata
5'-UTR de HBV pre-S2
VN1194H5

Figura 20

460

Tn903, Remanentes pUC4K

```
                                                  KanR (Tn903)
 1  GGCGTAATGC TCTGCCAGTG TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA
    CCGCATTACG AGACGGTCAC AATGTTGGTT AATTGGTTAA GACTAATCTT

51  AAACTCATCG AGCATCAAAT GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT
    TTTGAGTAGC TCGTAGTTTA CTTTGACGTT AAATAAGTAT AGTCCTAATA

                        KanR (Tn903)
101 CAATACCATA TTTTTGAAAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAAACTCA
    GTTATGGTAT AAAAACTTTT TCGGCAAAGA CATTACTTCC TCTTTTGAGT

                        KanR (Tn903)
151 CCGAGGCAGT TCCATAGGAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC
    GGCTCCGTCA AGGTATCCTA CCGTTCTAGG ACCATAGCCA GACGCTAAGG

                        KanR (Tn903)
201 GACTCGTCCA ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCCTCG TCAAAAATAA
    CTGAGCAGGT TGTAGTTATG TTGGATAATT AAAGGGGAGC AGTTTTTATT

                        KanR (Tn903)
251 GGTTATCAAG TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CGGTGAGAAT
    CCAATAGTTC ACTCTTTAGT GGTACTCACT GCTGACTTAG GCCACTCTTA

                        KanR (Tn903)
                  NsiI
                 ~~~~~~
       HindIII
       ~~~~~~~
301 GGCAAAAGCT TATGCATTTC TTTCCAGACT TGTTCAACAG GCCAGCCATT
    CCGTTTTCGA ATACGTAAAG AAAGGTCTGA ACAAGTTGTC CGGTCGGTAA

                        KanR (Tn903)
351 ACGCTCGTCA TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCGTG
    TGCGAGCAGT AGTTTTAGTG AGCGTAGTTG GTTTGGCAAT AAGTAAGCAC

                        KanR (Tn903)
401 ATTGCGCCTG AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTTAAA AGGACAATTA
    TAACGCGGAC TCGCTCTGCT TTATGCGCTA GCGACAATTT TCCTGTTAAT

                        KanR (Tn903)
451 CAAACAGGAA TCGAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC
    GTTTGTCCTT AGCTTACGTT GGCCGCGTCC TTGTGACGGT CGCGTAGTTG

                        KanR (Tn903)
501 AATATTTTCA CCTGAATCAG GATATTCTTC TAATACCTGG AATGCTGTTT
    TTATAAAAGT GGACTTAGTC CTATAAGAAG ATTATGGACC TTACGACAAA

                        KanR (Tn903)
      XmaI
     ~~~~~~
      SmaI                          NsiI
     ~~~~~~                        ~~~~~~~
551 TCCCGGGGAT CGCAGTGGTG AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA
    AGGGCCCCTA GCGTCACCAC TCATTGGTAC GTAGTAGTCC TCATGCCTAT
```

Figura 21(a)

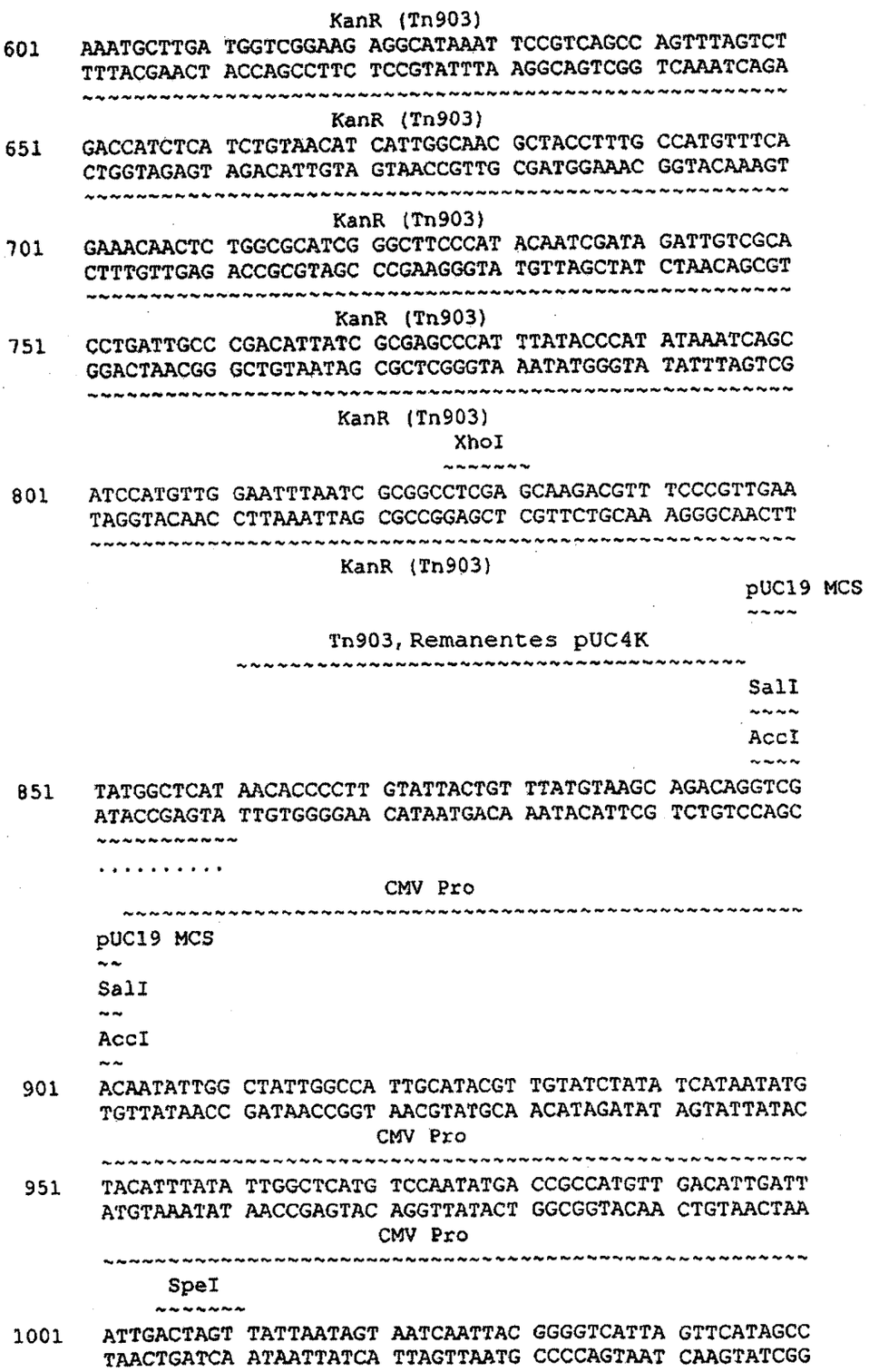

KanR (Tn903)
601 AAATGCTTGA TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT
TTTACGAACT ACCAGCCTTC TCCGTATTTA AGGCAGTCGG TCAAATCAGA
KanR (Tn903)
651 GACCATCTCA TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA
CTGGTAGAGT AGACATTGTA GTAACCGTTG CGATGGAAAC GGTACAAAGT
KanR (Tn903)
701 GAAACAACTC TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCGCA
CTTTGTTGAG ACCGCGTAGC CCGAAGGGTA TGTTAGCTAT CTAACAGCGT
KanR (Tn903)
751 CCTGATTGCC CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC
GGACTAACGG GCTGTAATAG CGCTCGGGTA AATATGGGTA TATTTAGTCG
KanR (Tn903)
XhoI
801 ATCCATGTTG GAATTTAATC GCGGCCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA
TAGGTACAAC CTTAAATTAG CGCCGGAGCT CGTTCTGCAA AGGGCAACTT
KanR (Tn903)
pUC19 MCS
Tn903, Remanentes pUC4K
SalI
AccI
851 TATGGCTCAT AACACCCCTT GTATTACTGT TTATGTAAGC AGACAGGTCG
ATACCGAGTA TTGTGGGGAA CATAATGACA AATACATTCG TCTGTCCAGC
CMV Pro
pUC19 MCS
SalI
AccI
901 ACAATATTGG CTATTGGCCA TTGCATACGT TGTATCTATA TCATAATATG
TGTTATAACC GATAACCGGT AACGTATGCA ACATAGATAT AGTATTATAC
CMV Pro
951 TACATTTATA TTGGCTCATG TCCAATATGA CCGCCATGTT GACATTGATT
ATGTAAATAT AACCGAGTAC AGGTTATACT GGCGGTACAA CTGTAACTAA
CMV Pro
SpeI
1001 ATTGACTAGT TATTAATAGT AATCAATTAC GGGGTCATTA GTTCATAGCC
TAACTGATCA ATAATTATCA TTAGTTAATG CCCCAGTAAT CAAGTATCGG

Figura 21(b)

462

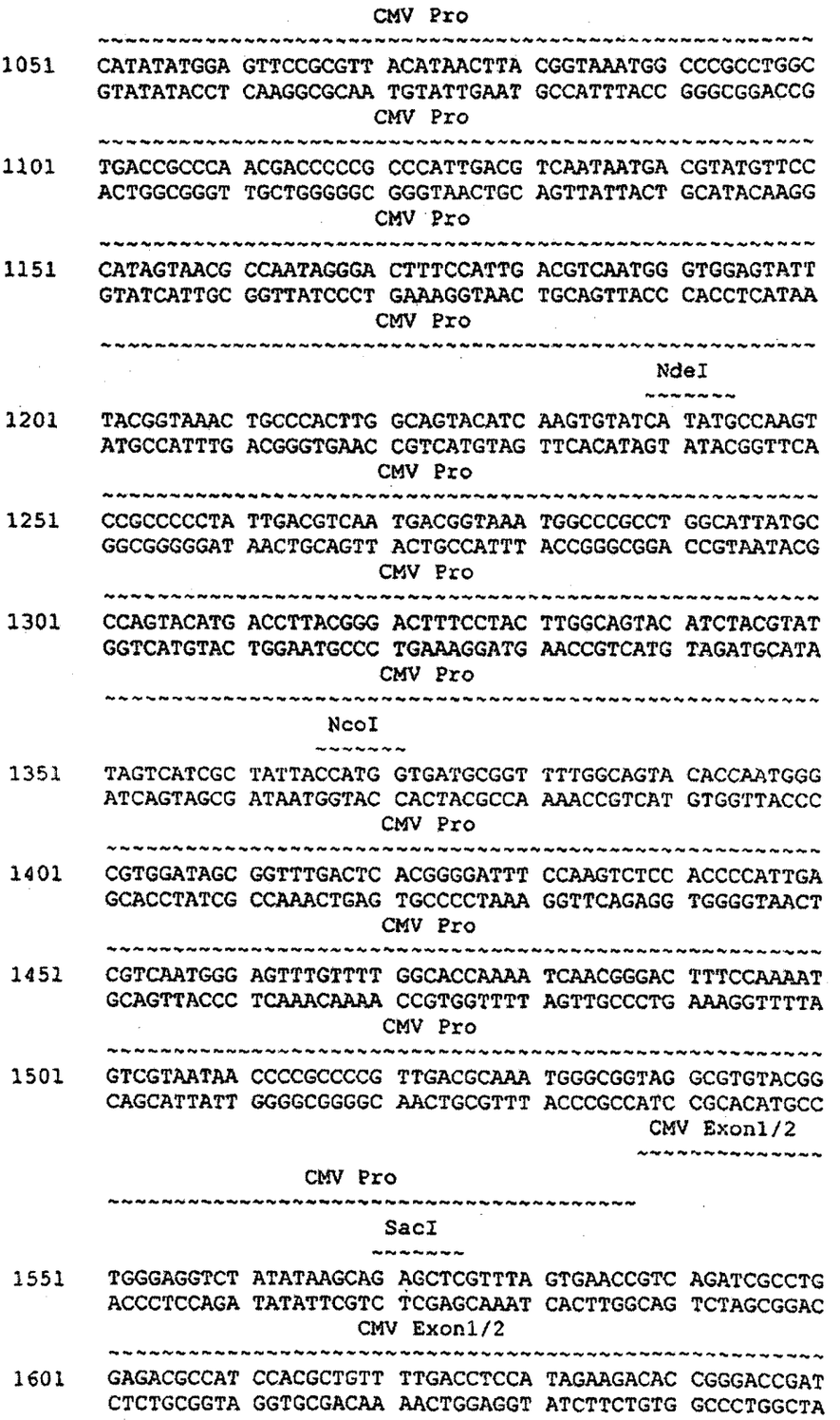


Figura 21(c)

