Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

P- 2022/15228

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: Expediente No. **NC2022/0008493**
Solicitud de patente a nombre de **JANSSEN BIOTECH INC.**

Yo, CAROLINA DAZA MONTALVO identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, obrando como apoderada de la sociedad JANSSEN BIOTECH INC, domiciliado en Pensilvania, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de referencia, en respuesta al oficio Nº **13768** notificado electrónicamente el 25 de agosto de 2025, relativo a los requisitos sustantivos de la solicitud, respetuosamente me permito presentar la siguiente información:

1. Modificación a la solicitud

Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto a este memorial las siguientes modificaciones:

1.1. <u>Modificación en el capítulo reivindicatorio</u>
Se presenta adjunto a este memorial un nuevo capítulo reivindicatorio que consta de catorce (14) reivindicaciones, el cual reemplaza completamente el documento presentado el 4 de enero de 2023. Específicamente, se realizaron las siguientes modificaciones:

1.1 Se modificó la reivindicación 1 con el fin de:
- 1.1.1 Reemplazar el término "*dos o más*" por "*las*".
- 1.1.2 Eliminar la expresión "*combinaciones de estas*" y enfatizar en la redacción que el polipéptido comprende todas las secuencias de epítopos.

1.2 Se eliminaron las reivindicaciones 2, 3 y 10. Además se ajustó la numeración del documento.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

1.3 Se modificó la antigua reivindicación 6 (nueva reivindicación 4), con el fin de reemplazar el término "*o*" por "*y*".

1.4 Se modificó la antigua reivindicación 7 (nueva reivindicación 5), con el fin de:

1.4.1 Eliminar la referencia a las secuencias SEQ ID NO: 3, 7 y 9.

1.4.2 Reemplazar "*una*" por "*la*".

1.5 Se modificó la antigua reivindicación 8 (nueva reivindicación 6) con el fin de aclarar que la SEQ ID NO:31 es una secuencia de aminoácidos. Dicha modificación se sustenta en las páginas 35, 37, 57, 61, 70 así como en el listado de secuencias.

1.6 Se modificó las antiguas reivindicaciones 9 y 15 (nuevas reivindicaciones 7 y 12) con el fin de incluir las secuencias de ácidos nucleicos de la antigua reivindicación 10.

1.7 Se modificó la antigua reivindicación 13 (nueva reivindicación 10) con el fin de:

1.7.1 Aclarar que el vector de adenovirus es un vector de vaccinia modificado de Ankara (MVA). Dicha modificación se sustenta en las páginas 46, 62 y ejemplo 8 de la descripción.

1.7.2 Eliminar las modalidades del vector alfavirus, poxvirus, adeno, retrovirus.

1.7.3 Aclarar que la molécula de ARN autorreplicante deriva de encefalitis equina de Venezuela (VEEV). Dicha modificación se sustenta en las páginas 70 a 72, 81, 92 y ejemplo 11 de la descripción.

Estas modificaciones no amplían de ninguna manera la materia objeto de la presente solicitud, ya que se encuentran sustentadas tanto en la descripción como en el listado de secuencias, y se realizan con el fin de definir la materia reclamada de forma clara y superar las objeciones planteadas por el examinador en su concepto técnico.

1.2. <u>Modificación al Listado de secuencias</u>

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Así mismo, se presenta junto a este memorial un listado de secuencias modificado que reemplaza el documento presentado el 4 de enero de 2023.

Puntualmente se realizó una corrección tipográfica en la secuencia SEQ ID NO: 27, en la cual se incluyó el nucleótido (G) faltante en la terminal 3'.

Cabe resaltar que la presente modificación no amplia el alcance de la invención teniendo en cuenta que es necesario la inclusión de dicho nucleótido para que la secuencia quede completa. Esto teniendo en cuenta que según los conocimientos de una persona versada en la materia se esperaría que la longitud de un polinucleótido que codifica un polipéptido sea igualmente divisible por 3 porque cada aminoácido está codificado por un codón que contiene tres nucleótidos. En ese sentido la SEQ ID NO: 27, que codifica un "*transgen CALR_JAK2-2x9mer solo sin ADN de secuencia líder para expresión en MVA y Gad20*", tiene una longitud de 284 nucleótidos y no puede dividirse por igual entre 3. El siguiente número que se divide a partes iguales entre 3 es 285, lo que indica que la SEQ ID NO: 27 carece de un nucleótido.

Adicionalmente, dicha secuencia SEQ ID NO: 27 codifica un "transgén CALR_JAK2-2x9mer solo sin ADN de secuencia líder para expresión en MVA y Gad20." (Véase descripción, en la tabla 242). El JAK2-2x9mer, que forma parte del transgén codificado por la SEQ ID NO: 27, tiene la secuencia de aminoácidos de LNYGVCFCAAYFCGDENILV (véase SEQ ID NO: 7 y página 17 de la descripción). Pero, como se muestra en la comparación de secuencias a continuación, la secuencia de aminoácidos codificada por el SEQ ID NO: 27 carece del C-terminal V que está presente en la secuencia de aminoácidos JAK2-2x9mer del SEQ ID NO: 7. Los residuos subrayados muestran la superposición relevante:

Polipéptido codificado por SEQ ID NO: 27

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQG
WTEAAYEEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENIL

SEQ ID NO: 7 LNYGVCFCAAYFCGDENILV

En ese sentido, es posible confirmar que el nucleótido faltante es Guanina (G). Esto teniendo en cuenta que cada una de las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido CALR_JAK2-2x9mer terminan en CTGGTG excepto la SEQ ID NO: 27 (véase por ejemplo las SEQ ID NOs: 17, 19 y 21). Así, una persona versada en la materia

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

esperaría que la SEQ ID NO: 27 igualmente termine en GTG y, por lo tanto, que le falte un nucleótido G.

Asimismo, la solicitud indica que los polinucleótidos que codifican el polipéptido CALR_JAK2-2x9mer están optimizados para la expresión en adenovirus (véase la descripción página 178). Por consiguiente, aunque existen múltiples codones que codifican la valina, se esperaría que el codón optimizado para valina en una construcción determinada sea el mismo. De hecho, todos los residuos de valina en la SEQ ID NO: 27 están codificados por el codón GTG (véase la SEQ ID NO: 27 más adelante, con los codones y residuos de valina resaltados).

Además, GTG es el único codón que codifica los residuos de valina en el polipéptido CALR_JAK2-2x9mer de las SEQ ID NOs: 17, 19 y 21 (véase, por ejemplo, la SEQ ID NO: 19 más adelante, con los codones y residuos de valina resaltados). Por lo tanto, se esperaría que todas las valinas en el polipéptido CALR_JAK2-2x9mer estén codificadas por GTG, lo que incluye la valina terminal de la SEQ ID NO: 27.

SEQ ID NO: 27

atgaaggacaaacaagacgaagaacaacgaactaggcggatgatgaggactaagatgaggatgcggagga
tgagacggacgcgacgcaagatgcgccggaaaatgtctcccgcccggccaaggacgtcttgtcgggaagcct
gtttgcagggctggaccgaagcagcttacgaagaagcagaagacaattgtcggcgaatgatgagaacgaag
gctgcttacgtgcttaactatggagtgtgcttctgcgctgcctatttctgcggagatgagaacattctggt

Polypeptide encoded by SEQ ID NO: 27

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAY
EEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENIL

SEQ ID NO: 19

atgaaggacaagcaggatgaggagcagcggacccggagaatgatgaggacaaagatgcgcatgaggcgca
tgcggagaacaaggcgcaagatgcggagaaagatgtctccagcaaggcctagaaccagctgcagggaggca
tgtctgcagggatggacagaggcagcatacgaggaggcagaggacaactgcaggcgcatgatgaggaccaa
ggccgcctacgtgctgaattatggcgtgtgcttctgtgccgcctatttttgtggcgatgagaacatcctggtg

Polypeptide encoded by SEQ ID NO: 19

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAY
EEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

En ese sentido y por las razones ya mencionadas se entiende que la modificación en la terminal de la SEQ ID NO: 27 corresponde a corrección de un error tipográfico que se alinea con las estructuras divulgadas en la descripción y que es coherente de conformidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 7 a la que codifica.

1.3. Modificación a la descripción

Por último, se presenta junto con este memorial la Descripción modificada, la cual sustituye el documento presentado el pasado 4 de enero de 2023.

En particular, se ha modificado la tabla de secuencias en la página 242, conforme a la corrección tipográfica de la SEQ ID NO: 27 en el listado de secuencias, aplicando el mismo fundamento para dicha corrección.

2. Pago de tasas

Considerando que el presente memorial se presenta junto con modificaciones a las reivindicaciones, se adjunta recibo por concepto de pago de tasa de modificación a la solicitud, según lo establecido en la **Resolución 59669 de 2020.**

Ahora, en relación con el número de reivindicaciones, atentamente me permito resaltar que junto a la presente respuesta no se realiza el pago de la tasa por concepto de reivindicaciones adicionales, dado que el nuevo capítulo reivindicatorio cuenta con un menor número de cláusulas que el presentado y estudiado anteriormente por su despacho.

3. No es una invención

Objeción del examinador:

En virtud de lo establecido en el literal b) del artículo 15 de la Decisión 486 de 2000, que excluye como invenciones el material biológico existente en la naturaleza, el Examinador considera que las reivindicaciones 1 a 8 no constituyen invención, pues se refieren a un polipéptido que incluye secuencias de epítopos (SEQ ID NO: 1, 2, 5 y 6) asociadas con calreticulina (CALR) y cinasa Janus 2 (JAK2) de origen natural. Por tanto, corresponden a material biológico existente en la naturaleza.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

De igual manera, el examinador objeta las reivindicaciones 9 a 11 tampoco se consideran invención, ya que describen polinucleótidos que codifican los polipéptidos anteriores, igualmente derivados de CALR y JAK2, lo que confirma su carácter natural.

En consecuencia, el Examinador concluye que las reivindicaciones analizadas no cumplen con los requisitos para ser consideradas invenciones conforme a la normativa aplicable.

Argumentos del solicitante:

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, con el fin de superar la objeción, se ha modificado la reivindicación 1 para caracterizar el polipéptido como aquel que comprende todas las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 5 y 6. De manera similar, se incluyeron las secuencias de nucleótidos en la antigua reivindicación 9 (ahora reivindicación 7), donde se reclama el polinucleótido, así como las secuencias de la antigua reivindicación 10, todas ellas correspondientes a secuencias artificiales.