463

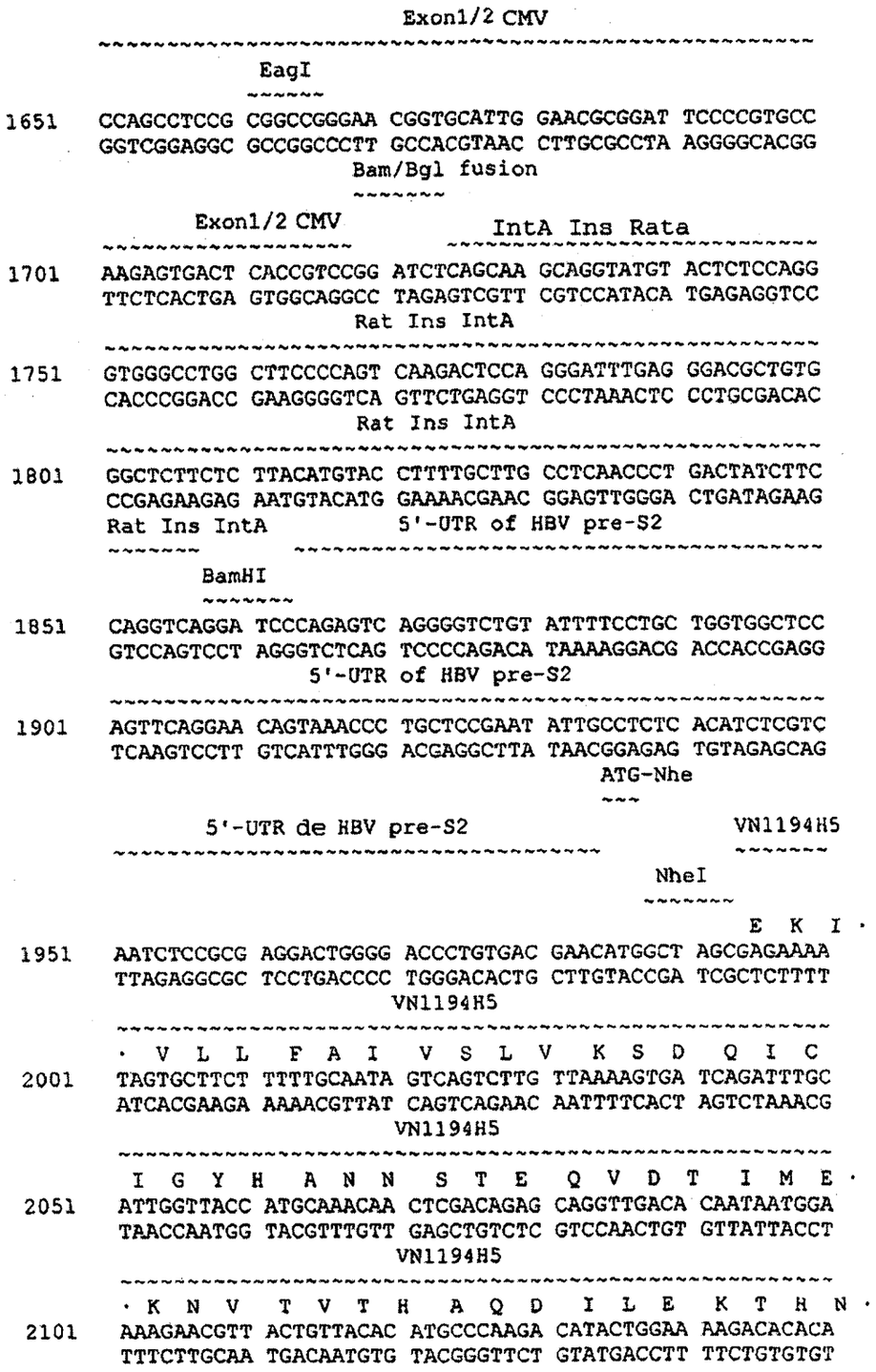


Figura 21(d)

464

VN1194H5

XbaI

G K L C D L D G V K P L I L R D

2151 ATGGGAAGCT CTGCGATCTA GATGGAGTGA AGCCTCTAAT TTTGAGAGAT
TACCCTTCGA GACGCTAGAT CTACCTCACT TCGGAGATTA AAACTCTCTA

VN1194H5

EcoRI

C S V A G W L L G N P M C D E F I ·

2201 TGTAGTGTAG CTGGATGGCT CCTCGGAAAC CCAATGTGTG ACGAATTCAT
ACATCACATC GACCTACCGA GGAGCCTTTG GGTTACACAC TGCTTAAGTA

VN1194H5

· N V P E W S Y I V E K A N P V N D ·

2251 CAATGTGCCG GAATGGTCTT ACATAGTGGA GAAGGCCAAT CCAGTCAATG
GTTACACGGC CTTACCAGAA TGTATCACCT CTTCCGGTTA GGTCAGTTAC

VN1194H5

· L C Y P G D F N D Y E E L K H L

2301 ACCTCTGTTA CCCAGGGGAT TTCAATGACT ATGAAGAATT GAAACACCTA
TGGAGACAAT GGGTCCCCTA AAGTTACTGA TACTTCTTAA CTTTGTGGAT

VN1194H5

L S R I N H F E K I Q I I P K S S ·

2351 TTGAGCAGAA TAAACCATTT TGAGAAAATT CAGATCATCC CCAAAAGTTC
AACTCGTCTT ATTTGGTAAA ACTCTTTTAA GTCTAGTAGG GGTTTTCAAG

VN1194H5

SacI

· W S S H E A S L G V S S A C P Y Q ·

2401 TTGGTCCAGT CATGAAGCCT CATTGGGGGT GAGCTCAGCA TGTCCATACC
AACCAGGTCA GTACTTCGGA GTAACCCCCA CTCGAGTCGT ACAGGTATGG

VN1194H5

· G K S S F F R N V V W L I K K N

2451 AGGGAAAGTC CTCCTTTTTC AGAAATGTGG TATGGCTTAT CAAAAAGAAC
TCCCTTTCAG GAGGAAAAAG TCTTTACACC ATACCGAATA GTTTTTCTTG

VN1194H5

BglII

S T Y P T I K R S Y N N T N Q E D ·

2501 AGTACATACC CAACAATAAA GAGGAGCTAC AATAATACCA ACCAAGAAGA
TCATGTATGG GTTGTTATTT CTCCTCGATG TTATTATGGT TGGTTCTTCT

VN1194H5

Figura 21(e)

```
      BglII
      ~~~
      · L  L  V   L  W  G  I   H  H  P   N  D  A   A  E  Q  T ·
2551  TCTTTTGGTA CTGTGGGGGA TTCACCATCC TAATGATGCG GCAGAGCAGA
      AGAAAACCAT GACACCCCCT AAGTGGTAGG ATTACTACGC CGTCTCGTCT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · K  L  Y   Q  N  P   T  T  Y   I  S  V   G  T  S  T
2601  CAAAGCTCTA TCAAAACCCA ACCACCTATA TTTCCGTTGG GACATCAACA
      GTTTCGAGAT AGTTTTGGGT TGGTGGATAT AAAGGCAACC CTGTAGTTGT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       L  N  Q  R   L  V  P   R  I  A   T  R  S  K   V  N  G ·
2651  CTAAACCAGA GATTGGTACC AAGAATAGCT ACTAGATCCA AAGTAAACGG
      GATTTGGTCT CTAACCATGG TTCTTATCGA TGATCTAGGT TTCATTTGCC
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · Q  S  G   R  M  E  F   F  W  T   I  L  K   P  N  D  A ·
2701  GCAAAGTGGA AGGATGGAGT TCTTCTGGAC AATTTTAAAA CCGAATGATG
      CGTTTCACCT TCCTACCTCA AGAAGACCTG TTAAAATTTT GGCTTACTAC
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                      NsiI
                                                      ~~~~~~
      · I  N  F   E  S  N   G  N  F   I  A  P   E  Y  A  Y
2751  CAATCAACTT CGAGAGTAAT GGAAATTTCA TTGCTCCAGA ATATGCATAC
      GTTAGTTGAA GCTCTCATTA CCTTTAAAGT AACGAGGTCT TATACGTATG
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       K  I  V  K   K  G  D   S  T  I   M  K  S   E  L  E  Y ·
2801  AAAATTGTCA AGAAAGGGGA CTCAACAATT ATGAAAAGTG AATTGGAATA
      TTTTAACAGT TCTTTCCCCT GAGTTGTTAA TACTTTTCAC TTAACCTTAT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · G  N  C   N  T  K  C   Q  T  P   M  G  A   I  N  S  S ·
2851  TGGTAACTGC AACACCAAGT GTCAAACTCC AATGGGGGCG ATAAACTCTA
      ACCATTGACG TTGTGGTTCA CAGTTTGAGG TTACCCCCGC TATTTGAGAT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       SphI
      ~~~~~~
      · M  P  F   H  N  I   H  P  L  T   I  G  E   C  P  K
2901  GCATGCCATT CCACAATATA CACCCTCTCA CCATCGGGGA ATGCCCCAAA
      CGTACGGTAA GGTGTTATAT GTGGGAGAGT GGTAGCCCCT TACGGGGTTT
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       Y  V  K  S   N  R  L   V  L  A   T  G  L  R   N  S  P ·
2951  TATGTGAAAT CAAACAGATT AGTCCTTGCG ACTGGGCTCA GAAATAGCCC
      ATACACTTTA GTTTGTCTAA TCAGGAACGC TGACCCGAGT CTTTATCGGG
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · Q  R  E   R  R  R  K   K  R  G   L  F  G   A  I  A  G ·
3001  TCAAAGAGAG AGAAGAAGAA AAAAGAGAGG ATTATTTGGA GCTATAGCAG
      AGTTTCTCTC TCTTCTTCTT TTTTCTCTCC TAATAAACCT CGATATCGTC
                              VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
```

Figura 21(f)

466

```
      · F  I  E  G  G  W  Q  G  M  V  D  G  W  Y  G  Y
3051  GTTTTATAGA GGGAGGATGG CAGGGAATGG TAGATGGTTG GTATGGGTAC
      CAAAATATCT CCCTCCTACC GTCCCTTACC ATCTACCAAC CATACCCATG
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                          PstI
                                          ~~~~~~
       H  H  S  N  E  Q  G  S  G  Y  A  A  D  K  E  S  T ·
3101  CACCATAGCA ACGAGCAGGG GAGTGGGTAC GCTGCAGACA AAGAATCCAC
      GTGGTATCGT TGCTCGTCCC CTCACCCATG CGACGTCTGT TTCTTAGGTG
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · Q  K  A  I  D  G  V  T  N  K  V  N  S  I  I  D  K ·
3151  TCAAAAGGCA ATAGATGGAG TCACCAATAA GGTCAACTCG ATTATTGACA
      AGTTTTCCGT TATCTACCTC AGTGGTTATT CCAGTTGAGC TAATAACTGT
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · M  N  T  Q  F  E  A  V  G  R  E  F  N  N  L  E
3201  AAATGAACAC TCAGTTTGAG GCCGTTGGAA GGGAATTTAA CAACTTAGAA
      TTTACTTGTG AGTCAAACTC CGGCAACCTT CCCTTAAATT GTTGAATCTT
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       R  R  I  E  N  L  N  K  K  M  E  D  G  F  L  D  V ·
3251  AGGAGAATAG AGAATTTAAA CAAGAAGATG GAAGACGGGT TCCTAGATGT
      TCCTCTTATC TCTTAAATTT GTTCTTCTAC CTTCTGCCCA AGGATCTACA
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                      XbaI
                                                      ~~
      · W  T  Y  N  A  E  L  L  V  L  M  E  N  E  R  T  L ·
3301  CTGGACTTAT AATGCTGAAC TTCTAGTTCT CATGGAAAAC GAGAGAACTC
      GACCTGAATA TTACGACTTG AAGATCAAGA GTACCTTTTG CTCTCTTGAG
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      XbaI
      ~~~~
      · D  F  H  D  S  N  V  K  N  L  Y  D  K  V  R  L
3351  TAGACTTTCA TGACTCAAAT GTCAAGAACC TTTACGACAA GGTCCGACTA
      ATCTGAAAGT ACTGAGTTTA CAGTTCTTGG AAATGCTGTT CCAGGCTGAT
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
       Q  L  R  D  N  A  K  E  L  G  N  G  C  F  E  F  Y ·
3401  CAGCTTAGGG ATAATGCAAA GGAGCTGGGT AACGGTTGTT TCGAGTTCTA
      GTCGAATCCC TATTACGTTT CCTCGACCCA TTGCCAACAA AGCTCAAGAT
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · H  K  C  D  N  E  C  M  E  S  V  R  N  G  T  Y  D ·
3451  TCATAAATGT GATAATGAAT GTATGGAAAG TGTAAGAAAC GGAACGTATG
      AGTATTTACA CTATTACTTA CATACCTTTC ACATTCTTTG CCTTGCATAC
                          VN1194H5
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
      · Y  P  Q  Y  S  E  E  A  R  L  K  R  E  E  I  S
3501  ACTACCCGCA GTATTCAGAA GAAGCAAGAC TAAAAAGAGA GGAAATAAGT
      TGATGGGCGT CATAAGTCTT CTTCGTTCTG ATTTTTCTCT CCTTTATTCA
                          VN1194H5
```

Figura 21(g)

467

```
                                                                    ~~~
```

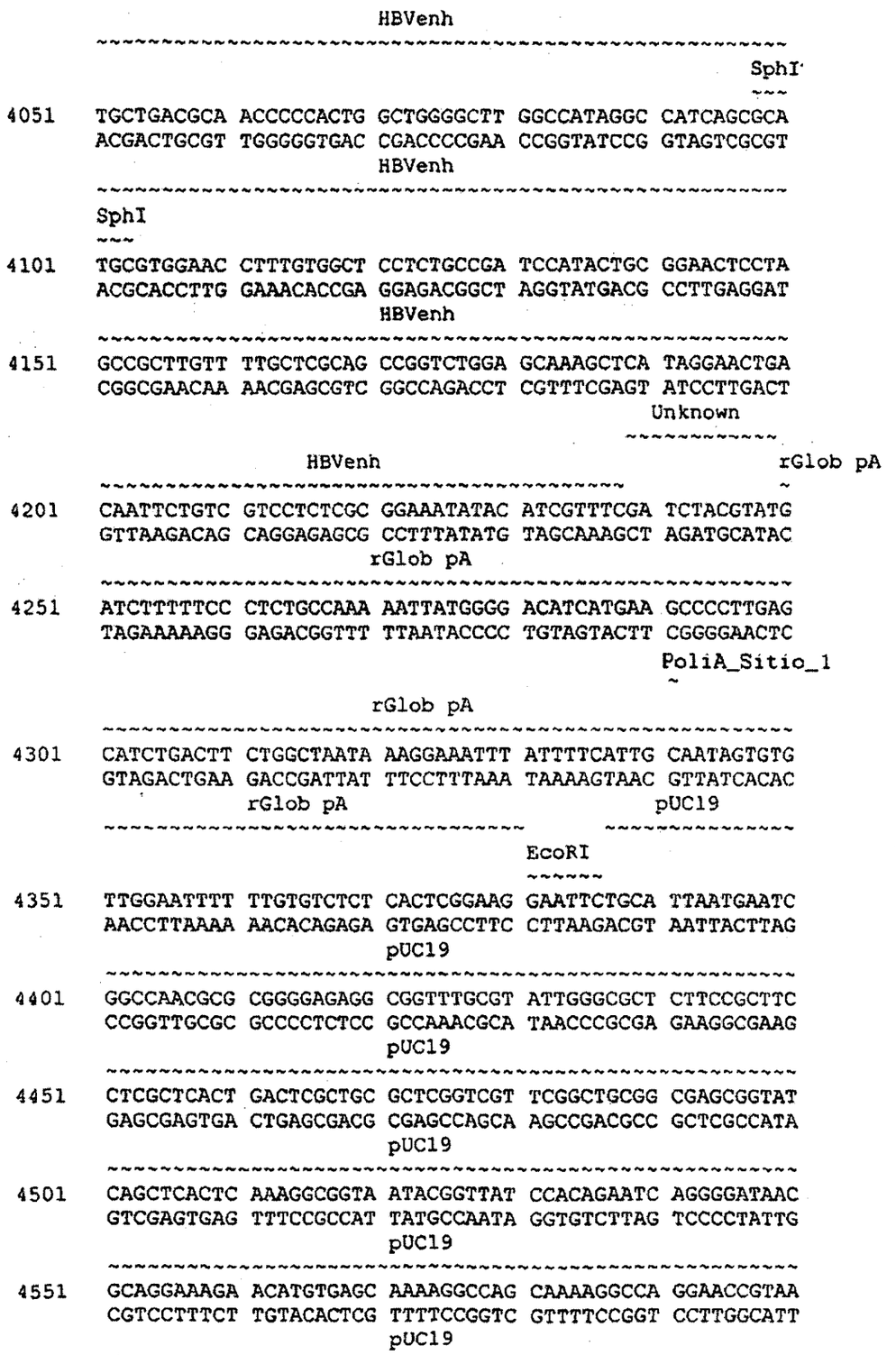

HBVenh
SphI
4051 TGCTGACGCA ACCCCCACTG GCTGGGGCTT GGCCATAGGC CATCAGCGCA
ACGACTGCGT TGGGGGTGAC CGACCCCGAA CCGGTATCCG GTAGTCGCGT
HBVenh
SphI
4101 TGCGTGGAAC CTTTGTGGCT CCTCTGCCGA TCCATACTGC GGAACTCCTA
ACGCACCTTG GAAACACCGA GGAGACGGCT AGGTATGACG CCTTGAGGAT
HBVenh
4151 GCCGCTTGTT TTGCTCGCAG CCGGTCTGGA GCAAAGCTCA TAGGAACTGA
CGGCGAACAA AACGAGCGTC GGCCAGACCT CGTTTCGAGT ATCCTTGACT
Unknown
HBVenh
rGlob pA
4201 CAATTCTGTC GTCCTCTCGC GGAAATATAC ATCGTTTCGA TCTACGTATG
GTTAAGACAG CAGGAGAGCG CCTTTATATG TAGCAAAGCT AGATGCATAC
rGlob pA
4251 ATCTTTTTCC CTCTGCCAAA AATTATGGGG ACATCATGAA GCCCCTTGAG
TAGAAAAAGG GAGACGGTTT TTAATACCCC TGTAGTACTT CGGGGAACTC
PoliA_Sitio_1
rGlob pA
4301 CATCTGACTT CTGGCTAATA AAGGAAATTT ATTTTCATTG CAATAGTGTG
GTAGACTGAA GACCGATTAT TTCCTTTAAA TAAAAGTAAC GTTATCACAC
rGlob pA
pUC19
EcoRI
4351 TTGGAATTTT TTGTGTCTCT CACTCGGAAG GAATTCTGCA TTAATGAATC
AACCTTAAAA AACACAGAGA GTGAGCCTTC CTTAAGACGT AATTACTTAG
pUC19
4401 GGCCAACGCG CGGGGAGAGG CGGTTTGCGT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC
CCGGTTGCGC GCCCCTCTCC GCCAAACGCA TAACCCGCGA GAAGGCGAAG
pUC19
4451 CTCGCTCACT GACTCGCTGC GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT
GAGCGAGTGA CTGAGCGACG CGAGCCAGCA AGCCGACGCC GCTCGCCATA
pUC19
4501 CAGCTCACTC AAAGGCGGTA ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC
GTCGAGTGAG TTTCCGCCAT TATGCCAATA GGTGTCTTAG TCCCCTATTG
pUC19
4551 GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA
CGTCCTTTCT TGTACACTCG TTTTCCGGTC GTTTTCCGGT CCTTGGCATT
pUC19

Figura 21(i)

```
                                                            ~~~~~~~~~~
4601    AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC
        TTTCCGGCGC AACGACCGCA AAAAGGTATC CGAGGCGGGG GGACTGCTCG
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4651    ATCACAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GGCGAAACCC GACAGGACTA
        TAGTGTTTTT AGCTGCGAGT TCAGTCTCCA CCGCTTTGGG CTGTCCTGAT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4701    TAAAGATACC AGGCGTTTCC CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT
        ATTTCTATGG TCCGCAAAGG GGGACCTTCG AGGGAGCACG CGAGAGGACA
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4751    TCCGACCCTG CCGCTTACCG GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCGGGAA
        AGGCTGGGAC GGCGAATGGC CTATGGACAG GCGGAAAGAG GGAAGCCCTT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4801    GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG
        CGCACCGCGA AAGAGTATCG AGTGCGACAT CCATAGAGTC AAGCCACATC
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4851    GTCGTTCGCT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA
        CAGCAAGCGA GGTTCGACCC GACACACGTG CTTGGGGGGC AAGTCGGGCT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4901    CCGCTGCGCC TTATCCGGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
        GGCGACGCGG AATAGGCCAT TGATAGCAGA ACTCAGGTTG GGCCATTCTG
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
4951    ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG
        TGCTGAATAG CGGTGACCGT CGTCGGTGAC CATTGTCCTA ATCGTCTCGC
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5001    AGGTATGTAG GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACTACGG
        TCCATACATC CGCCACGATG TCTCAAGAAC TTCACCACCG GATTGATGCC
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5051    CTACACTAGA AGAACAGTAT TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA
        GATGTGATCT TCTTGTCATA AACCATAGAC GCGAGACGAC TTCGGTCAAT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5101    CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT AGCTCTTGAT CCGGCAAACA AACCACCGCT
        GGAAGCCTTT TTCTCAACCA TCGAGAACTA GGCCGTTTGT TTGGTGGCGA
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5151    GGTAGCGGTG GTTTTTTTGT TTGCAAGCAG CAGATTACGC GCAGAAAAAA
        CCATCGCCAC CAAAAAAACA AACGTTCGTC GTCTAATGCG CGTCTTTTTT
                                pUC19
        ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5201    AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
        TCCTAGAGTT CTTCTAGGAA ACTAGAAAAG ATGCCCCAGA CTGCGAGTCA
```

Figura 21(j)

470

```
                              pUC19
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5251  GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG
      CCTTGCTTTT GAGTGCAATT CCCTAAAACC AGTACTCTAA TAGTTTTTCC
                              pUC19
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5301  ATCTTCACCT AGATCCTTTT AAATTAAAAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA
      TAGAAGTGGA TCTAGGAAAA TTTAATTTTT ACTTCAAAAT TTAGTTAGAT
                              pUC19
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5351  AAGTATATAT GAGTAAACTT GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG
      TTCATATATA CTCATTTGAA CCAGACTGTC AATGGTTACG AATTAGTCAC
                              pUC19
      ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
5401  AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGTCTATTTC GTTCATCCAT AGTTGCCTGA
      TCCGTGGATA GAGTCGCTAG ACAGATAAAG CAAGTAGGTA TCAACGGACT
      pUC19
      ~~~
5451  CTC
      GAG
```

Figura 21(k)

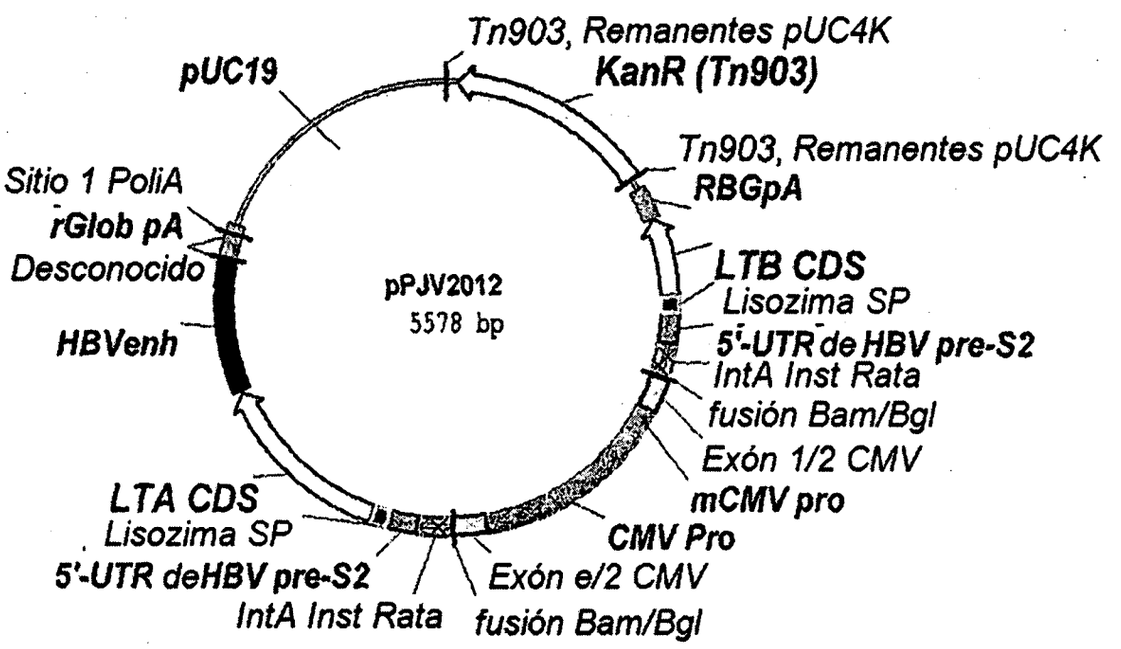

Tn903, Remanentes pUC4K
KanR (Tn903)
pUC19
Tn903, Remanentes pUC4K
RBGpA
Sitio 1 PoliA
rGlob pA
Desconocido
LTB CDS
Lisozima SP
pPJV2012
5578 bp
HBVenh
5'-UTR de HBV pre-S2
IntA Inst Rata
fusión Bam/Bgl
Exón 1/2 CMV
mCMV pro
LTA CDS
Lisozima SP
CMV Pro
5'-UTR deHBV pre-S2
Exón e/2 CMV
IntA Inst Rata
fusión Bam/Bgl