Es importante destacar que el Examinador reconoció que solo algunas secuencias son de origen natural; por lo tanto, al incorporar todas las secuencias relacionadas, resulta evidente que el polipéptido reclamado puede considerarse una invención, dado que no existe en la naturaleza una estructura que contenga de manera natural todas las secuencias de epítopos aquí reivindicadas. Dichos polipéptidos integran cuatro secuencias de neoantígenos distintas, provenientes de diferentes genes, en una sola molécula. Estas modificaciones delimitan el alcance de las reivindicaciones dependientes, por lo que la materia reclamada en las antiguas reivindicaciones 1 a 8 y 9 a 11 (ahora 1 a 8) puede ser considerada invención. En consecuencia, se solicita respetuosamente al Examinador evaluar dichas modificaciones en el examen correspondiente.

4. Claridad y concisión de las reivindicaciones

El solicitante manifiesta que mediante la presentación del nuevo capítulo reivindicatorio quedan subsanadas la totalidad de las objeciones presentadas por el examinador en su concepto técnico, de modo tal que las nuevas reivindicaciones reclaman de manera clara y concisa la invención descrita. Con respecto a las objeciones específicas del examinador, me permito manifestar lo siguiente:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

4.1 El Examinador considera que las reivindicaciones 12, 16 y 17 son poco claras y carecen de soporte en la descripción, ya que mencionan un vector que comprende un polinucleótido que "*codifica el polipéptido de cualquiera (...)*" sin incluir SEQ ID NO específicos. Para garantizar claridad y respaldo, el Examinador recomienda que las reivindicaciones se ajusten para incluir dichas secuencias concretas de los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la invención.

En este sentido el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, con el fin de contribuir a dar continuidad al proceso el solicitante ha decidido modificar la antigua reivindicación 9 y 15 (nueva reivindicación 7 y 12 respectivamente) con el fin de incorporar las secuencias de nucleótidos de la antigua reivindicación 10.

En ese sentido, las reivindicaciones 12, 16 y 17 (renumeradas como reivindicaciones 9, 13 y 15) dependen de la reivindicación 9 y 15 y por ende incluyen en su alcance la caracterización estructural del vector de conformidad con la sugerencia del examinador. En ese sentido amablemente se solicita considerar superada la presente objeción.

4.2. El Examinador considera que las reivindicaciones 13 a 15 carecen de respaldo suficiente en la descripción, ya que mencionan diversas opciones de vectores virales, mientras que la solicitud solo evidencia vectores adenovirales (hAd26, hAd5, GAd20) y un vector MVA. Además, la referencia a "combinaciones de ellos" no está sustentada por información específica. Por ello, el Examinador sugiere ajustar las reivindicaciones para que se alineen con las modalidades divulgadas.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de contribuir a dar continuidad al proceso el solicitante ha decidido modificar las reivindicaciones 13 y 15 (renumeradas como 10 y 12) como se indica en la sección 1.1. de este memorial para especificar el vector adenovirus, el vector modificado de la vaccinia ankara (MVA) y/o la molécula de ARN autorreplicante derivada del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV). En ese sentido es importante resaltar que más allá del sustento para dicha modificación en la sección 1.1. de este memorial, el examinador reconoce que el vector adenovirus y el vector MVA están soportados, y además reconoce que la solicitud presenta evidencia técnica concreta y explícita para una molécula de ARN autorreplicante derivada de VEEV que comprende el SEQ ID NO: 33 como lo señala en la sección 5.2 del Oficio 13768 en la página 3. En ese sentido, amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

4.3. La reivindicación 13 es objetada por carecer de claridad por el examinador porque se refiere tanto a "*un adenovirus" como a "un vector viral adeno-asociado*" sin distinguirlos. Además, la reivindicación menciona "*una molécula de ARN autorreplicante*" sin una definición concreta basada en sus elementos estructurales. El examinador recomienda revisar la reivindicación para proporcionar definiciones precisas y detalles estructurales.

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, únicamente con el fin de contribuir a dar continuidad al proceso el solicitante ha decidido atender a la sugerencia del examinador, restringiendo el grupo de vectores únicamente a un vector de adenovirus, un vector de vaccinia modificado de Ankara (MVA) o una molécula de ARN autorreplicante derivado del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV). Cabe resaltar que con dichas modificaciones además se dio una definición concreta asociada a la molecular e ARN autorreplicante con el fin de aclarar que deriva de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV). De ese modo, amablemente se solicita dar por superada la presente objeción.

4.4. El examinador también objeta la reivindicación 17 por carecer de claridad, ya que afirma una composición farmacéutica que comprende el polipéptido, polinucleótido o vector. Sin embargo, la solicitud no aporta evidencia de composiciones farmacéuticas como productos de la invención. El examinador aconseja restringir razonablemente el tema reclamado para que se alinee con lo que realmente se revela en la solicitud.

En este sentido el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador.

Sin embargo, desea enfatizar que dadas las modificaciones introducidas en las reivindicaciones independientes estas además restringen estructuralmente el alcance de la composición farmacéutica de la antigua reivindicación 17 (nueva reivindicación 14). En ese sentido es importante resaltar que dicha modificación permite relacionar directamente estas composiciones con el polipéptido, polinucleótido y vector de reivindicaciones anteriores como ingrediente activo siendo esto una razonable generalización de la materia la cual es permitida de conformidad con lo establecido en la guía de examen de patentabilidad (2023):

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

"Las reivindicaciones son usualmente generalizaciones del contenido divulgado en la descripción. La generalización no puede ir más allá del alcance del contenido divulgado en la descripción. Una generalización es permitida siempre y cuando cubra todas las variantes o modos específicos divulgados en la descripción. Para determinar si la generalización es apropiada, se debe basar en el estado de la técnica."

Además, es importante resaltar que las composiciones farmacéuticas están claramente relacionadas con la invención y deben reconocerse como tales. Específicamente, las modalidades 22 a 25, junto con la sección dedicada a composiciones que se encuentra en las páginas 105 a 107, proporcionan un apoyo detallado para estos aspectos de la invención.

Por último, es importante resaltar que la guía de examen de patentabilidad 2023 establece en la sección de Suficiencia que esta debe ser interpretada en que la descripción incluya en su divulgación los detalles suficientes para ser interpretados por la persona versada en la materia, pero no se trata de limitarse únicamente a los ejemplos:
"La descripción debe contener la suficiente información técnica para que la persona medianamente versada en la materia pueda poner en práctica (o reproducir) la invención (…) a presentación de ejemplos relativos a todas las especies particulares de la invención o a cada alternativa reivindicada no será condición necesaria para la suficiencia, siempre y cuando dichas especies se mencionen en la descripción."

En ese sentido recalcamos lo establecido en el art 51 de la decisión 486 donde el alcance de las reivindicaciones debe evaluarse basado en todos los documentos de la solicitud: *"El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción, los dibujos y en su caso, el listado de secuencias o el depósito de material biológico servirán para interpretarlas".* Por ende, tanto la evidencia en cuando a las modalidades y la divulgación en la descripción es materia suficiente para sustentar las composiciones farmacéuticas de esta invención.

En vista de lo anterior, las objeciones relacionadas con la claridad, la concisión y el soporte en la descripción del capítulo reivindicatorio, han quedado completamente superadas.

5. Descripción

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

El examinador indica que la descripción no divulga la materia reclamada de manera suficiente para que una persona normalmente versada en la materia pueda ejecutarla o reproducirla, por lo que no cumpliría con las disposiciones del Art. 28 de la Decisión Andina 486.

Objeción del examinador:

En este sentido, el examinador afirma que la descripción no proporciona suficiente soporte para ningún vector o composición farmacéutica que comprenda un polinucleótido que codifique el polipéptido definido por epítopos seleccionados del SEQ ID NO 2, 5, 6, o combinaciones de estos. En concreto, el examinador señala que la descripción no admite todas las posibles configuraciones vectoriales derivadas de esta definición y no describe adecuadamente las composiciones farmacéuticas que comprenden secuencias polinucleótidicas que codifican dos o más de los epítopos mencionados, y mucho menos ninguna combinación de las secuencias listadas. Como resultado, el examinador solo reconoce el respaldo y la evidencia técnica concreta para lo siguiente:

(i) vectores adenovirus Ad26 en los que los vectores explorados llamados Ad26HEME001 y Ad26HEME002 presentan el polinucleótido de SEQ ID NO: 23 o 24 (pp. 181-209, Éx. 3 a 10, 12,),

(ii) vector de ARN autorreplicante derivado de VEEV que presenta el polinucleótido de SEQ ID N.º: 33 (p. 199, Ex. 11-14)

Argumentos del solicitante:

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del Examinador. No obstante, las restricciones introducidas en la caracterización estructural del polipéptido, polinucleótido, vectores y composiciones se ajustan no solo a una generalización razonable, sino también a los vectores reconocidos por el Examinador en la sección 5.2 del Oficio.

Asimismo, el solicitante desea enfatizar que las reivindicaciones representan una generalización razonable del contenido divulgado. Dicha generalización debe evaluarse considerando el conjunto completo de detalles proporcionados en la descripción y el conocimiento que una persona versada en la materia aplicaría conforme al estado del arte.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

De esta manera, la materia divulgada en la descripción ahora se relaciona de una manera más cercana con la materia definida en el capítulo reivindicatorio. Por lo tanto, la descripción proporciona toda la información necesaria para llevar a cabo la invención y cumple con los requisitos legales establecidos en la Decisión Andina 486.

6. Unidad de Invención

Objeción del examinador:

El examinador manifiesta que la solicitud no cumpliría con el requisito de unidad de invención, pues el elemento común a las distintas invenciones reclamadas, proporcionar una vacuna para el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas, habría sido anticipado por el documento WO2017211371.

En este sentido, el examinador señala las características de los 5 grupos inventivos que según él o ella se están reclamando y aclara que el examen se realizará solo para el primero. Estos grupos se relacionan con los vectores que componen el polinucleótido a partir de los SEQ ID NOs: 16, 17, 19, 26 y 27 respectivamente.