Figura 22

472

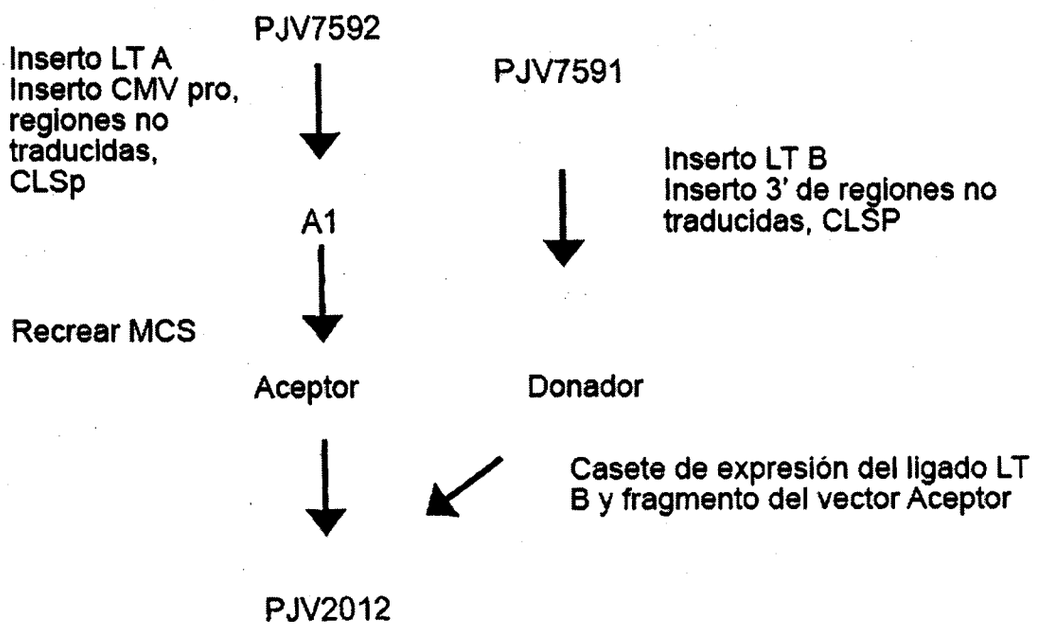


Figura 23

```
1    GGCGTAATGC TCTGCCAGTG TTACAACCAA TTAACCAATT CTGATTAGAA AAACTCATCG AGCATCAAAT GAAACTGCAA TTTATTCATA TCAGGATTAT
     CCGCATTACG AGACGGTCAC AATGTTGGTT AATTGGTTAA GACTAATCTT TTTGAGTAGC TCGTAGTTTA CTTTGACGTT AAATAAGTAT AGTCCTAATA
                                                  ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                                                KanR (Tn903)
101  CAATACCATA TTTTTGAAAA AGCCGTTTCT GTAATGAAGG AGAAAACTCA CCGAGGCAGT TCCATAGGAT GGCAAGATCC TGGTATCGGT CTGCGATTCC
     GTTATGGTAT AAAAACTTTT TCGGCAAAGA CATTACTTCC TCTTTTGAGT GGCTCCGTCA AGGTATCCTA CCGTTCTAGG ACCATAGCCA GACGCTAAGG
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
201  GACTCGTCCA ACATCAATAC AACCTATTAA TTTCCCCTCG TCAAAAATAA GGTTATCAAG TGAGAAATCA CCATGAGTGA CGACTGAATC CGGTGAGAAT
     CTGAGCAGGT TGTAGTTATG TTGGATAATT AAAGGGGAGC AGTTTTTATT CCAATAGTTC ACTCTTTAGT GGTACTCACT GCTGACTTAG GCCACTCTTA
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
          HindIII
          -------
301  GGCAAAAGCT TATGCATTTC TTTCCAGACT TGTTCAACAG GCCAGCCATT ACGCTCGTCA TCAAAATCAC TCGCATCAAC CAAACCGTTA TTCATTCGTG
     CCGTTTTCGA ATACGTAAAG AAAGGTCTGA ACAAGTTGTC CGGTCGGTAA TGCGAGCAGT AGTTTTAGTG AGCGTAGTTG GTTTGGCAAT AAGTAAGCAC
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
401  ATTGCGCCTG AGCGAGACGA AATACGCGAT CGCTGTTAAA AGGACAATTA CAAACAGGAA TCAAATGCAA CCGGCGCAGG AACACTGCCA GCGCATCAAC
     TAACGCGGAC TCGCTCTGCT TTATGCGCTA GCGACAATTT TCCTGTTAAT GTTTGTCCTT AGTTTACGTT GGCCGCGTCC TTGTGACGGT CGCGTAGTTG
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
501  AATATTTTCA CCTGAATCAG GATATTCTTC TAATACCTGG AATGCTGTTT TCCCGGGGAT CGCAGTGGTG AGTAACCATG CATCATCAGG AGTACGGATA
     TTATAAAAGT GGACTTAGTC CTATAAGAAG ATTATGGACC TTACGACAAA AGGGCCCCTA GCGTCACCAC TCATTGGTAC GTAGTAGTCC TCATGCCTAT
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
601  AAATGCTTGA TGGTCGGAAG AGGCATAAAT TCCGTCAGCC AGTTTAGTCT GACCATCTCA TCTGTAACAT CATTGGCAAC GCTACCTTTG CCATGTTTCA
     TTTACGAACT ACCAGCCTTC TCCGTATTTA AGGCAGTCGG TCAAATCAGA CTGGTAGAGT AGACATTGTA GTAACCGTTG CGATGGAAAC GGTACAAAGT
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
701  GAAACAACTC TGGCGCATCG GGCTTCCCAT ACAATCGATA GATTGTCGCA CCTGATTGCC CGACATTATC GCGAGCCCAT TTATACCCAT ATAAATCAGC
     CTTTGTTGAG ACCGCGTAGC CCGAAGGGTA TGTTAGCTAT CTAACAGCGT GGACTAACGG GCTGTAATAG CGCTCGGGTA AATATGGGTA TATTTAGTCG
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                  KanR (Tn903)
801  ATCCATGTTG GAATTTAATC GCGGCCTCGA GCAAGACGTT TCCCGTTGAA TATGGCTCAT AACACCCCTT GTATTACTGT TTATGTAAGC AGACAGGTCG
     TAGGTACAAC CTTAAATTAG CGCCGGAGCT CGTTCTGCAA AGGGCAACTT ATACCGAGTA TTGTGGGGAA CATAATGACA AATACATTCG TCTGTCCAGC
     ~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                KanR (Tn903)
901  ACAATTCCTT CCGAGTGAGA GACACAAAAA ATTCCAACAC ACTATTGCAA TGAAAATAAA TTTCCTTTAT TAGCCAGAAG TCAGATGCTC AAGGGGCTTC
     TGTTAAGGAA GGCTCACTCT CTGTGTTTTT TAAGGTTGTG TGATAACGTT ACTTTTATTT AAAGGAAATA ATCGGTCTTC AGTCTACGAG TTCCCCGAAG
```

Figura 24(a)

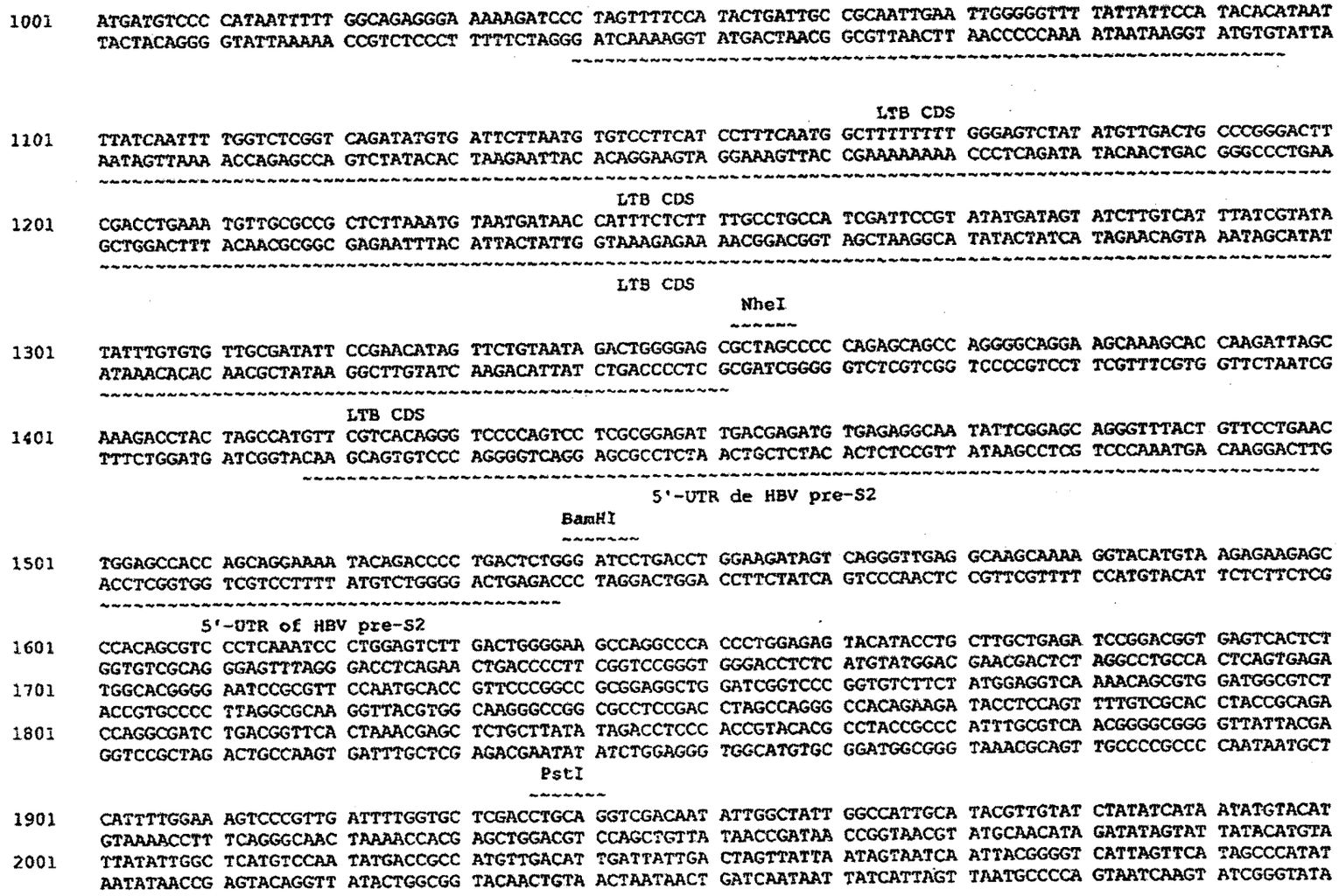

1001 ATGATGTCCC CATAATTTTT GGCAGAGGGA AAAAGATCCC TAGTTTTCCA TACTGATTGC CGCAATTGAA TTGGGGGTTT TATTATTCCA TACACATAAT
TACTACAGGG GTATTAAAAA CCGTCTCCCT TTTTCTAGGG ATCAAAAGGT ATGACTAACG GCGTTAACTT AACCCCCAAA ATAATAAGGT ATGTGTATTA
LTB CDS
1101 TTATCAATTT TGGTCTCGGT CAGATATGTG ATTCTTAATG TGTCCTTCAT CCTTTCAATG GCTTTTTTTT GGGAGTCTAT ATGTTGACTG CCCGGGACTT
AATAGTTAAA ACCAGAGCCA GTCTATACAC TAAGAATTAC ACAGGAAGTA GGAAAGTTAC CGAAAAAAAA CCCTCAGATA TACAACTGAC GGGCCCTGAA
LTB CDS
1201 CGACCTGAAA TGTTGCGCCG CTCTTAAATG TAATGATAAC CATTTCTCTT TTGCCTGCCA TCGATTCCGT ATATGATAGT ATCTTGTCAT TTATCGTATA
GCTGGACTTT ACAACGCGGC GAGAATTTAC ATTACTATTG GTAAAGAGAA AACGGACGGT AGCTAAGGCA TATACTATCA TAGAACAGTA AATAGCATAT
LTB CDS
NheI
1301 TATTTGTGTG TTGCGATATT CCGAACATAG TTCTGTAATA GACTGGGGAG CGCTAGCCCC CAGAGCAGCC AGGGGCAGGA AGCAAAGCAC CAAGATTAGC
ATAAACACAC AACGCTATAA GGCTTGTATC AAGACATTAT CTGACCCCTC GCGATCGGGG GTCTCGTCGG TCCCCGTCCT TCGTTTCGTG GTTCTAATCG
LTB CDS
1401 AAAGACCTAC TAGCCATGTT CGTCACAGGG TCCCCAGTCC TCGCGGAGAT TGACGAGATG TGAGAGGCAA TATTCGGAGC AGGGTTTACT GTTCCTGAAC
TTTCTGGATG ATCGGTACAA GCAGTGTCCC AGGGGTCAGG AGCGCCTCTA ACTGCTCTAC ACTCTCCGTT ATAAGCCTCG TCCCAAATGA CAAGGACTTG
5'-UTR de HBV pre-S2
BamHI
1501 TGGAGCCACC AGCAGGAAAA TACAGACCCC TGACTCTGGG ATCCTGACCT GGAAGATAGT CAGGGTTGAG GCAAGCAAAA GGTACATGTA AGAGAAGAGC
ACCTCGGTGG TCGTCCTTTT ATGTCTGGGG ACTGAGACCC TAGGACTGGA CCTTCTATCA GTCCCAACTC CGTTCGTTTT CCATGTACAT TCTCTTCTCG
5'-UTR of HBV pre-S2
1601 CCACAGCGTC CCTCAAATCC CTGGAGTCTT GACTGGGGAA GCCAGGCCCA CCCTGGAGAG TACATACCTG CTTGCTGAGA TCCGGACGGT GAGTCACTCT
GGTGTCGCAG GGAGTTTAGG GACCTCAGAA CTGACCCCTT CGGTCCGGGT GGGACCTCTC ATGTATGGAC GAACGACTCT AGGCCTGCCA CTCAGTGAGA
1701 TGGCACGGGG AATCCGCGTT CCAATGCACC GTTCCCGGCC GCGGAGGCTG GATCGGTCCC GGTGTCTTCT ATGGAGGTCA AAACAGCGTG GATGGCGTCT
ACCGTGCCCC TTAGGCGCAA GGTTACGTGG CAAGGGCCGG CGCCTCCGAC CTAGCCAGGG CCACAGAAGA TACCTCCAGT TTTGTCGCAC CTACCGCAGA
1801 CCAGGCGATC TGACGGTTCA CTAAACGAGC TCTGCTTATA TAGACCTCCC ACCGTACACG CCTACCGCCC ATTTGCGTCA ACGGGGCGGG GTTATTACGA
GGTCCGCTAG ACTGCCAAGT GATTTGCTCG AGACGAATAT ATCTGGAGGG TGGCATGTGC GGATGGCGGG TAAACGCAGT TGCCCCGCCC CAATAATGCT
PstI
1901 CATTTTGGAA AGTCCCGTTG ATTTTGGTGC TCGACCTGCA GGTCGACAAT ATTGGCTATT GGCCATTGCA TACGTTGTAT CTATATCATA ATATGTACAT
GTAAAACCTT TCAGGGCAAC TAAAACCACG AGCTGGACGT CCAGCTGTTA TAACCGATAA CCGGTAACGT ATGCAACATA GATATAGTAT TATACATGTA
2001 TTATATTGGC TCATGTCCAA TATGACCGCC ATGTTGACAT TGATTATTGA CTAGTTATTA ATAGTAATCA ATTACGGGGT CATTAGTTCA TAGCCCATAT
AATATAACCG AGTACAGGTT ATACTGGCGG TACAACTGTA ACTAATAACT GATCAATAAT TATCATTAGT TAATGCCCCA GTAATCAAGT ATCGGGTATA

Figura 24(b)

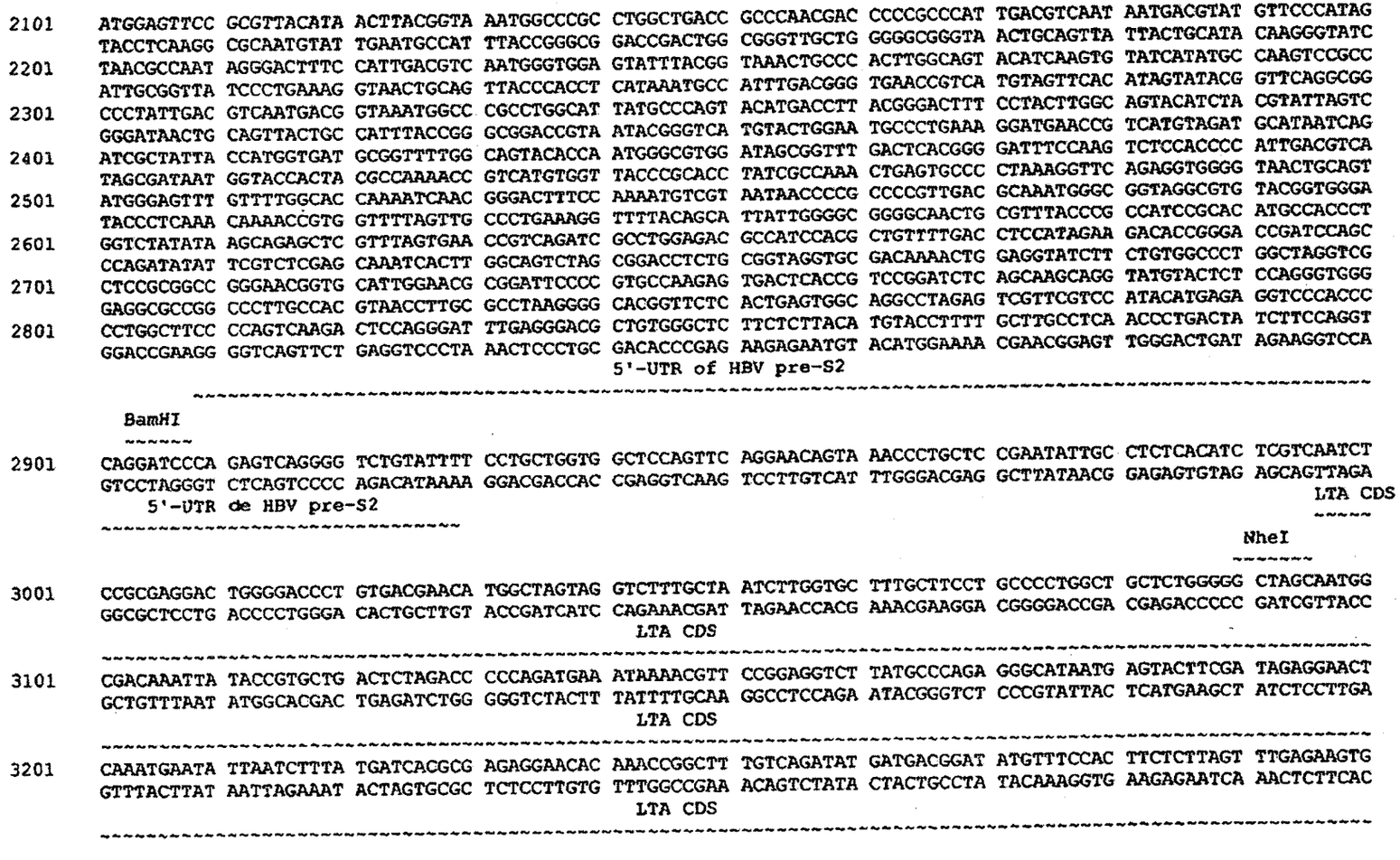

2101 ATGGAGTTCC GCGTTACATA ACTTACGGTA AATGGCCCGC CTGGCTGACC GCCCAACGAC CCCCGCCCAT TGACGTCAAT AATGACGTAT GTTCCCATAG
TACCTCAAGG CGCAATGTAT TGAATGCCAT TTACCGGGCG GACCGACTGG CGGGTTGCTG GGGGCGGGTA ACTGCAGTTA TTACTGCATA CAAGGGTATC
2201 TAACGCCAAT AGGGACTTTC CATTGACGTC AATGGGTGGA GTATTTACGG TAAACTGCCC ACTTGGCAGT ACATCAAGTG TATCATATGC CAAGTCCGCC
ATTGCGGTTA TCCCTGAAAG GTAACTGCAG TTACCCACCT CATAAATGCC ATTTGACGGG TGAACCGTCA TGTAGTTCAC ATAGTATACG GTTCAGGCGG
2301 CCCTATTGAC GTCAATGACG GTAAATGGCC CGCCTGGCAT TATGCCCAGT ACATGACCTT ACGGGACTTT CCTACTTGGC AGTACATCTA CGTATTAGTC
GGGATAACTG CAGTTACTGC CATTTACCGG GCGGACCGTA ATACGGGTCA TGTACTGGAA TGCCCTGAAA GGATGAACCG TCATGTAGAT GCATAATCAG
2401 ATCGCTATTA CCATGGTGAT GCGGTTTTGG CAGTACACCA ATGGGCGTGG ATAGCGGTTT GACTCACGGG GATTTCCAAG TCTCCACCCC ATTGACGTCA
TAGCGATAAT GGTACCACTA CGCCAAAACC GTCATGTGGT TACCCGCACC TATCGCCAAA CTGAGTGCCC CTAAAGGTTC AGAGGTGGGG TAACTGCAGT
2501 ATGGGAGTTT GTTTTGGCAC CAAAATCAAC GGGACTTTCC AAAATGTCGT AATAACCCCG CCCCGTTGAC GCAAATGGGC GGTAGGCGTG TACGGTGGGA
TACCCTCAAA CAAAACCGTG GTTTTAGTTG CCCTGAAAGG TTTTACAGCA TTATTGGGGC GGGGCAACTG CGTTTACCCG CCATCCGCAC ATGCCACCCT
2601 GGTCTATATA AGCAGAGCTC GTTTAGTGAA CCGTCAGATC GCCTGGAGAC GCCATCCACG CTGTTTTGAC CTCCATAGAA GACACCGGGA CCGATCCAGC
CCAGATATAT TCGTCTCGAG CAAATCACTT GGCAGTCTAG CGGACCTCTG CGGTAGGTGC GACAAAACTG GAGGTATCTT CTGTGGCCCT GGCTAGGTCG
2701 CTCCGCGGCC GGGAACGGTG CATTGGAACG CGGATTCCCC GTGCCAAGAG TGACTCACCG TCCGGATCTC AGCAAGCAGG TATGTACTCT CCAGGGTGGG
GAGGCGCCGG CCCTTGCCAC GTAACCTTGC GCCTAAGGGG CACGGTTCTC ACTGAGTGGC AGGCCTAGAG TCGTTCGTCC ATACATGAGA GGTCCCACCC
2801 CCTGGCTTCC CCAGTCAAGA CTCCAGGGAT TTGAGGGACG CTGTGGGCTC TTCTCTTACA TGTACCTTTT GCTTGCCTCA ACCCTGACTA TCTTCCAGGT
GGACCGAAGG GGTCAGTTCT GAGGTCCCTA AACTCCCTGC GACACCCGAG AAGAGAATGT ACATGGAAAA CGAACGGAGT TGGGACTGAT AGAAGGTCCA
5'-UTR of HBV pre-S2
BamHI
5'-UTR de HBV pre-S2
2901 CAGGATCCCA GAGTCAGGGG TCTGTATTTT CCTGCTGGTG GCTCCAGTTC AGGAACAGTA AACCCTGCTC CGAATATTGC CTCTCACATC TCGTCAATCT
GTCCTAGGGT CTCAGTCCCC AGACATAAAA GGACGACCAC CGAGGTCAAG TCCTTGTCAT TTGGGACGAG GCTTATAACG GAGAGTGTAG AGCAGTTAGA
LTA CDS
NheI
3001 CCGCGAGGAC TGGGGACCCT GTGACGAACA TGGCTAGTAG GTCTTTGCTA ATCTTGGTGC TTTGCTTCCT GCCCCTGGCT GCTCTGGGGG CTAGCAATGG
GGCGCTCCTG ACCCCTGGGA CACTGCTTGT ACCGATCATC CAGAAACGAT TAGAACCACG AAACGAAGGA CGGGGACCGA CGAGACCCCC GATCGTTACC
LTA CDS
3101 CGACAAATTA TACCGTGCTG ACTCTAGACC CCCAGATGAA ATAAAACGTT CCGGAGGTCT TATGCCCAGA GGGCATAATG AGTACTTCGA TAGAGGAACT
GCTGTTTAAT ATGGCACGAC TGAGATCTGG GGGTCTACTT TATTTTGCAA GGCCTCCAGA ATACGGGTCT CCCGTATTAC TCATGAAGCT ATCTCCTTGA
LTA CDS
3201 CAAATGAATA TTAATCTTTA TGATCACGCG AGAGGAACAC AAACCGGCTT TGTCAGATAT GATGACGGAT ATGTTTCCAC TTCTCTTAGT TTGAGAAGTG
GTTTACTTAT AATTAGAAAT ACTAGTGCGC TCTCCTTGTG TTTGGCCGAA ACAGTCTATA CTACTGCCTA TACAAAGGTG AAGAGAATCA AACTCTTCAC
LTA CDS

Figura 24(c)

3301 CTCACTTAGC AGGACAGTCT ATATTATCAG GATATTCCAC TTACTATATA TATGTTATAG CGACAGCACC AAATATGTTT AATGTTAATG ATGTATTAGG
GAGTGAATCG TCCTGTCAGA TATAATAGTC CTATAAGGTG AATGATATAT ATACAATATC GCTGTCGTGG TTTATACAAA TTACAATTAC TACATAATCC
LTA CDS
3401 CGTATACAGC CCTCACCCAT ATGAACAGGA GGTTTCTGCG TTAGGTGGAA TACCATATTC TCAGATATAT GGATGGTATC GTGTTAATTT TGGTGTGATT
GCATATGTCG GGAGTGGGTA TACTTGTCCT CCAAAGACGC AATCCACCTT ATGGTATAAG AGTCTATATA CCTACCATAG CACAATTAAA ACCACACTAA
LTA CDS
3501 GATGAACGAT TACATCGTAA CAGGGAATAT AGAGACCGGT ATTACAGAAA TCTGAATATA GCTCCGGCAG AGGATGGTTA CAGATTAGCA GGTTTCCCAC
CTACTTGCTA ATGTAGCATT GTCCCTTATA TCTCTGGCCA TAATGTCTTT AGACTTATAT CGAGGCCGTC TCCTACCAAT GTCTAATCGT CCAAAGGGTG
LTA CDS
HindIII
3601 CGGATCACCA AGCTTGGAGA GAAGAACCCT GGATTCATCA TGCACCACAA GGTTGTGGAA ATTCATCAAG AACAATTACA GGTGATACTT GTAATGAGGA
GCCTAGTGGT TCGAACCTCT CTTCTTGGGA CCTAAGTAGT ACGTGGTGTT CCAACACCTT TAAGTAGTTC TTGTTAATGT CCACTATGAA CATTACTCCT
LTA CDS
EcoRI
3701 GACCCAGAAT CTGAGCACAA TATATCTCAG GAAATATCAA TCAAAAGTTA AGAGGCAGAT ATTTTCAGAC TATCAGTCAG AGGTTGACAT ATATAACAGA
CTGGGTCTTA GACTCGTGTT ATATAGAGTC CTTTATAGTT AGTTTTCAAT TCTCCGTCTA TAAAAGTCTG ATAGTCAGTC TCCAACTGTA TATATTGTCT
LTA CDS
EcoRI
3801 ATTCGGGATG AATTATGAGG ATCTGGGCCC TAACAAAACA AAAAGATGGG GTTATTCCCT AAACTTCATG GGTTACGTAA TTGGAAGTTG GGGGACATTG
TAAGCCCTAC TTAATACTCC TAGACCCGGG ATTGTTTTGT TTTTCTACCC CAATAAGGGA TTTGAAGTAC CCAATGCATT AACCTTCAAC CCCCTGTAAC
3901 CCACAAGATC ATATTGTACA AAAGATCAAA CACTGTTTTA GAAAACTTCC TGTAAACAGG CCTATTGATT GGAAAGTATG TCAAAGGATT GTGGGTCTTT
GGTGTTCTAG TATAACATGT TTTCTAGTTT GTGACAAAAT CTTTTGAAGG ACATTTGTCC GGATAACTAA CCTTTCATAC AGTTTCCTAA CACCCAGAAA
4001 TGGGCTTTGC TGCTCCATTT ACACAATGTG GATATCCTGC CTTAATGCCT TTGTATGCAT GTATACAAGC TAAACAGGCT TTCACTTTCT CGCCAACTTA
ACCCGAAACG ACGAGGTAAA TGTGTTACAC CTATAGGACG GAATTACGGA AACATACGTA CATATGTTCG ATTTGTCCGA AAGTGAAAGA GCGGTTGAAT
4101 CAAGGCCTTT CTAAGTAAAC AGTACATGAA CCTTTACCCC GTTGCTCGGC AACGGCCTGG TCTGTGCCAA GTGTTTGCTG ACGCAACCCC CACTGGCTGG
GTTCCGGAAA GATTCATTTG TCATGTACTT GGAAATGGGG CAACGAGCCG TTGCCGGACC AGACACGGTT CACAAACGAC TGCGTTGGGG GTGACCGACC
4201 GGCTTGGCCA TAGGCCATCA GCGCATGCGT GGAACCTTTG TGGCTCCTCT GCCGATCCAT ACTGCGGAAC TCCTAGCCGC TTGTTTTGCT CGCAGCCGGT
CCGAACCGGT ATCCGGTAGT CGCGTACGCA CCTTGGAAAC ACCGAGGAGA CGGCTAGGTA TGACGCCTTG AGGATCGGCG AACAAAACGA GCGTCGGCCA
4301 CTGGAGCAAA GCTCATAGGA ACTGACAATT CTGTCGTCCT CTCGCGGAAA TATACATCGT TTCGATCTAC GTATGATCTT TTTCCCTCTG CCAAAAATTA
GACCTCGTTT CGAGTATCCT TGACTGTTAA GACAGCAGGA GAGCGCCTTT ATATGTAGCA AAGCTAGATG CATACTAGAA AAAGGGAGAC GGTTTTTAAT

Figura 24(d)