Argumentos del solicitante:
En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador. Sin embargo, desea enfatizar que los vectores mencionados contienen las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 17, 19, 26 y 27, todas diseñadas para expresar polipéptidos que comprenden las SEQ ID NO: 1, 2, 5 y 6. Estas secuencias codifican variantes polipeptídicas que comparten elementos estructurales esenciales y una misma función técnica, lo que demuestra que forman parte de una misma solución técnica a la necesidad de generar opciones terapéuticas para tratar neoplasias mieloproliferativas clásicas (NMP)y que además como se detalle en la siguiente sección de este memorial, tiene un efecto técnico superior relacionado a la respuesta inmune que genera.

De este modo, las reivindicaciones relativas a los polipéptidos, y a los vectores que los expresan, están claramente vinculadas por un único concepto inventivo, ya que se sustentan en un núcleo técnico común derivado de las secuencias antes señaladas y sus propiedades funcionales compartidas. Ninguno de los documentos del arte previo citados revela o sugiere esta combinación específica de secuencias ni la solución técnica que ellas permiten alcanzar.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Por lo tanto, la solicitud cumple con los requisitos de unidad de invención establecidos en el Artículo 25 de la Decisión 486. En virtud de lo anterior, se solicita respetuosamente que la objeción correspondiente sea retirada.

7. Nivel inventivo

El examinador ha indicado que las reivindicaciones 12 a 17 carecerían de nivel inventivo en vista de las enseñanzas del documento **D1** (WO2017211371) en combinación con **D2** (WO2007047653).

Con respecto a lo anterior, me permito resaltar las disposiciones del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, que establecen que "*se considerará que la invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica*".

Lo anterior significa que el análisis de nivel inventivo **NO** es una comparación de los objetos de las anterioridades y la solicitud en estudio. Por el contrario, el análisis de nivel inventivo **debe demostrar** la obviedad de la invención y establecer cómo ésta no contiene un salto cualitativo, que demuestre su altura inventiva, teniendo en cuenta que se hace **necesario demostrar** que la invención analizada carece de nivel inventivo y hubiese sido obvia para una persona versada en la materia.

Objeción del examinador:

El examinador considera el documento D1 como el estado de arte más cercano a la invención definida en la Reivindicación 12. Este documento revela un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de CALR o JAK2, o un fragmento inmunogénicamente activo de este (Página 88, Líneas [4–6]). Además, el examinador argumenta que este vector se utiliza para obtener una composición de vacuna para el tratamiento o profilaxis de un trastorno mieloproliferativo y describe una composición de vacuna que comprende un péptido inmunológicamente activo del exón mutante 9 de CALR, específicamente SEQ ID NOs: 1, 16 o 17 (Página 121, Reivindicación 1; Página 109, Ejemplo 2).

El examinador también presentó el análisis de alineación confirma que el SEQ ID NO: 1 de la presente solicitud abarca el 100% de identidad, con los residuos 1–32 del SEQ ID NO:1 de D1, 1–34 de SEQ ID NO: 16 de D1 y 1–43 de SEQ ID NO: 17 de D1.

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

Por lo tanto, el examinador reconoce que la única característica distintiva entre la invención reclamada y la divulgación en D1 es la inclusión específica del SEQ ID NO 16 en el vector.

Sin embargo, el examinador considera que no hay evidencia de que esta inclusión suponga un efecto técnico más allá del que ya logra el vector en D1, en el que la expresión de un antígeno inmunógeno CALR capaz de inducir una respuesta inmune ya se había anticipado en D1 (SEQ ID N.º: 17, Página 115, Ejemplo 3, Figuras 14–17).

Por tanto, el problema técnico objetivo puede formularse como cómo modificar el vector conocido de D1 para proporcionar un vector alternativo.

Por ello, el examinador presentó el documento D2, ya que proporciona metodologías para predecir péptidos inmunogénicos para el tratamiento de trastornos mieloproliferativos. Describe péptidos sintéticos, incluidos análogos de la mutante JAK2 V617F, que se unen específicamente a moléculas HLA clase I o II (Resumen). D2 revela, además:

- Predicción de secuencias de epítopos a partir de JAK2,
- Predicciones de unión a HLA-A0201 y HLA-A0302,
- Selección de péptidos con capacidad potencial de unión,
- Transducción in vitro e inmunización de células T,
- Evaluación de la inducción de células T CD8+ (páginas 19–22, ejemplos 1–2, tablas 1–3).

Dado esto, el examinador considera que una persona versada en el tema estaría motivada a aplicar las metodologías de D2 para identificar secuencias de epítopos relacionadas con trastornos mieloproliferativos e incorporarlas en un vector como el revelado en D1, llegando así al objeto de la Reivindicación 12. Además, D1 ya revela una composición farmacéutica para tratar, reducir el riesgo y/o prevenir un trastorno asociado a la expresión de CALR, especialmente el CALR mutante del exón 9 o el mutante JAK2 (JAK2V617F). Esta composición incluye una formulación de vacuna (Página 84, Líneas [24–28]).

Por ello, el examinador concluye que la invención de las reivindicaciones 12 a 17 carece de paso inventivo.

Argumentos del solicitante:

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

En este sentido, el solicitante manifiesta respetuosamente su desacuerdo con la opinión del examinador.

Sin embargo, con el fin de dar continuidad al trámite, se ha modificado el capítulo reivindicatorio para requerir que el polipéptido incluya las secuencias SEQ ID NO: 1, 2, 5 y 6. Esta modificación no solo otorga características distintivas frente al documento D1, sino que también demuestra un efecto técnico superior.

El Examinador fundamenta su objeción en la secuencia SEQ ID NO: 17 del documento D1, que supuestamente induce una respuesta inmune. No obstante, las referencias citadas no enseñan ni sugieren la combinación específica reclamada ni la respuesta inmunitaria inesperadamente superior que esta genera. Los polipéptidos reivindicados requieren la combinación concreta de SEQ ID NO: 1, 2, 5 y 6 (correspondientes a los epítopos CALR 1, CALR 2, JAK2 1 y JAK2 2). Como se evidencia en la alineación de secuencias, el SEQ ID NO: 5 del solicitante termina en "FC" y el SEQ ID NO: 6 comienza con "FC", lo que produce dos regiones "FC" dentro de las secuencias JAK2, aportando una característica estructural única.

SEQ ID NO 5: VLNYGVC**FC**
SEQ ID NO 6: **FC**GDENILV

Esta combinación de SEQ ID NOs: 5 y 6 generó respuestas inmunitarias inesperadamente superiores en comparación con una secuencia única y mayor que contiene solo una "FC" en las posiciones de aminoácidos 617 y 618.

Por ejemplo, la Figura 5, que se reproduce a continuación para facilidad de consulta, muestra las respuestas inmunitarias generadas en ratones tras la inmunización con un polinucleótido Ad26HEME001 CALR/JAK2 que codifica un único JAK2 30-mer representado por el SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFGG). Este SEQ ID NO 4 no contiene el duplicado "FC" que incluye el aminoácido 617.

Por otra parte, La Figura 6, que se reproduce a continuación para facilidad de consulta, muestra las respuestas inmunitarias generadas en ratones tras la inmunización con un polinucleótido Ad26HEME002 CALR/JAK2 que codifica el epítopo 1 de JAK2 (SEQ ID NO: 5; VLNYGVCFC) y el epítopo 2 de JAK2 (SEQ ID NO: 6; FCGDENILV) y que tienen las dos regiones "FC". Como se muestra en estas figuras, la administración de un

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

polinucleótido que codifica tanto el epítopo JAK2 1 del SEQ ID NO 5 como el epítopo JAK2 del SEQ ID NO 6 resultó en una respuesta inmunitaria inesperadamente superior en ratones C57BL/6 en comparación con el polinucleótido CALR/JAK2 que codifica un único fragmento de 30 aminoácidos del péptido JAK2.

FIG. 5

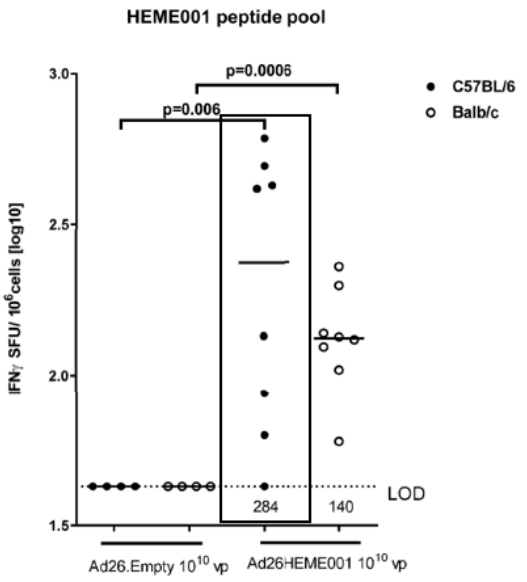
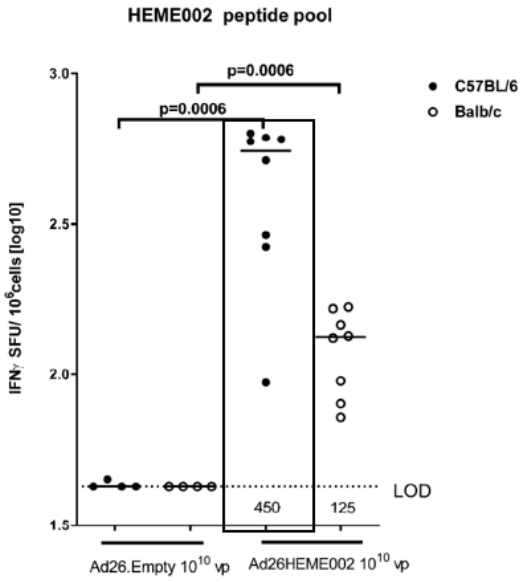


FIG. 6



Además, los datos posteriores a la presentación del solicitante indican que la posición del "FC" en el epítopo JAK2 tiene un efecto inesperado en la vinculación a HLA.

Específicamente, *la modelización in silico* de la afinidad de unión de JAKV617F 9mer a la proteína HLA predijo que las secuencias 9mer del epítopo 1 y del epitopo 2 de JAK2, que tienen "FC" en los extremos C y N, respectivamente, demostrarían una mayor unión a la proteína HLA en comparación con otros 9mers JAKV617F que tienen la "FC" en posiciones diferentes. Consulta la tabla a continuación:

	Núcleo	HLA-A0201 Afinidad de unión predicha en nM
	LVLNYGVCF	10658.7
SEQ ID NO: 5 (epítopo JAK2 1)	VLNYGVCFC	2388.1

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

	LNYGVCFCG	18305.5
	NYGVCFCGD	34777.7
	YGVCFCGDE	30177.5
	GVCFCGDEN	36126.2
	VCFCGDENI	11718
	CFCGDENIL	27418.6
SEQ ID NO: 6 (JAK2 epítopo 2)	FCGDENILV	694.8

Contrariamente a la afirmación del Examinador, el objeto reclamado sí presenta un efecto técnico frente al documento D1, por lo cual se solicita respetuosamente reconsiderar su opinión y dar por superada la presente objeción. Asimismo, ni D1 anticipa el efecto alcanzado ni D2 subsana las diferencias.