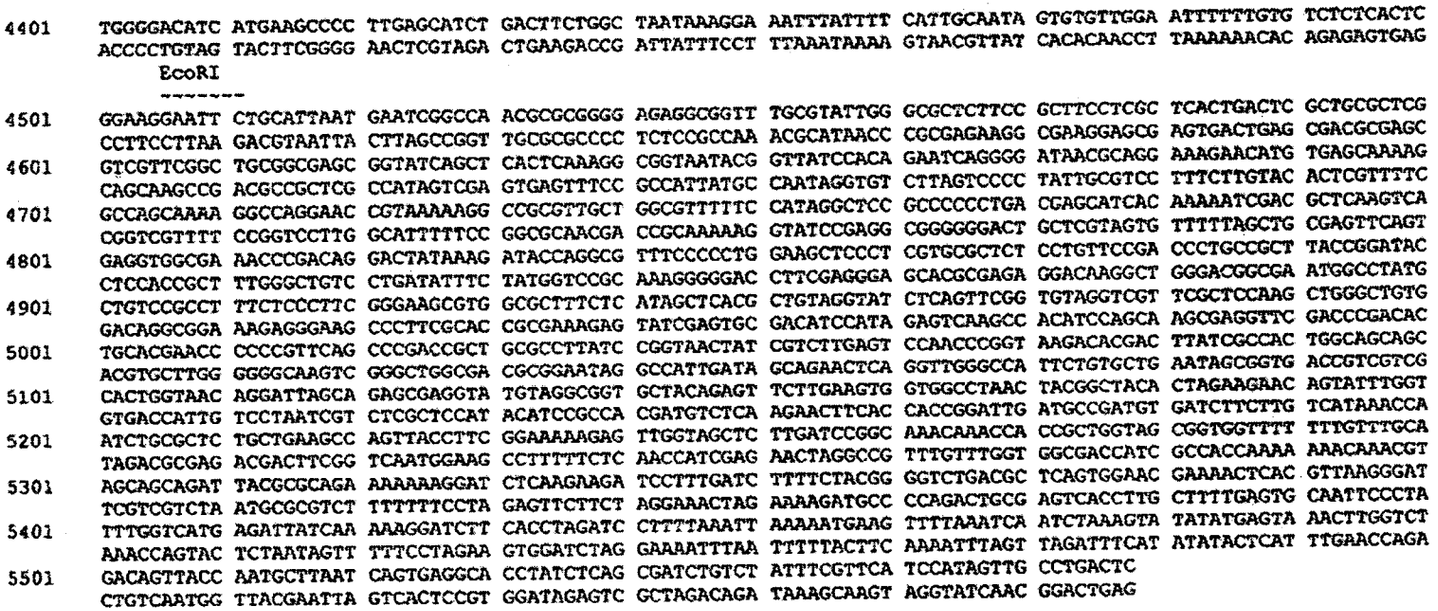

4401 TGGGGACATC ATGAAGCCCC TTGAGCATCT GACTTCTGGC TAATAAAGGA AATTTATTTT CATTGCAATA GTGTGTTGGA ATTTTTTGTG TCTCTCACTC
ACCCCTGTAG TACTTCGGGG AACTCGTAGA CTGAAGACCG ATTATTTCCT TTAAATAAAA GTAACGTTAT CACACAACCT TAAAAAACAC AGAGAGTGAG
EcoRI
4501 GGAAGGAATT CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGGCGGTT TGCGTATTGG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
CCTTCCTTAA GACGTAATTA CTTAGCCGGT TGCGCGCCCC TCTCCGCCAA ACGCATAACC CGCGAGAAGG CGAGGAGCG AGTGACTGAG CGACGCGAGC
4601 GTCGTTCGGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
CAGCAAGCCG ACGCCGCTCG CCATAGTCGA GTGAGTTTCC GCCATTATGC CAATAGGTGT CTTAGTCCCC TATTGCGTCC TTTCTTGTAC ACTCGTTTTC
4701 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
CGGTCGTTTT CCGGTCCTTG GCATTTTTCC GGCGCAACGA CCGCAAAAAG GTATCCGAGG CGGGGGGACT GCTCGTAGTG TTTTTAGCTG CGAGTTCAGT
4801 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
CTCCACCGCT TTGGGCTGTC CTGATATTTC TATGGTCCGC AAAGGGGGAC CTTCGAGGGA GCACGCGAGA GGACAAGGCT GGGACGGCGA ATGGCCTATG
4901 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
GACAGGCGGA AAGAGGGAAG CCCTTCGCAC CGCGAAAGAG TATCGAGTGC GACATCCATA GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCGAGGTTC GACCCGACAC
5001 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
ACGTGCTTGG GGGGCAAGTC GGGCTGGCGA CGCGGAATAG GCCATTGATA GCAGAACTCA GGTTGGGCCA TTCTGTGCTG AATAGCGGTG ACCGTCGTCG
5101 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGAAC AGTATTTGGT
GTGACCATTG TCCTAATCGT CTCGCTCCAT ACATCCGCCA CGATGTCTCA AGAACTTCAC CACCGGATTG ATGCCGATGT GATCTTCTTG TCATAAACCA
5201 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGCA
TAGACGCGAG ACGACTTCGG TCAATGGAAG CCTTTTTCTC AACCATCGAG AACTAGGCCG TTTGTTTGGT GGCGACCATC GCCACCAAAA AAACAAACGT
5301 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
TCGTCGTCTA ATGCGCGTCT TTTTTTCCTA GAGTTCTTCT AGGAAACTAG AAAAGATGCC CCAGACTGCG AGTCACCTTG CTTTTGAGTG CAATTCCCTA
5401 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
AAACCAGTAC TCTAATAGTT TTTCCTAGAA GTGGATCTAG GAAAATTTAA TTTTTACTTC AAAATTTAGT TAGATTTCAT ATATACTCAT TTGAACCAGA
5501 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTC
CTGTCAATGG TTACGAATTA GTCACTCCGT GGATAGAGTC GCTAGACAGA TAAAGCAAGT AGGTATCAAC GGACTGAG

Figura 24(e)

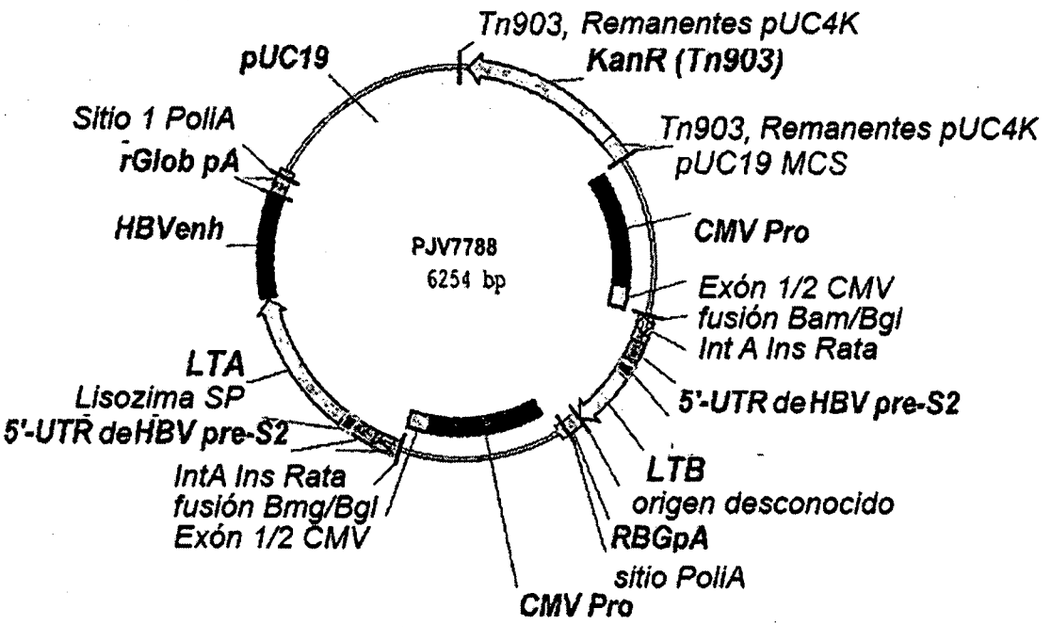

Tn903, Remanentes pUC4K
KanR (Tn903)
pUC19
Sitio 1 PolIA
rGlob pA
Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19 MCS
HBVenh
PJV7788
6254 bp
CMV Pro
Exón 1/2 CMV
fusión Bam/Bgl
Int A Ins Rata
LTA
Lisozima SP
5'-UTR de HBV pre-S2
5'-UTR de HBV pre-S2
LTB
origen desconocido
IntA Ins Rata
fusión Bmg/Bgl
Exón 1/2 CMV
RBGpA
sitio PolIA
CMV Pro

Figura 25

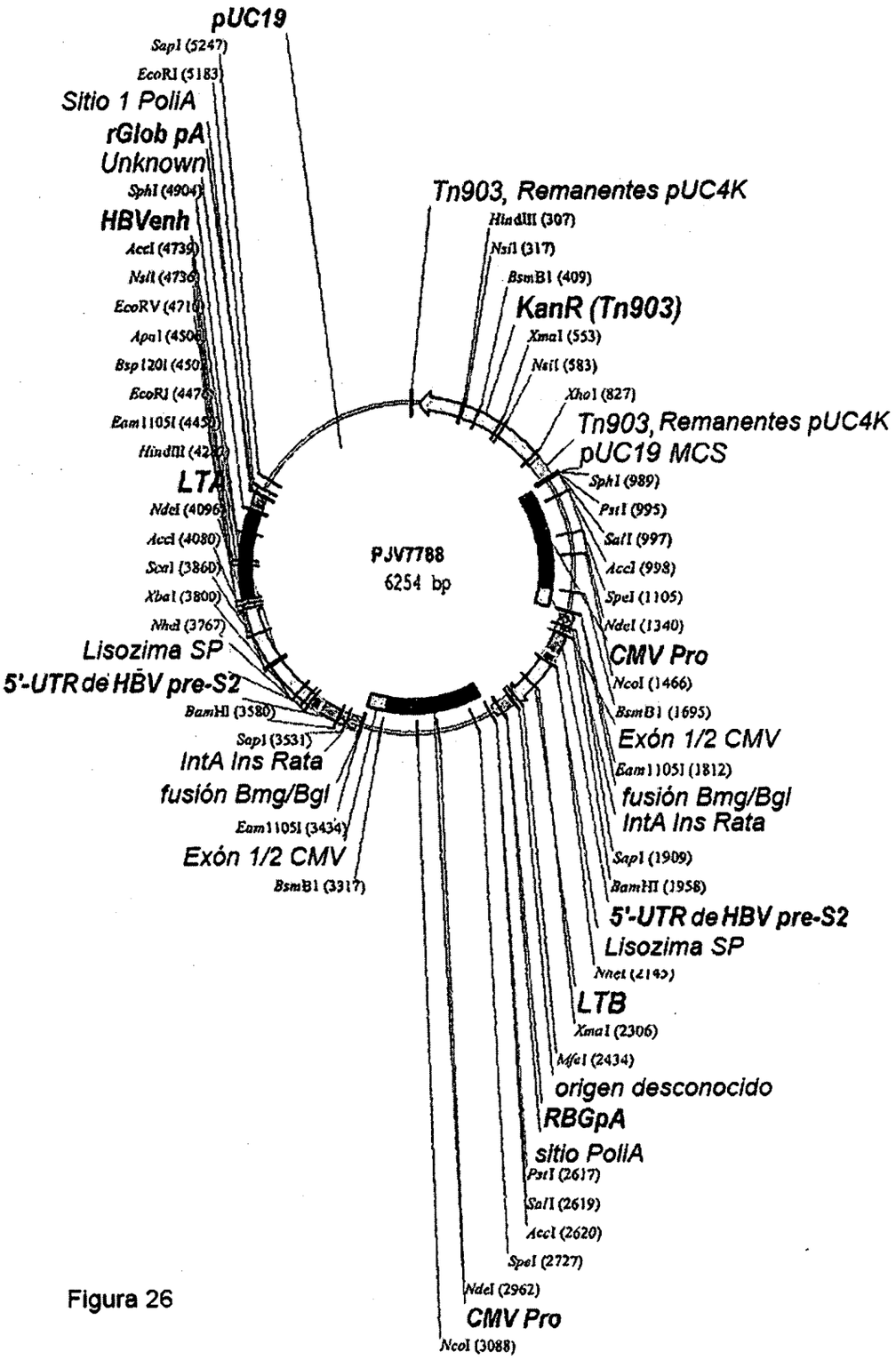

pUC19
SapI (5247)
EcoRI (5183)
Sitio 1 PolIA
rGlob pA
Unknown
SphI (4904)
HBVenh
AccI (4739)
NsiI (4736)
EcoRV (4710)
ApaI (4506)
Bsp120I (4503)
EcoRI (4476)
Eam1105I (4452)
HindIII (4227)
LTA
NdeI (4096)
AccI (4080)
ScaI (3860)
XbaI (3800)
NheI (3767)
Lisozima SP
5'-UTR de HBV pre-S2
BamHI (3580)
SapI (3531)
IntA Ins Rata
fusión Bmg/Bgl
Eam1105I (3434)
Exón 1/2 CMV
BsmBI (3317)
Tn903, Remanentes pUC4K
HindIII (307)
NsiI (317)
BsmBI (409)
KanR (Tn903)
XmaI (553)
NsiI (583)
XhoI (827)
Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19 MCS
SphI (989)
PstI (995)
SalI (997)
AccI (998)
SpeI (1105)
NdeI (1340)
CMV Pro
NcoI (1466)
BsmBI (1695)
Exón 1/2 CMV
Eam1105I (1812)
fusión Bmg/Bgl
IntA Ins Rata
SapI (1909)
BamHI (1958)
5'-UTR de HBV pre-S2
Lisozima SP
NheI (2145)
LTB
XmaI (2306)
MfeI (2434)
origen desconocido
RBGpA
sitio PolIA
PstI (2617)
SalI (2619)
AccI (2620)
SpeI (2727)
NdeI (2962)
CMV Pro
NcoI (3088)
PJV7788
6254 bp

Figura 26

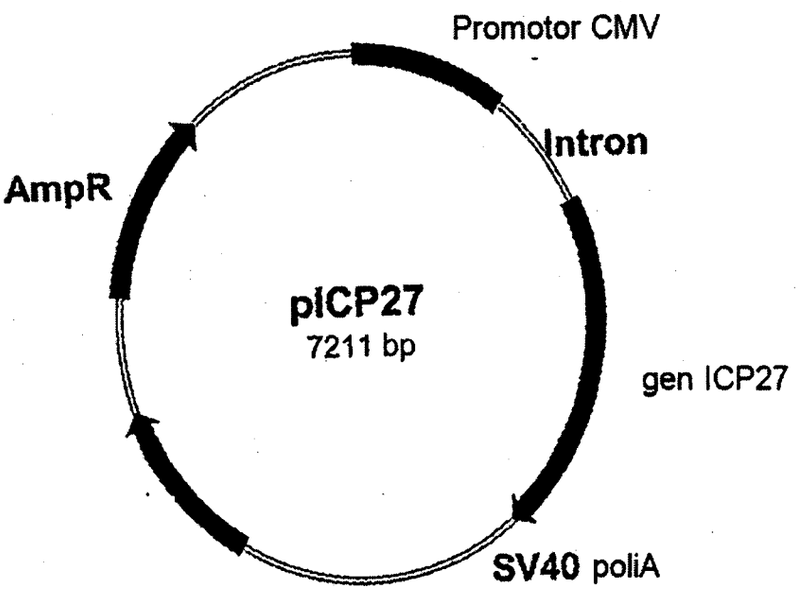

Promotor CMV
Intron
AmpR
pICP27
7211 bp
gen ICP27
SV40 poliA

Figura 27

481

MATDIDMLID LGLDLSDSEL EEDALERDEE GRRDDPESDS SGECSSSDED
MEDPCGDGGA EAIDAAIPKG PPARPEDAGT PEASTPRPAA RRGADDPPPA
TTGVWSRLGT RRSASPREPH GGKVARIQPP STKAPHPRGG RRGRRRGRGR
YGPGGADSTP NPRRRVSRNA HNQGGRHPAS ARTDGPGATH GEARRGGEQL
DVSGGPRPRG TRQAPPPLMA LSLTPPHADG RAPVPERKAP SADTIDPAVR
AVLRSISERA AVERISESFG RSALVMQDPF GGMPFPAANS PWAPVLATQA
GGFDAETRRV SWETLVAHGP SLYRTFAANP RAASTAKAMR DCVLRQENLI
EALASADETL AWCKMCIHHN LPLRPQDPII GTAAAVLENL ATRLRPFLQC
YLKARGLCGL DDLCSRRRLS DIKDIASFVL VILARLANRV ERGVSEIDYT
TVGVGAGETM HFYIPGACMA GLIEILDTHR QECSSRVCEL TASHTIAPLY
VHGKYFYCNS LF

Figura 28

Figura 29 a

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12
BS												
BN												
CS												
CN												

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
BS						
BN						
CS						
CN						

Figura 29 b

#45 RVSWETLVA**HGPSLYRTF** (SEC ID NO:66)
#46 VA**HGPS**LYRTFAANPRAA (SEC ID NO:67)

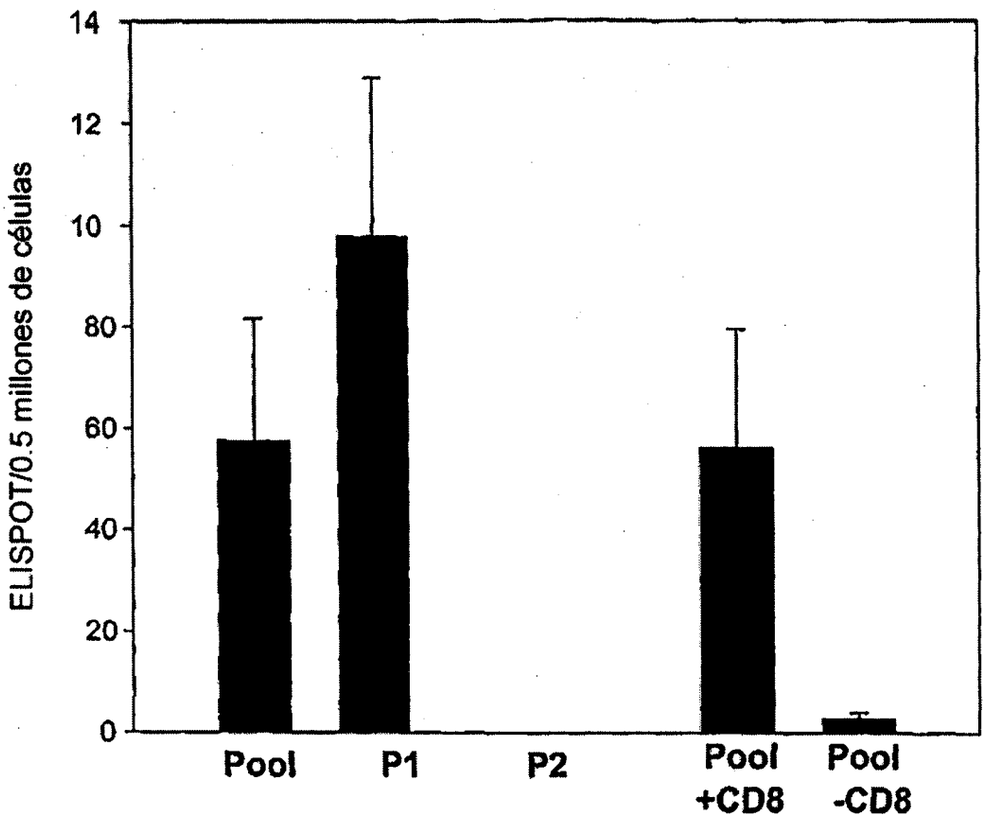

ELISPOT/0.5 millones de células
14
12
10
80
60
40
20
0
Pool
P1
P2
Pool +CD8
Pool -CD8

Figura 30

483

Figura 31 a

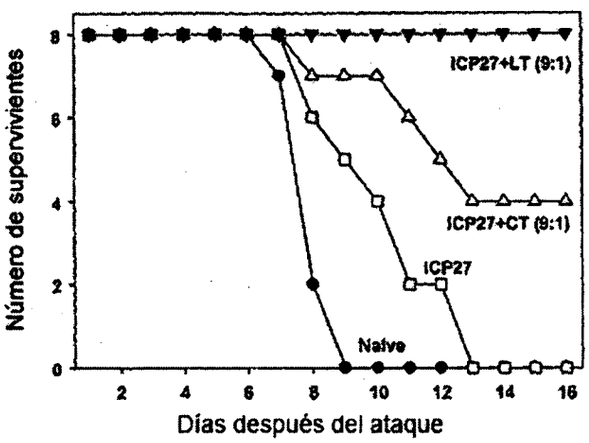


Figura 31 b

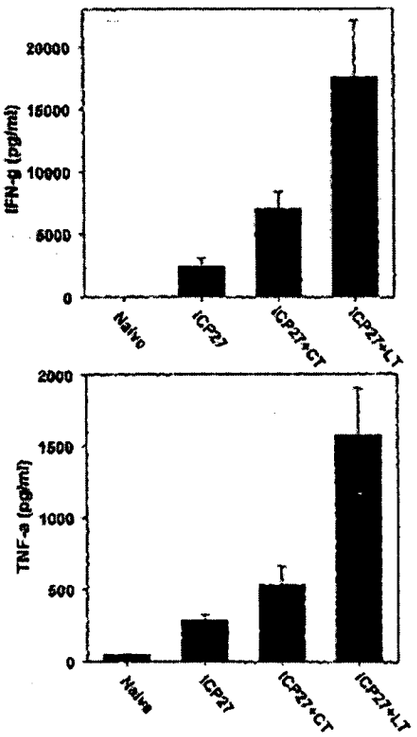


Figura 31 c

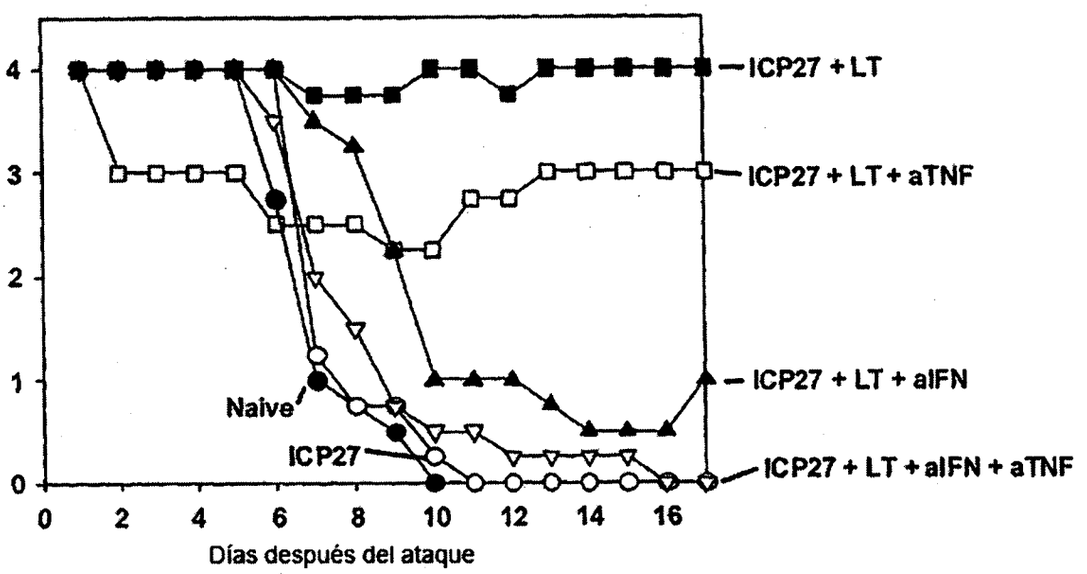

4
3
2
1
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Días después del ataque
ICP27 + LT
ICP27 + LT + aTNF
ICP27 + LT + aIFN
ICP27 + LT + aIFN + aTNF
Naive
ICP27

Figura 32

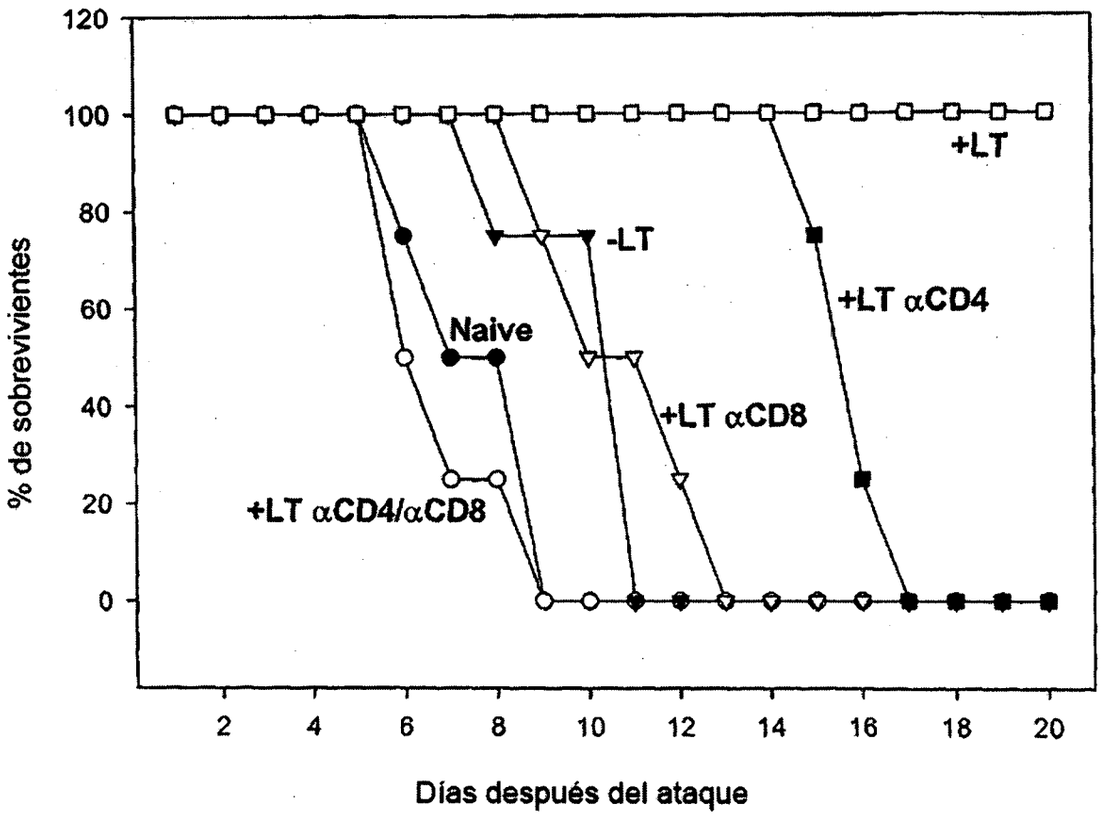

120
100
80
60
40
20
0
% de sobrevivientes
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Días después del ataque
+LT
-LT
+LT αCD4
Naive
+LT αCD8
+LT αCD4/αCD8

Figura 33

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/000344

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/245 A61K39/145 A61K39/39 A61K9/16 C12N15/85
C12N15/44 C12N15/38 C12N15/31 C12N15/36

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)
C07K C12N

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, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/36792 A (GLAXO GROUP LIMITED; CATCHPOLE, IAN, RICHARD; ELLIS, JONATHAN, HENRY;) 10 May 2002 (2002-05-10)	21, 42-45, 101
Y	page 4, lines 3-10	1-20, 22-41, 46-48, 55-63, 83-95, 102-114
	page 7, lines 23,24	

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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	Date of mailing of the international search report
17 July 2006	27/07/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31–70) 340–2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31–70) 340–3016	Brouns, G

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 02/31137 A (CHIRON CORPORATION; THUDIUM, KENT; SELBY, MARK; ULMER, JEFFREY) 18 April 2002 (2002-04-18) example 2	21, 42-45, 101 1-20, 22-41, 46-48, 55-63, 83-95, 102-114
Y	ROY M J ET AL: "Induction of antigen-specific CD8+ T cells, T helper cells, and protective levels of antibody in humans by particle-mediated administration of a hepatitis B virus DNA vaccine" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 19, no. 7-8, 22 November 2000 (2000-11-22), pages 764-778, XP004225394 ISSN: 0264-410X figure 1	1-20, 22-41, 49-54, 60,63, 67-95, 102-114
Y	DONNELLY J J ET AL: "PRECLINICAL EFFICACY OF A PROTOTYPE DNA VACCINE: ENHANCED PROTECTION AGAINST ANTIGENIC DRIFT IN INFLUENZA VIRUS" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 1, no. 6, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 583-587, XP000508527 ISSN: 1078-8956 figure 1	1-20, 22-41, 46-48, 55-63, 67-73, 80-95, 102-114
Y	HAENSLER J ET AL: "Intradermal DNA immunization by using jet-injectors in mice and monkeys" VACCINE, BUTTERWORTH SCIENTIFIC. GUILDFORD, GB, vol. 17, no. 7-8, 26 February 1999 (1999-02-26), pages 628-638, XP004154800 ISSN: 0264-410X page 629, paragraph 1 table 1 figures 2-6	1-20, 22-41, 46-48, 55-63, 67-73, 80-95, 102-114