En relación con el documento D2, se observa que este únicamente ofrece una referencia general a la mutación JAK2 V617F y su relevancia en trastornos mieloproliferativos; sin embargo, no demuestra mejoras en la afinidad de unión dentro de un complejo, como se evidencia en la Tabla 5. Además, no todas las realizaciones del vector reivindicado, ni las composiciones derivadas que involucran nanopartículas, pueden derivarse de D1 o D2.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, queda claro que las características técnicas de la materia definida en el capítulo reivindicatorio presentado junto al presente memorial no se derivan de manera obvia o evidente de las enseñanzas de D1 y D2. Por lo tanto, el objeto reclamado cumple con el requisito de Nivel inventivo establecido en el Art. 18 de la Decisión 486.

8. Conclusión

Con las modificaciones introducidas y los argumentos presentados puede concluirse que:

i) El nuevo pliego reivindicatorio se ajusta a las disposiciones del Artículo 34 de la Decisión 486/00;

Clarke Modet

Carrera 11 No. 86-53, Piso 3
Edificio Segovia
110221 Bogotá, **Colombia**
T (+57) 1 618 10 88
F (+57) 1 635 08 24

ii) La invención de la presente solicitud es clara y cuenta con el debido sustento en el capítulo descriptivo, a la vez que se encuentra divulgada de manera suficientemente completa, cumpliendo así con los requerimientos de los Artículos 30 y 28 de la Decisión 486;

iii) La presente invención se relaciona con materia considerada una invención, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 15 de la Decisión 486;

iv) La presente invención se relaciona con un único concepto inventivo, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 25 de la Decisión 486;

v) La invención de la presente solicitud no resulta obvia ni se derivada de manera evidente del estado de la técnica, cumpliendo así con los requerimientos del Artículo 18 de la Decisión 486.

Por tanto, atentamente me permito solicitar a ese Despacho otorgar el privilegio de patente solicitado a la solicitud en estudio, toda vez que cumple a cabalidad con los requerimientos de la Decisión 486 de 2000.

Asimismo, respetuosamente solicito a ese Despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional.

9. Anexos

- Nuevo capítulo reivindicatorio conformado por catorce (14) reivindicaciones.
- Descripción modificada
- Listado de secuencias modificado
- Recibo de pago por concepto de modificaciones a la solicitud.

Señora Directora,



CAROLINA DAZA MONTALVO
C.C. 66.783.790 de Palmira Valle
TP-141563 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende las secuencias de epítopos:
MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1);
EEAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2);
VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5);y
FCGDENILV (SEQ ID NO: 6).

2. El polipéptido de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia líder de N-terminal que comprende:
MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 8);
MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDY NIQKESTLHLVLRLRGV (SEQ ID NO: 54); o
MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV (SEQ ID NO: 29).

3. El polipéptido de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde las secuencias de epítopos están conectadas entre sí mediante una secuencia enlazadora.

4. El polipéptido de la reivindicación 3, en donde la secuencia enlazadora se selecciona de AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, y REKR (SEQ ID NO: 59).

5. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende:

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10;
la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12; o
la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

6. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31.

7. Un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el polinucleótido comprende:

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17;
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19;
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 26; o
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27.

8. El polinucleótido de la reivindicación 7, en donde el polinucleótido comprende:
la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO:26 o
la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27.

9. Un vector que comprende el polinucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.

10. El vector de la reivindicación 9, en donde el vector se selecciona de un vector de adenovirus, un vector de vaccinia modificado de Ankara (MVA) o una molécula de ARN autorreplicante derivado del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV).

11. El vector de la reivindicación 10, en donde el vector es un vector de MVA que comprende:

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17;
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19;
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 26; o
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27.

12. El vector de la reivindicación 10, en donde el vector es un GAd20 que comprende un polinucleótido comprende:

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17;
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19;
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 26; o
una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27.

13. El vector de la reivindicación 10, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante derivada de VEEV que comprende un polinucleótido que comprende la secuencia de ácidos nucleicos de la SEQ ID NO:33.

14. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, un polinucleótido de la reivindicación 7 u 8, o un vector de cualquiera de las reivindicaciones 9-13.

VACUNAS BASADAS EN CALR Y JAK2 MUTANTES Y SUS USOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de los EE. UU. núm. 62/936.841, presentada el 18 de noviembre de 2019, y la solicitud provisional núm. 62/936.846, presentada el 18 de noviembre de 2019, cuyas descripciones se incorporan cada una en la presente descripción como referencia en su totalidad.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se presenta electrónicamente en formato ASCII y que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad. La copia ASCII, creada el 30 de junio de 2022, se denomina 103693.002007_SL.txt y su tamaño es de 66,656 bytes.

CAMPO

Se proporcionan vacunas, polipéptidos y polinucleótidos basados en secuencias de calreticulina (CALR) y cinasa Janus 2 (JAK2) mutantes, vectores, células huésped, virus, y métodos para elaborarlos y usarlos.

ANTECEDENTES

Las neoplasias mieloproliferativas clásicas (NMP), también llamadas BCR-ABL-MPN, son las enfermedades más frecuentes entre los trastornos mieloproliferativos. Las NMP se caracterizan por la producción excesiva de células

sanguíneas diferenciadas terminalmente que son plenamente funcionales. Las NMP clásicas se han clasificado en tres entidades: la policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), y mielofibrosis primaria (PMF), que tienen complicaciones frecuentes relacionadas con la enfermedad, tales como trombosis venosa y arterial, hemorragias, y transformación a leucemia mieloide aguda (AML). Las entidades NMP se derivan de una sola célula madre hematopoyética mutada somáticamente (HSC) que se expande clonalmente y da lugar a prácticamente todas las células mieloides, y células B y NK. La expansión clonal de la NMP HSC va acompañada por hiperplasia de linaje único o múltiple.

La PV se caracteriza no solo por un exceso de eritrocitos y afectación predominante del linaje eritroide, sino que también se asocia con una hiperplasia variable de los linajes megacariocíticos / granulocíticos. La ET se caracteriza por un aumento en el recuento de plaquetas con una hiperplasia megacariocítica, considerando que la PMF es un trastorno más heterogéneo, definida por la presencia de fibrosis de la médula ósea (específicamente el exceso de fibras de colágeno) e hiperplasia megacariocítica. La mieloproliferación en PMF predomina inicialmente en la médula ósea y después se expande a sitios extramedulares, tales como el bazo. El diagnóstico es frecuentemente difícil cuando aparece la enfermedad, pero una revisión en 2016 de los criterios de diagnóstico de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para NMP está ayudando a definir la presentación molecular, clínica y sintomática de la NMP. Sin embargo, en muchos pacientes, se observa progresión de ET y PV a mielofibrosis (MF) secundaria. Además, los límites entre estos tres trastornos no pueden ser bien establecidos, especialmente entre ET y PMF. Por lo tanto, pueden surgir entidades de transición

que describen estados de enfermedad tales como PMF prefibrótica (o PMF temprana) que muestra un fenotipo de ET en el diagnóstico con histología típica de la médula ósea, pero con una alta probabilidad de progresión a MF y peor pronóstico que el resultado real de la ET.

Más del 50 % de los pacientes con MPN albergan la mutación JAK2V617F. Además, se encuentran mutaciones en el exón 9 del gen de calreticulina (CALR) en aproximadamente 60 % de pacientes con trombocitemia esencial (ET) de tipo silvestre de JAK2 o mielofibrosis primaria (PMF).

En 2005, se descubrió una mutación somática de G a T en el nucleótido 1849, en el exón 14 de JAK2. Esta mutación, resulta en la sustitución de valina a fenilalanina en el codón 617 (V617F) en el dominio de pseudoquinasa de JAK2. Esta mutación puede encontrarse en aproximadamente el 70 % de neoplasias mieloproliferativas (MPN): 95 % de la policitemia vera (PV) y 50 % a 60 % de ET y FPM. JAK2V617F experimenta frecuentemente una transición de heterocigosidad a homocigosidad debido a la ocurrencia de recombinación mitótica que resulta en la pérdida neutra de copias de heterocigosidad a lo largo de una región de tamaño variable en el brazo corto del cromosoma 9 (9pLOH). JAK2V617F surge en un progenitor hematopoyético multipotente, está presente en todos los linajes mieloides, y también puede detectarse en células linfoides, principalmente en células B y asesinas naturales (NK) y más raramente y posteriormente en la enfermedad de células T. JAK2V617F se restringe principalmente a las MPN clásicas con la excepción de la anemia refractaria con sideroblastos en anillo y trombocitosis (RARS T). Sin embargo, JAK2V617F se ha detectado en un nivel muy bajo (inferior al 1 %) en la población normal, incluso en un recién nacido. Es una de las mutaciones más

frecuentes encontradas en la hematopoyesis clonal asociada al envejecimiento (hematopoyesis clonal de potencial indeterminado). La presencia de mutaciones de JAK2V71F conduce a la activación constitutiva de la señalización del transductor de señal y activador de transcripción (STAT) que conduce a una mayor proliferación celular, activación y liberación autocrina/paracrina. Además, se ha identificado la mutación JAK2V617F en pacientes con indicios cardiovasculares.

En 2013, se identificaron mutaciones de marco de lectura en el exón 9 del gen CALR en pacientes con trombocitemia esencial (ET) y mielofibrosis primaria (PMF) que eran negativos para la mutación V617F en el gen JAK2 (JAK2V617F) y para mutaciones en el gen del receptor de trombopoyetina (MPL). Se identificaron más de 50 mutaciones de marco de lectura, con > 85 % que conduce a una cola C-terminal mutante de 44 aminoácidos idéntica. La mutación de la cola C-terminal elimina un motivo KDEL (SEQ ID NO: 55) que conduce a la pérdida de la retención del retículo endoplásmico (RE) y la translocación a la membrana de la superficie celular. Además, la versión mutante de CALR tiene una cola C-terminal de carga positiva que interrumpe la unión a Ca2+ y que limita la función canónica. Las dos mutaciones de CALR más frecuentes corresponden a una deleción de 52 bp (p.L367fs*46), también conocida como Tipo 1, y una inserción de 5 bp (p.K385fs*47), también conocida como Tipo 2. Existen grandes diferencias en la frecuencia entre las mutaciones de tipo 1 y Tipo 2 en ET y PMF: en ET, las mutaciones Tipo 1 y Tipo 2 están estrechamente distribuidas (55 % en comparación con 35 %), mientras que en PMF, el Tipo 1 son mayormente predominantes (75 % en comparación con 15 %). En conjunto, estos resultados indican que la CALR mutante es un impulsor oncogénico y que CALRmut induce la transformación a través de la vía de señalización MPL-JAK2-STAT.

Los pacientes con NMP tienen una alta carga de síntomas, complicaciones potencialmente mortales, y riesgo de progresión a leucemia aguda, mientras que también tienen opciones de tratamiento limitadas. Los tratamientos de pacientes con NMP se dividen mejor en las categorías de observación, terapias médicas y trasplante alogénico de células madre (allo-SCT). Las terapias médicas por sí mismas entran en las categorías de agentes citorreductores, inhibidores de la JAK de agente único e interferón (IFN)-α de agentes inmunomoduladores. El estándar actual de cuidado, y solamente aprobado terapéutico, específicamente para pacientes con MPN, es el inhibidor JAKAFI® (ruxolitinib) de la JAK1/2 de molécula pequeña. El JAKAFI®(ruxolitinib) fue el primer medicamento aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de los EE. UU. (FDA, por sus siglas en inglés) para la PMF de riesgo intermedio a alto y mielofibrosis pospolicitemia vera (PPV-MF, por sus siglas en inglés) y mielofibrosis de trombocitemia posesencial (PET-MF) pero también ha obtenido la aprobación tanto en la población de pacientes con la PV como con la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés) más recientemente. La eficacia se estableció en los estudios COMFORT-I y COMFORT-II y mostró una reducción significativa del tamaño del bazo como criterio de valoración principal. Sin embargo, la interrupción debido a la pérdida de respuesta, la progresión de la enfermedad y los eventos adversos relacionados con el tratamiento involucraron aproximadamente el 50 % de los pacientes a los 3 años y el 75 % a los 5 años. La terapia con JAKAFI® (ruxolitinib) también se ha asociado con un mayor riesgo de linfoma de linfocitos B agresivos en pacientes con MF. De hecho, en un estudio de 107 pacientes con MF que interrumpieron el tratamiento con JAKAFI® (ruxolitinib), la supervivencia global media fue de solo 14 meses. Aunque hay un subgrupo de

pacientes que pueden derivar un beneficio para la supervivencia con el uso de JAKAFI®(ruxolitinib), la mayoría de los pacientes con NMP continúan progresando en su enfermedad.

SUMARIO

La descripción proporciona un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos de los siguientes: epítopo de cinasa Janus 2 (JAK2) de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5. (VLNYGVCFC), epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 (KLSHKH LVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG), epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) y epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK).

La descripción también proporciona un polipéptido que comprende dos o más repeticiones de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el polipéptido comprende 2, 3, 4, 5, o más de 5 repeticiones de la SEQ ID NO: 6 separadas por una secuencia de enlazadores tal como AAY, RR o DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, o REKR (SEQ ID NO: 59).

La descripción también proporciona un polipéptido de la SEQ ID NO:28 (FCGDENILVAA YFCGDENILV) que comprende dos polipéptidos de la SEQ ID NO: 6 enlazados mediante la secuencia enlazadora no natural AAY.

La descripción también proporciona polinucleótidos que codifican polipéptidos descritos en la presente descripción y vectores que comprenden los polinucleótidos que codifican los polipéptidos descritos en la presente descripción.

La descripción también proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria y métodos para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F o exón 9 de CALR, o ambos mutante JAK2V617F y exón 9 de CALR, que comprende administrar a un sujeto que los necesita cualquiera de los polinucleótidos, polipéptidos o vectores descritos en la presente descripción.

La descripción también proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria y métodos para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F o exón 9 de CALR, o ambos JAK2V617F y exón 9 de CALR mutantes, en donde el método comprende una pluralidad de administraciones de cualquiera de las composiciones que comprenden polinucleótidos, polipéptidos o vectores descritos en la presente descripción.

La descripción también proporciona administrar un anticuerpo anti-CTLA-4, un anticuerpo anti-PD-1 o un anticuerpo anti-PD-L1 en combinación con cualquiera de las composiciones que comprenden polinucleótidos, polipéptidos o vectores descritos en la presente descripción.

La descripción también proporciona métodos para inducir una respuesta inmunitaria y métodos para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F o exón 9 de CALR, o ambos JAK2V617F y exón 9 de CALR mutantes, en donde el método comprende administrar dos o más veces a un sujeto que lo necesita un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), el

epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCRE ACLQGWTE) y epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK); en donde el vector es Ad26, Gad20, MVA o un ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, el método para inducir una respuesta inmunitaria y los métodos para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de JAK2V617F o exón 9 de CALR mutante, o ambos JAK2V617F y exón 9 de CALR mutante, comprende administrar dos o más veces a un sujeto que lo necesita un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende dos o más repeticiones de la SEQ ID NO: 6; en donde el vector es Ad26, Gad20, MVA o un ARN autorreplicante.

La descripción también proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad mieloproliferativa en un sujeto, en donde el método comprende administrar dos o más veces a un sujeto que lo necesita un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV), el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC), el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREAC LQGWTE) y epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK); en donde el vector es Ad26, Gad20, MVA o un ARN autorreplicante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra la respuesta de células T de donante de JAK2 V617F+ HLA A02:01+ MPN a epítopos 1 y 2 de mutJAK2 clase I.

La Figura 2 muestra la tinción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo para la respuesta de IFN-γ/TNF-α de células T CD4+ y CD8+. Las células dendríticas de donante normales se infectaron con vectores de adenovirus 26 que contenían un vector vacío o un polinucleótido que codifica LS_CALR.JAK2 2X9 mer de la SEQ ID NO: 10. Se añadieron células T CD4/CD8 autólogas a células dendríticas 24 horas después de la infección. Las células dendríticas y células T se cocultivaron durante 11 días y se reestimularon con un grupo de mutCALR específico de péptidos.

La Figura 3 muestra la tinción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo para la respuesta de IFN-γ/TNF-α de células T CD8+. Las células dendríticas de donante normales se infectaron con vectores de adenovirus 5 que contenían un vector vacío o un polinucleótido que codifica LS_CALR/JAK2 2X9 mer de la SEQ ID NO: 10. Se añadieron células T CD8 autólogas a células dendríticas 24 horas después de la infección. Las células dendríticas y las células T se cocultivaron durante 11 días y se reestimularon con péptidos 9 mer específicos para el epítopo 1 (SEQ ID NO: 5) o el epítopo 2 (SEQ ID NO: 6) de muJAK2.

La Figura 4 muestra la tinción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo para la respuesta de IFN-γ/TNF-α de células T CD8+. Las células dendríticas de donante normales se infectaron con vectores de adenovirus 5 que contenían un vector vacío o un polinucleótido que codifica LS_CALR.JAK2-30 mer (SEQ ID NO: 11). Se añadieron células T CD8 autólogas a células dendríticas 24 horas después de la infección. Las células dendríticas y las células T se cocultivaron durante 11 días y se reestimularon con un péptido 9 mer específico para el epítopo 1 (SEQ ID NO: 5) o el epítopo 2 (SEQ ID NO: 6) de muJAK2.

La Figura 5 muestra las respuestas de ELISpot de IFN-γ en esplenocitos de ratones C57BL/6 o Balb/c inmunizados por vía IM con Ad26HEME001 (LS_CALR_JAK2-30mer, SEQ ID NO: 11) (n=8/grupo) o Ad26.Empty (n=4) a una dosis de 10^{10} PV, a las 2 semanas después de la inmunización. Se estimularon esplenocitos durante la noche con un grupo de péptidos de 15mer que abarcan la secuencia HEME001. El número de IFN-γ SFU por 10^6 esplenocitos fue determinado mediante ELISpot. La respuesta media por grupo se indica con una línea horizontal. Las líneas discontinuas indican los antecedentes del ensayo definidos como el percentil del 95 % de la SFU observada en esplenocitos no estimulados (43 SFU/10^6 células). El análisis estadístico se realizó usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, los valores por debajo de 43 SFU/10^6 células se establecieron en este punto de corte. PV, partícula de virus; LOD, límite de detección.

La Figura 6 muestra las respuestas de ELISpot de IFN-γ en esplenocitos de ratones C57BL/6 o Balb/c inmunizados por vía IM con Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer, SEQ ID NO: 10) (n=8/grupo) o Ad26.Empty (n=4) a una dosis de 10^{10} PV, a las 2 semanas después de la inmunización. Se estimularon esplenocitos durante la noche con un grupo de péptidos de 15mer que abarcan la secuencia HEME002. El número de IFN-γ SFU por 10^6 esplenocitos fue determinado mediante ELISpot. La respuesta media por grupo se indica con una línea horizontal. Las líneas discontinuas indican los antecedentes del ensayo definidos como el percentil del 95 % de la SFU observada en esplenocitos no estimulados (43 SFU/10^6 células). El análisis estadístico se realizó usando la prueba de suma de rangos de Wilcoxon, los valores por debajo de 43 SFU/10^6

células se establecieron en este punto de corte. PV, partícula de virus; LOD, límite de detección.

La Figura 7 muestra respuestas de ELISpot de IFN-γ en esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados por vía IM con Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10), MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 26), o Ad26.Empty (n=10/grupo, excepto por el Grupo 1 [MVA-HCalJ-9.9] que tenía 5 animales y el Grupo 10 [Ad26.Empty] que tenía 3 animales). La semana 4, los esplenocitos se estimularon durante la noche con un grupo de péptidos que abarcaba la secuencia de Ad26HEME002. El número de IFN-γ SFU por 10^6 esplenocitos se determinó mediante ELISpot. La respuesta media geométrica por grupo se indica con una línea horizontal. Las líneas discontinuas en los gráficos indican los antecedentes del ensayo definidos como el percentil del 95 % de la SFU observada en los esplenocitos no estimulados. Para las pruebas de diferencia que comparan la inmunización de Ad26HEME002 de solo inducción con la inducción de Ad26HEME002 y el refuerzo con MVA-HCalJ-9.9, se realizó un ANOVA en los datos de ELISpot transformados con $\log_{10}$. Los valores por debajo de 52 SFU/10^6 células se establecieron como punto de corte. Las barras horizontales corresponden a la media de cada grupo. Gr: grupo.

La Figura 8 muestra respuestas de ELISpot de IFN-γ en esplenocitos de ratones C57BL/6 inmunizados por vía IM con Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10), MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO:26), o Ad26.Empty (n = 10/grupo, excepto por el Grupo 1 [MVA-HCalJ-9.9], que tenía 5 animales y el Grupo 4 [Ad26.Empty], que tenía 3 animales). La semana 4, los esplenocitos se estimularon durante la noche con un grupo de péptidos que abarcaba

la secuencia de mutCALR. El número de IFN-γ SFU por 10^6 esplenocitos se determinó mediante ELISpot. La respuesta media geométrica por grupo se indica con una línea horizontal. Las líneas discontinuas en los gráficos indican los antecedentes del ensayo definidos como el percentil del 95 % de la SFU observada en los esplenocitos no estimulados. Para las pruebas de diferencia que comparan la inmunización de Ad26HEME002 de solo inducción con la inducción de Ad26HEME002 y el refuerzo con MVA-HCalJ-9.9, se realizó un ANOVA en los datos de ELISpot transformados con $\log_{10}$. Los valores por debajo de 52 SFU/10^6 células se establecieron como punto de corte. Las barras horizontales corresponden a la media de cada grupo. Gr: grupo.

La Figura 9 muestra las respuestas de ELISpot de IFN-γ en esplenocitos de ratones Balb/c inmunizados por vía IM con Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10), MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26), o Ad26.vacía (n=8/grupo). La semana 4, los esplenocitos se aislaron y se estimularon durante la noche con un grupo de péptidos que abarcaba la secuencia de HEME002. El número de IFN-γ SFU por 10^6 esplenocitos se determinó mediante ELISpot. La respuesta media por grupo se indica con una línea horizontal. Cada punto de datos individual se resta de los antecedentes usando esplenocitos no estimulados durante la noche con péptidos para evaluar los esplenocitos de la SFU/10^6 de los antecedentes. Para la prueba de diferencia que compara la inmunización de inducción de Ad26HEME002 solo con la inducción de Ad26HEME002 y el refuerzo con MVA-HCalJ-9.9, se llevó a cabo una prueba-t no apareada con la corrección de Welch (SD desigual) para evaluar la significancia estadística. SFU: unidad de formación de puntos; Ad vacío: Ad26.Empty; MVA sola: MVA-HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 26); Ad: Ad26HEME002 (LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10).

La Figura 10 muestra la cinética de inducción de IFN-γ que produce células T humanas específicas de HEME002 en primates no humanos inmunizados con Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9mer; SEQ ID NO: 10 (Ad) y/o MVA-HCalJ-9.9 TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) sola o en combinación con YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) con el tiempo medido por ELISpot. Se midieron las respuestas de células T humanas específicas de HEME002 por 10^6 PBMC con el tiempo. La positividad del ensayo se definió como SFU/10^6 células de respuesta sustraída de los antecedentes de >50 SFU/10^6 células y SFU/10^6 células de respuesta sustraída de los antecedentes de >2 × respuesta media. Los valores que fallaron en los criterios de positividad de ensayo se ajustaron a 50 SFU/10^6 células. Se muestran los datos transformados con $\log_{10}$. La línea discontinua inferior se estableció a 50 SFU/10^6 células y corresponde al LOD, mientras que la línea discontinua superior se estableció a 2000 SFU/10^6 células y corresponde al ULOQ. Las puntas de flecha se refieren al tiempo de inmunización por grupo. Las barras de flecha son desviaciones estándar. LOD: límite inferior de detección; ULOQ: límite superior de cuantificación. Gr: grupo. Grupos desde la parte superior del gráfico: Línea superior: Gr4; segunda línea desde la parte superior: Gr3, tercera línea desde la parte superior: Gr2, cuarta línea desde la parte superior: la patente núm. Gr1.

La Figura 11 muestra la inducción de IFN-γ que produce células T específicas de HEME002 en primates no humanos inmunizados con Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) y/o MVA-HCalJ-9.9, TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) solo o en combinación con YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) por grupo en la Semana -2 del estudio. La producción de IFN-γ se evaluó

mediante ELISpot. Los valores mostrados se sustrajeron de los antecedentes y un valor por debajo de 50 SFU/10^6 células se estableció a ese valor (indicado con símbolos en negro abiertos). Los animales con alta respuesta de antecedentes de >150 SFU/10^6 células se indican con símbolos en gris. La barra indica la media del grupo. El análisis estadístico se realizó en el conjunto completo de datos usando un modelo Tobit con pruebas de relación de probabilidad y al aplicar un ajuste de Bonferroni, las respuestas significativas tienen $p<0,05$. La línea discontinua inferior se estableció a 50 SFU/10^6 células y correspondía al LOD, mientras que la línea discontinua superior se estableció a 2000 SFU/10^6 células y correspondía al ULOQ. Se muestran los datos transformados con $\log_{10}$.

La Figura 12 muestra la inducción de IFN-γ que produce células T específicas de HEME002 en primates no humanos inmunizados con Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) y/o MVA-HCalJ-9.9, TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) solo o en combinación con YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) por grupo en la Semana 2 del estudio. La producción de IFN-γ se evaluó mediante ELISpot. Los valores mostrados se sustrajeron de los antecedentes y un valor por debajo de 50 SFU/10^6 células se estableció a ese valor (indicado con símbolos en negro abiertos). Los animales con alta respuesta de antecedentes de >150 SFU/10^6 células se indican con símbolos en gris. La barra indica la media del grupo. El análisis estadístico se realizó en el conjunto completo de datos usando un modelo Tobit con pruebas de relación de probabilidad y al aplicar un ajuste de Bonferroni, las respuestas significativas tienen $p<0,05$. La línea discontinua inferior se estableció a 50 SFU/10^6 células y correspondía al LOD, mientras que la línea discontinua superior se estableció a

2000 SFU/10^6 células y correspondía al ULOQ. Se muestran los datos transformados con $\log_{10}$.

La Figura 13 muestra la inducción de IFN-γ que produce células T específicas de HEME002 en primates no humanos inmunizados con Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) y/o MVA-HCalJ-9.9, TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) solo o en combinación con YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) por grupo en la Semana 6 del estudio. La producción de IFN-γ se evaluó mediante ELISpot. Los valores mostrados se sustrajeron de los antecedentes y un valor por debajo de 50 SFU/10^6 células se estableció a ese valor (indicado con símbolos en negro abiertos). Los animales con alta respuesta de antecedentes de >150 SFU/10^6 células se indican con símbolos en gris. La barra indica la media del grupo. El análisis estadístico se realizó en el conjunto completo de datos usando un modelo Tobit con pruebas de relación de probabilidad y al aplicar un ajuste de Bonferroni, las respuestas significativas tienen $p<0,05$. La línea discontinua inferior se estableció a 50 SFU/10^6 células y correspondía al LOD, mientras que la línea discontinua superior se estableció a 2000 SFU/10^6 células y correspondía al ULOQ. Se muestran los datos transformados con $\log_{10}$.

La Figura 14 muestra la inducción de IFN-γ que produce células T específicas de HEME002 en primates no humanos inmunizados con Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) y/o MVA-HCalJ-9.9, TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) solo o en combinación con YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) por grupo en la Semana 10 del estudio. La producción de IFN-γ se evaluó mediante ELISpot. Los valores mostrados se sustrajeron de los antecedentes y un

valor por debajo de 50 SFU/10^6 células se estableció a ese valor (indicado con símbolos en negro abiertos). Los animales con alta respuesta de antecedentes de >150 SFU/10^6 células se indican con símbolos en gris. La barra indica la media del grupo. El análisis estadístico se realizó en el conjunto completo de datos usando un modelo Tobit con pruebas de relación de probabilidad y al aplicar un ajuste de Bonferroni, las respuestas significativas tienen $p<0,05$. La línea discontinua inferior se estableció a 50 SFU/10^6 células y correspondía al LOD, mientras que la línea discontinua superior se estableció a 2000 SFU/10^6 células y correspondía al ULOQ. Se muestran los datos transformados con $\log_{10}$.

La Figura 15 muestra la inducción de IFN-γ que produce células T específicas de HEME002 en primates no humanos inmunizados con Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10 (Ad) y/o MVA-HCalJ-9.9, TCE_CALR_JAK2-2x9 mer; SEQ ID NO: 26 (MVA) solo o en combinación con YERVOY® (ipilimumab) (Ipi) por grupo en la Semana 16 del estudio. La producción de IFN-γ se evaluó mediante ELISpot. Los valores mostrados se sustrajeron de los antecedentes y un valor por debajo de 50 SFU/10^6 células se estableció a ese valor (indicado con símbolos en negro abiertos). Los animales con alta respuesta de antecedentes de >150 SFU/10^6 células se indican con símbolos en gris. La barra indica la media del grupo. El análisis estadístico se realizó en el conjunto completo de datos usando un modelo Tobit con pruebas de relación de probabilidad y al aplicar un ajuste de Bonferroni, las respuestas significativas tienen $p<0,05$. La línea discontinua inferior se estableció a 50 SFU/10^6 células y correspondía al LOD, mientras que la línea discontinua superior se estableció a 2000 SFU/10^6 células y correspondía al ULOQ. Se muestran los datos transformados con $\log_{10}$.

La Figura 16 muestra que el anticuerpo anti-CTLA4 Ipilimumab administrado por vía SC es igual al administrado en vía IV en las respuestas de células T específicas de antígeno de cebado en NHP. Ipilimumab se dosificó a 3 mg/kg por vía IV o SC en el momento de la inmunización del vector. Las células productoras de IFNγ de 250K PBMC de cynomolgus se estimularon durante la noche con péptidos específicos de mutCALR y se analizaron mediante Elipot. La respuesta del péptido de mutCALR se calculó basada en la respuesta específica de mutCALR - antecedentes. La barra indica la media del grupo. El análisis estadístico se realizó en el conjunto de datos completos usando un modelo Tobit con pruebas de relación de probabilidad y al aplicar un ajuste de Bonferroni. Las respuestas significativas tienen $p<0,05$.

La Figura 17 muestra que la inclusión del anticuerpo anti-PD-1 (Nivolumab, 10 mg/kg vía IV), que comienza la semana 4 para Ad/Ad/MVA + ya sea 1 dosis (grupo 6) o 2 dosis (grupo 5) de ipilimumab (vía SC), mejora la magnitud de la respuesta de células T específicas de mutCALR en comparación con animales dosificados con Ad/Ad/MVA + ipilimumab (vía SC) solo. Ad26: Ad26HEME002, LS_CALR_JAK2-2x9 mer, SEQ ID NO: 10; Ipi; ipilimumab; aPD1: Nivolumab.

La Figura 18A muestra la representación esquemática del genoma de alfavirus del virus del bosque Semliki, un ARN monocatenario de detección positiva que codifica las poliproteínas no estructurales (nsP1-nsP4; replicasa) en el extremo 5’ y los genes estructurales (cápside y glicoproteínas) en el extremo 3'.

La Figura 18B muestra la representación esquemática de una molécula de ARN autorreplicante (replicón) ilustrativa derivada de replicones de alfavirus, donde los genes estructurales virales se reemplazan con el gen de interés bajo el control transcripcional del promotor subgenómico (SGP, por sus siglas en inglés). Los elementos de secuencia conservados (CSE, por sus siglas en inglés) en el extremo 5’ y 3' actúan como promotores para la transcripción de ARN de cadena negativa y cadena positiva. Después de que el replicón se suministra en una célula, el precursor de poliproteína no estructural (nsP1234) se traduce del replicón transcrito in vitro. nsP1234 se procesa autoproteolíticamente en etapas tempranas a los fragmentos nsP123 y nsP4, que transcribe copias de cadena negativa del replicón. Más tarde, nsP123 se procesa completamente en proteínas únicas, que se ensamblan en la replicasa de cadena (+) para transcribir nuevas copias genómicas de cadena positiva, así como transcritos subgenómicos de cadena (+) que codifican el gen de interés. El ARN subgenómico así como el ARN genómico nuevo tienen capucha y están poliadenilados. Los promotores inactivos son *flechas de línea discontinua*; los promotores activos son *flechas de línea continua*.

La Figura 19 es una ilustración esquemática de un ARN autoamplificador ilustrativo derivado de un alfavirus que contiene un casquete en el extremo 5', genes no estructurales (NSP1-4), promotor subgenómico 26S (flecha gris), el gen de interés (GOI) y una cola poliadenilada en el extremo 3'. La ilustración también muestra el elemento de salto del ribosoma 2A (P2A) y los primeros 193 nucleótidos duplicados de nsP1 corriente abajo del extremo 5’ UTR y corriente arriba de la DLP excepto por el codón de inicio.

La Figura 20 es una ilustración esquemática de una nanopartícula lipídica (LNP, por sus siglas en inglés) ilustrativa que encapsula el ARN autoamplificador, con las relaciones molares porcentuales de componentes lipídicos como se indica (Geall et al., PNAS, 2012, 109:14604-14609).

La Figura 21A muestra el ARN autorreplicante LS.CALR-JAK2-2x9mer que induce las respuestas de células T CD4 de anti-CALR. Los datos muestran la producción de IFNγ por parte de los esplenocitos reestimulados con una genoteca de péptidos de CALR superpuestos (barras sin llenar) o DMSO (barras grises) según lo medido por ELISpot.

La Figura 21B muestra el ARN autorreplicante LS.CALR-JAK2-2x9mer que induce las respuestas de células T CD4 anti-CALR. Los datos muestran la producción de IFNγ, TNFα y IL-2 de esplenocitos reestimulados con péptidos de CALR superpuestos medidos por citometría de flujo. Los símbolos representan ratones individuales (n = 5), las barras representan la media con SD. **p<0,01, prueba de Mann-Whitney.

La Figura 22A muestra un ARN autorreplicante formulado con nanopartículas lipídicas LS.CALRJAK2-2x9mer que induce las respuestas de células T CD4 anti-CALR. Los ratones Balb/c se inmunizaron con las dosis indicadas de ARN autorreplicante formulado con LNP LS.CALR-JAK2-2x9mer, así como la versión no formulada en 20 µg, y 14 días después se analizaron los bazos. La figura muestra la producción de IFNγ por parte de los esplenocitos reestimulados con una genoteca de péptidos de CALR superpuestos (sustraídos de los fondos de DMSLO) según lo medido por ELISpot.

La Figura 22B muestra el ARN autorreplicante formulado con nanopartículas lipídicas LS.CALR-JAK2-2x9mer que induce las respuestas de las células T CD1 anti-CALR. Los datos muestran la producción de IFNγ, TNFα y IL-2 de esplenocitos reestimulados con péptidos de CALR superpuestos medidos por citometría de flujo. Los símbolos representan ratones individuales (n = 5), las barras representan la media con SD.* p<0,05, ** p<0,01, prueba de Mann Whitney.

La Figura 23A muestra regímenes de vacunas que refuerzan las respuestas de células T CD4 anti-CALR. Los ratones BALB/c se inducción y después se reforzaron con diversas combinaciones de Ad26, molécula de ARN autorreplicante (replicón) o MVA como se indica en la figura, y después se analizaron los bazos. La figura muestra la producción de IFNγ por parte de los esplenocitos reestimulados con una genoteca de péptidos de CALR superpuestos (sustraídos de los fondos de DMSO) según lo medido por ELISpot.

La Figura 23B muestra regímenes de vacuna que refuerzan las respuestas de células T CD4 anti-CALR. Los datos muestran la producción de IFNγ, TNFα y IL-2 de esplenocitos reestimulados con péptidos de CALR superpuestos medidos por citometría de flujo. Los símbolos representan ratones individuales, las barras representan la media con SD. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 prueba de Mann-Whitney.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Todas las publicaciones, que incluyen, pero no se limitan a las patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan en la presente descripción como referencia como si se describieran completamente.

Debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción tiene el propósito de describir modalidades particulares únicamente y no pretende ser limitante. A menos que se definan de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

Si bien en la práctica y evaluación de la presente invención puede usarse cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente descripción, los materiales y métodos ilustrativos se describen en la presente descripción. En la descripción y reivindicación de la presente invención se usa la siguiente terminología.

Como se usa en esta especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes en plural a menos que el contexto determine claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una célula” incluye una combinación de dos o más células y lo similar.

“Aproximadamente” significa dentro de un rango de error aceptable para el valor particular determinado por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición. A menos que se indique explícitamente de cualquier otra manera

dentro de los Ejemplos o en otra parte de la Especificación en el contexto de un ensayo, resultado o modalidad particular, "aproximadamente" significa dentro de una desviación estándar según la práctica en la técnica, o un rango de hasta 5 %, cualquiera sea mayor.

"Adyuvante" y "estimulante inmunitario" se usan indistintamente en la presente descripción y se definen como una o más sustancias que causan la estimulación del sistema inmunológico. En este contexto, un adyuvante se usa para potenciar una respuesta inmunitaria a las vacunas de la presente descripción.

"Supercóntigo alternativo" se refiere a un marco de proteína monocatenaria que contiene un núcleo estructurado asociado con dominios variables de alta tolerancia conformacional. Los dominios variables toleran la variación que se introduce sin comprometer la integridad del supercóntigo y, por lo tanto, los dominios variables pueden diseñarse por ingeniería y seleccionarse para unirse a un antígeno específico.

"Célula presentadora de antígeno" (APC, por sus siglas en inglés) se refiere a cualquier célula que presenta sobre su superficie un antígeno en asociación con una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad, ya sea molécula del MHC clase I o MHC clase II, o ambas.

"Anticuerpo" se refiere a una molécula de inmunoglobulina que incluye anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales murinos, humanos, humanizados y quiméricos, fragmentos de unión al antígeno, anticuerpos biespecíficos o multiespecíficos, anticuerpos diméricos, tetraméricos o multiméricos, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos de dominio y cualquier

otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno de la especificidad requerida.

"Fragmento de unión al antígeno" se refiere a una porción de una molécula de inmunoglobulina que retiene las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo parental en toda su extensión. Los fragmentos de unión al antígeno ilustrativos son como las regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR) 1, 2 y/o 3, las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR) 1, 2 y/o 3, la VH, la VL, la VH y la VL, Fab, F(ab')2, fragmentos Fd y Fv así como anticuerpos de dominios (dAb) que consisten en un dominio de VH o un dominio de VL. Los dominios de VH y VL pueden unirse entre sí a través de un enlazador sintético para formar varios tipos de diseños de anticuerpos de cadena simple en los que los dominios de VH/VL se aparean intramolecularmente, o intermolecularmente en aquellos casos cuando los dominios de VH y VL se expresan por cadenas separadas, para formar un sitio de unión al antígeno monovalente, tal como un Fv de cadena simple (scFv, por sus siglas en inglés) o un diacuerpo; descrito, por ejemplo, en la publicación de la patente internacional núm. WO1998/44001, publicación de la patente internacional núm. WO1988/01649, publicación de la patente internacional núm. WO1994/13804 o en la publicación de la patente internacional núm. WO1992/01047.

Los términos transicionales "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" pretenden connotar sus significados generalmente aceptados en el lenguaje de patentes; es decir, (i) "que comprende", que es sinónimo de "que incluye", "que contiene" o "caracterizado por", es inclusivo o abierto y no excluye etapas o elementos no enumerados

adicionales del método; (ii) "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en la reivindicación; y (iii) "que consiste esencialmente en" limita el alcance de una reivindicación a las etapas o materiales especificados "y los que no afectan materialmente la(s) característica(s) básica(s) y novedosa(s)" de la invención reivindicada. Las modalidades descritas en términos de la frase "que comprende" (o sus equivalentes) también proporcionan como modalidades las que se describen independientemente en términos de "que consiste en" y "que consiste esencialmente en".

"CALR" se refiere a la calreticulina humana. La proteína de CALR humana comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra, por ejemplo, en el número de acceso UniPort P27797.

"Bucle corriente abajo" o "motivo DLP" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende al menos un tallo-bucle de ARN, que cuando se coloca corriente abajo de un codón de inicio de un marco de lectura abierto (ORF) proporciona una traducción aumentada del ORF en comparación con un constructo idéntico de cualquier otra manera sin el motivo DLP.

"Potenciar" o "inducir" cuando es en referencia a una respuesta inmunitaria se refiere a incrementar la escala y/o eficacia de una respuesta inmunitaria o extender la duración de la respuesta inmunitaria. Los términos se usan indistintamente con "aumentar".

"Secuencia de epítopo" como se usa en la presente descripción, se refiere a una parte de una secuencia de polipéptidos o de aminoácidos, por ejemplo, una parte de la estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de una secuencia de polipéptidos o de aminoácidos, que es reconocida por el

sistema inmune, por ejemplo, anticuerpos, células B (por ejemplo, células B) y/o células T.

"Vector de expresión" se refiere a un vector que puede usarse en un sistema biológico o en un sistema biológico reconstituido para dirigir la traducción de un polipéptido codificado por una secuencia de polinucleótido presente en el vector de expresión.

"Elemento facilitador" se refiere a cualquier elemento de polinucleótido o polipéptido que se enlaza operativamente a un polinucleótido o un polipéptido, e incluye promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, codones de terminación, etiquetas de proteínas, tales como etiqueta de histidina, y lo similar.

"Heterólogo" se refiere a dos o más polinucleótidos o dos o más polipéptidos que en la naturaleza no se encuentran en la misma relación entre sí.

"Fragmento inmunogénico" se refiere a un polipéptido que se reconoce mediante linfocitos T citotóxicos, linfocitos T cooperadores o células B cuando el fragmento forma un complejo con moléculas de MHC de clase I o MHC clase de II.

"En marco" se refiere al marco de lectura de codones en un primer polinucleótido que es el mismo que el marco de lectura de codones en un segundo polinucleótido, que se vinculan entre sí para formar un polinucleótido. El polinucleótido en marco codifica un polipéptido heterólogo codificado por el primer polinucleótido y el segundo polinucleótido.

"Inmunogénico" se refiere a un polipéptido que comprende uno o más fragmentos inmunogénicos.

"Respuesta inmunitaria" se refiere a cualquier respuesta a un polipéptido o polinucleótido inmunogénico o fragmento por parte del sistema

inmune de un sujeto vertebrado. Las respuestas inmunitarias ilustrativas incluyen inmunidad celular local y sistémica, así como inmunidad humoral, tal como respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL, por sus siglas en inglés), que incluyen la inducción específica de antígeno de CTL CD8+, respuestas de células T colaboradora que incluyen respuestas proliferativas de células T y liberación de citocinas, y respuestas de células B que incluyen respuestas de anticuerpos.

"En combinación con" significa que dos o más agentes terapéuticos se administrarán a un sujeto juntos en una mezcla, simultáneamente como agentes únicos o secuencialmente como agentes únicos en cualquier orden.

"Aislada" se refiere a una población homogénea de moléculas (tales como polinucleótidos o polipéptidos sintéticos) que se ha separado y/o purificado sustancialmente de otros componentes del sistema en los que las moléculas se producen, tal como una célula recombinante, así como una proteína que se ha sometido a al menos una etapa de aislamiento o purificación. "**Aislado**" se refiere a una molécula que está sustancialmente exenta de otro material celular y/o sustancias químicas y abarca moléculas que están aisladas a una pureza más alta, tal como a 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de pureza.

"JAK2" se refiere a la cinasa Janus 2 humana. La proteína de JAK2 humana comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra por ejemplo en el número de acceso de UniPort O060674.

"CALR mutante" se refiere al CALR que alberga una o más mutaciones en el exón 9.

"JAK2 mutante" se refiere a JAK2 que alberga la mutación V617F.

"De origen artificial" se refiere a una molécula que no existe en la naturaleza.

Secuencias "enlazadas operativamente" se refiere a ambas secuencias de control de expresión que son contiguas a las secuencias de ácido nucleico que regulan y secuencias reguladoras que actúan en trans, o a una distancia para controlar la secuencia de ácido nucleico regulada.

"Cromosoma Filadelfia" o "Ph" se refiere a una traslocación cromosomal bien conocida entre los cromosomas 9 y 22, que resulta en la fusión oncogénica de los genes BCR-ABL con actividad tirosina cinasa activa constitutivamente. La traslocación da como resultado que una porción del gen BCR del cromosoma 22q11 se funde con una porción del gen ABL del cromosoma 9q34, y se designa como t (9;22)(q34;q11) bajo el Sistema Internacional para la Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN). En dependencia de la localización precisa de la fusión, el peso molecular de la proteína de fusión resultante puede variar desde 185 a 210 kDa. "Cromosoma Filadelfia" se refiere a todas las proteínas de fusión BCR-ABL formadas debido a la traslocación (9;22)(q34;q11).

El término "polinucleótido" se refiere a una molécula que comprende una cadena de nucleótidos unida covalentemente por una cadena principal de azúcar y fosfato u otra química covalente equivalente. Los ejemplos de polinucleótidos incluyen ARN y ADN.

"Polipéptido" o "proteína" se refiere a una molécula que comprende al menos dos residuos de aminoácidos unidos por un enlace peptídico para formar un polipéptido.

"Prevenir", "que previene", "prevención", o "profilaxis" de una enfermedad o trastorno significa prevenir que se produzca un trastorno en el sujeto.

"Inducción-refuerzo" o "régimen de inducción-refuerzo" se refiere un método para tratar a un sujeto que comprende iniciar una respuesta de células T con una primera vacuna seguido por el refuerzo de la respuesta inmunitaria con una segunda vacuna. La primera vacuna y la segunda vacuna son típicamente distintas. Estas inmunizaciones de inducción-refuerzo provocan respuestas inmunitarias de mayor altura y amplitud que las que pueden lograrse al inducir y reforzar con la misma vacuna. La etapa de inducción inicia células de memoria y la etapa de refuerzo expande la respuesta de memoria. El refuerzo puede ocurrir una o varias veces.

"Recombinante" se refiere a polinucleótidos, polipéptidos, vectores, virus y otras macromoléculas que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes.

"Refractario" se refiere a una enfermedad que no responde a un tratamiento. Una enfermedad refractaria puede ser resistente a un tratamiento antes o al comienzo del tratamiento, o una enfermedad refractaria puede volverse resistente durante un tratamiento.

"Recaída" se refiere al regreso de una enfermedad o los signos y síntomas de una enfermedad después de un período de mejora después del tratamiento previo con un agente terapéutico.

"Replicón" se refiere a un ácido nucleico viral que es capaz de dirigir la generación de copias de sí mismo, e incluye ARN así como ADN. Por ejemplo, las

versiones de ADN bicatenario de genomas de arterivirus pueden usarse para generar un transcrito de ARN monocatenario que constituye un replicón de arterivirus. Generalmente, un replicón viral contiene el genoma completo del virus.

"Replicón de ARN" (o "ARN autorreplicante", o "molécula de ARN autorreplicante" o "ARNrep") se refiere a la molécula de ARN que contiene toda la información genética requerida para dirigir su propia amplificación o autorreplicación dentro de una célula permisiva. Para dirigir su propia replicación, la molécula de ARN: 1) codifica polimerasa, replicasa u otras proteínas que pueden interactuar con proteínas virales o derivadas de células huésped, ácidos nucleicos o ribonucleoproteínas para catalizar el proceso de amplificación del ARN; y 2) contiene secuencias de ARN que actúan en cis requeridas para la replicación y transcripción del ARN codificado por replicón. La molécula de ARN autorreplicante deriva típicamente de los genomas de virus con ARN de cadena positiva y pueden usarse como base para introducir secuencias foráneas en células huésped reemplazando secuencias virales que codifican genes estructurales o no estructurales o insertando las secuencias foráneas 5' o 3' de las secuencias que codifican los genes estructurales o no estructurales. Las secuencias foráneas pueden introducirse en las regiones subgenómicas de los alfavirus. La molécula de ARN autorreplicante puede empaquetarse en partículas virales recombinantes, tales como partículas de alfavirus recombinantes o suministrarse alternativamente al huésped usando nanopartículas lipídicas (LNP). El ARN autorreplicante puede tener un tamaño de al menos 1 kb o al menos 2 kb o al menos 3 kb o al menos 4 kb o al menos 5 kb o al menos 6 kb o al menos 7 kb o al menos 8 kb o al menos 10 kb o al

menos 12 kb o al menos 15 kb o al menos 17 kb o al menos 19 kb o al menos 20 kb, o puede tener un tamaño de 100 pb-8 kb o 500 pb-8 kb o 500 pb-7 kb o 1-7 kb o 1-8 kb o 2-15 kb o 2-20 kb o 5-15 kb o 5-20 kb o 7-15 kb o 7-18 kb o 7-20 kb. Los ARN autorreplicantes se describen, por ejemplo, en las patentes núm. WO2017/180770, WO2018/075235, y WO2019143949A2.

"Se une específicamente", "unión específica", "que se une específicamente" o "se une" se refiere a una molécula proteinácea que se une a un antígeno o a un epítopo dentro del antígeno con mayor afinidad que a otros antígenos. Típicamente, la molécula proteica se une al antígeno o al epítopo dentro del antígeno con una constante de disociación de equilibrio (KD) de aproximadamente 1x10-7 M o menor, por ejemplo, aproximadamente 5x10-8 M o menor, aproximadamente 1x10-8 M o menor, aproximadamente 1x10-9 M o menor, aproximadamente 1x10-10 M o menor, aproximadamente 1x10-11 M o menor, o aproximadamente 1x10-12 M o menor, típicamente con la KD que es al menos cien veces menor que su KD para la unión a un antígeno no específico (p. ej., BSA, caseína). En el contexto de las moléculas descritas en la presente descripción, "unión específica" se refiere a la unión de la molécula proteinácea a los polipéptidos de CALR/JAK2 mutante, polipéptidos de CALR mutante o polipéptidos de JAK2 mutante solos o en complejo con HLA sin la unión detectable a un CALR o JAK2 de tipo silvestre solo o en complejo con HLA.

"ARN subgenómico" se refiere a una molécula de ARN de una longitud o tamaño que es menor que el ARN genómico del cual se derivó. El ARN subgenómico viral puede transcribirse a partir de un promotor interno, cuyas secuencias residen dentro del ARN genómico o su complemento. La transcripción de un ARN

subgenómico puede mediarse por polimerasa(s) codificada por virus asociadas con proteínas codificadas por células huésped, ribonucleoproteína(s), o una combinación de estas. Numerosos virus de ARN generan ARNm subgenómicos (ARNsg) para la expresión de sus