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2006/000344

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ARRINGTON JOSHUA ET AL: "Plasmid vectors encoding cholera toxin or the heat-labile enterotoxin from Escherichia coli are strong adjuvants for DNA vaccines" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 76, no. 9, May 2002 (2002-05), pages 4536-4546, XP002379962 ISSN: 0022-538X figures 1,4-6	11-20, 32-41, 49-60, 74-85, 87-89,95
P,X	WO 2005/035779 A (POWDERJECT VACCINES, INC; BRAUN, RALPH, PATRICK; DONG, LICHUN) 21 April 2005 (2005-04-21) figures 8,10 examples 1,5,7	1,5,6, 18-22, 26,27, 38-43, 45, 49-63, 65-68, 70, 74-89, 96-108, 111-114
P,X	WO 2005/035771 A (POWDERJECT VACCINES, INC; FULLER, JAMES; POWDERMED LIMITED) 21 April 2005 (2005-04-21) the whole document	42,44, 45, 49-61, 67,69, 70, 74-86, 89,101, 107,108, 111-114
A	WO 03/011334 A (GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A; GLAXO GROUP LIMITED; ERTL, PETER, FRA) 13 February 2003 (2003-02-13) example 15	1-20, 22-41, 60,63, 67-73, 80-95, 102-114
A	MONTGOMERY D L ET AL: "HETEROLOGOUS AND HOMOLOGOUS PROTECTION AGAINST INFLUENZA A BY DNA VACCINATION: OPTIMIZATION OF DNA VECTORS" DNA AND CELL BIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 9, 1 November 1993 (1993-11-01), pages 777-783, XP000565708 ISSN: 1044-5498 figure 1	1-20, 22-41, 46-48, 55-63, 67-73, 80-95, 102-114

-/--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GARMORY HS ET AL.: "DNA vaccines: improving expression of antigens" GENETIC VACCINES AND THERAPY, [Online] vol. 1, no. 2, 16 September 2003 (2003-09-16), pages 1-5, XP002379963 Retrieved from the Internet: URL:http://www.gvt-journal.com/content/1/1/2> [retrieved on 2006-05-04]	1-48
A	BARDIYA N ET AL: "Influenza vaccines: recent advances in production technologies" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 67, no. 3, 20 January 2005 (2005-01-20), pages 299-305, XP002379964 ISSN: 0175-7598 page 303, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1	1-48
A	WO 03/004055 A (POWDERJECT VACCINES, INC) 16 January 2003 (2003-01-16) cited in the application	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2006/000344

490

Box 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 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2006 /000344

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

Invention 1: claims 1-48, 61-64, 67-73, 86, 91-94, 109, 110 (all complete); claims 55-60, 80-85, 87-90, 95, 101-108, 111-114 (all partially)

A nucleic acid construct encoding an influenza antigen comprising a chimeric promoter sequence (i) which comprises: (a) a hCMV immediate early promoter sequence; (b) exon 1 and at least a part of exon 2 of the hCMV major immediate early gene; and (c) a heterologous intron provided in place of the intron A region of the hCMV major immediate early gene, or a nucleic acid encoding an influenza antigen comprising (ii) a non-translated leader sequence derived from HBV preS2 antigen sequence, HBV e-antigen sequence or HSV type 2 gD antigen sequence and (iii) an enhancer sequence 3' of and operably linked to the coding sequence; wherein the enhancer sequence (iii) is derived from a 3'UTR of an HBsAg sequence or a 3'UTR of a simian CMV immediate early gene sequence, or a nucleic acid encoding an influenza antigen comprising a combination of (i), (ii) and (iii).

Invention 2: claims 49-54, 65, 66, 74-79, 96-100 (complete); 55-60, 80-85, 87-90, 95, 101-108, 111-114 (all partially)

A nucleic acid construct encoding an ADP ribosylating bacterial toxin subunit comprising a chimeric promoter (i) or a non-translated leader (ii) and enhancer sequence (iii) as defined for invention 1, optionally combined with a nucleic acid encoding an HSV antigen; a nucleic acid encoding an ADP ribosylating bacterial toxin subunit combined with a nucleic acid encoding an HSV antigen comprising a chimeric promoter (i) or a non-translated leader (ii) and enhancer sequence (iii) as defined for invention 1.

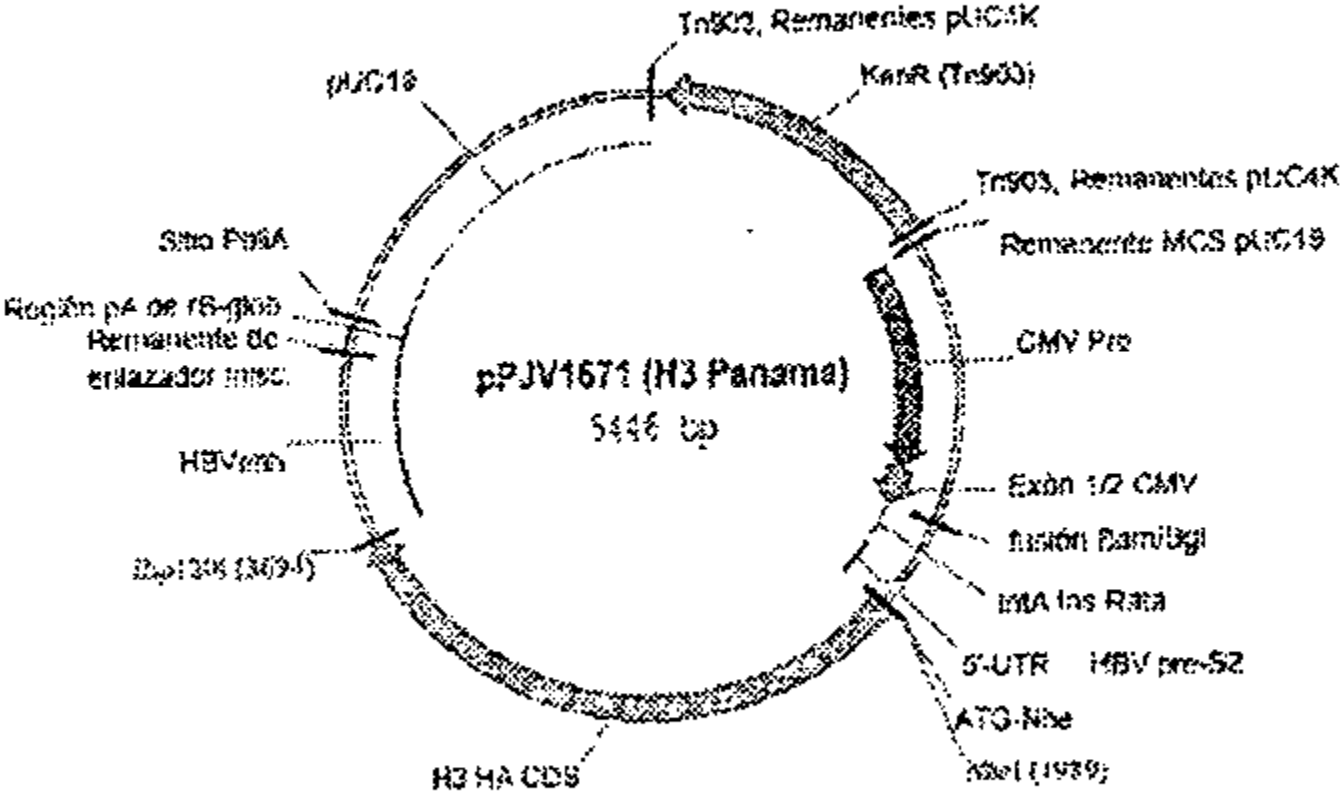
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

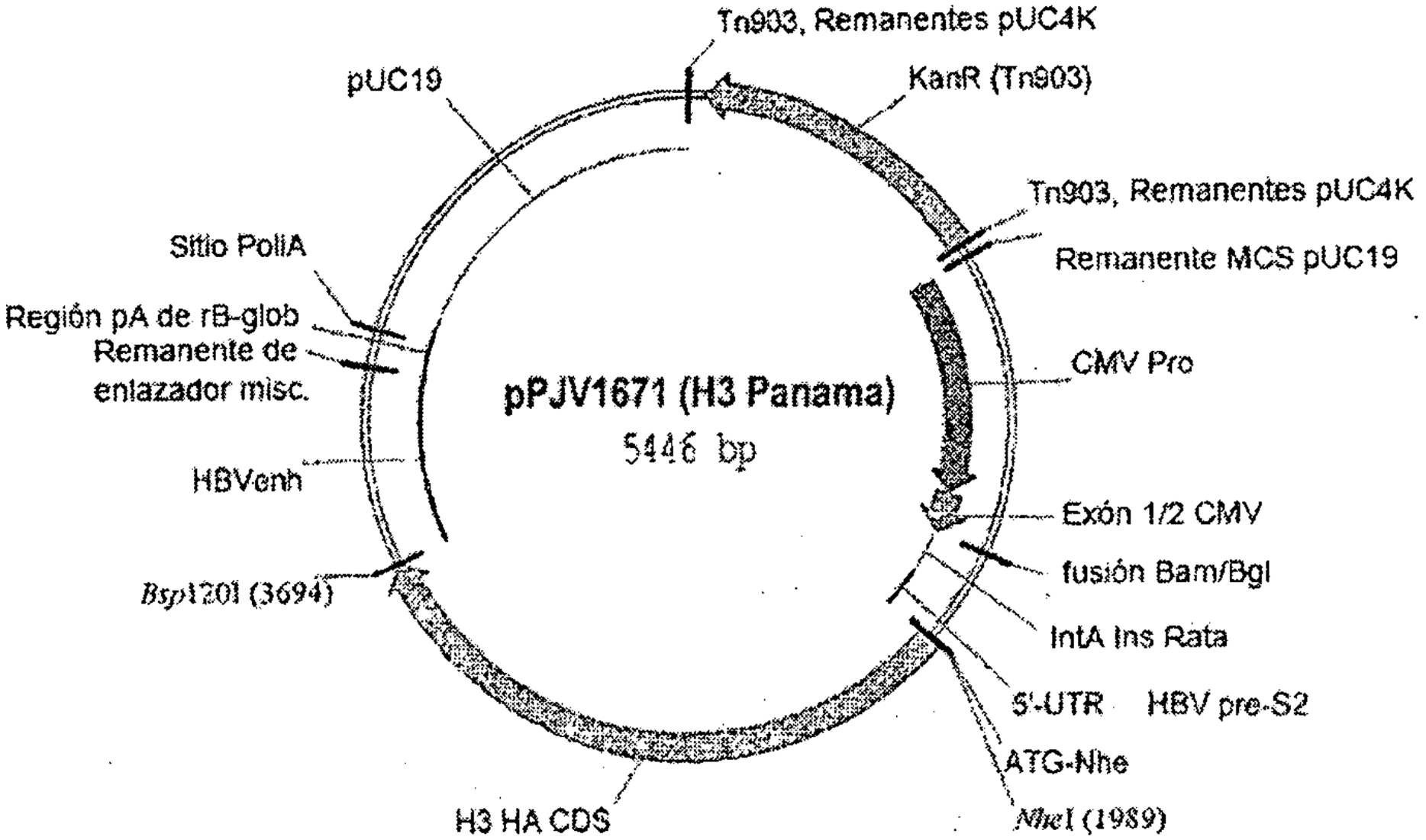
Information on patent family members

International application No
PCT/GB2006/000344

492

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0236792 A	10-05-2002	AU 1250502 A	15-05-2002
		CA 2427952 A1	10-05-2002
		EP 1334201 A2	13-08-2003
		JP 2004512837 T	30-04-2004
		US 2004082531 A1	29-04-2004
WO 0231137 A	18-04-2002	AT 323166 T	15-04-2006
		AU 1171002 A	22-04-2002
		CA 2425852 A1	18-04-2002
		CN 1469930 A	21-01-2004
		EP 1373524 A2	02-01-2004
		JP 2004511229 T	15-04-2004
		ZA 200302667 A	05-07-2004
WO 2005035779 A	21-04-2005	AU 2004280630 A1	21-04-2005
		CA 2542295 A1	21-04-2005
		EP 1675596 A2	05-07-2006
WO 2005035771 A	21-04-2005	AU 2004279991 A1	21-04-2005
		CA 2542288 A1	21-04-2005
WO 03011334 A	13-02-2003	CA 2455329 A1	13-02-2003
		EP 1411979 A1	28-04-2004
		JP 2005507377 T	17-03-2005
		US 2005058657 A1	17-03-2005
WO 03004055 A	16-01-2003	BR 0115646 A	13-12-2005
		CA 2429708 A1	16-01-2003
		CN 1537013 A	13-10-2004
		EP 1379273 A2	14-01-2004
		JP 2004536107 T	02-12-2004
		MX PA03004638 A	20-04-2004
		NZ 526175 A	27-01-2006


pPJV1671 (H3 Panama)
5446 bp
Tn903, Remanentes pUC4K
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
Remanente MCS pUC19
CMV Pro
Exón 1/2 CMV
Intrón RamUgi
IRES los Rata
5'-UTR HBV pre-S2
ATG-Nse
XbaI (1939)
H3 HA CDS
Bgl II (3059)
HBVpA
Remanente de enlazador linker
Región pA de rB-globin
Sitio PstA
pUC19


Tn903, Remanentes pUC4K
pUC19
KanR (Tn903)
Tn903, Remanentes pUC4K
Remanente MCS pUC19
Sitio PolIA
Región pA de rB-glob
Remanente de
enlazador misc.
CMV Pro
pPJV1671 (H3 Panama)
5446 bp
HBVenh
Exón 1/2 CMV
fusión Bam/Bgl
Bsp1201 (3694)
IntA Ins Rata
5'-UTR
HBV pre-S2
ATG-Nhe
H3 HA CDS
NheI (1989)

495

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-088653- -00000-0000

Fecha: 2007-08-29 16:39:05 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 495

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 63,295
FECHA : AGOSTO 6 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	63769916	06/08/2007	38,120,000.00

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

NT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL : $	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

Cdo 16051-841-001-6

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-088653- -00000-0000

Fecha: 2007-08-29 16:39:05 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 495

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION [X] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]
- Descripción de la invención [X]
- Dibujos de ser estos pertinentes [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]

COMPLETA [X] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de 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 [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia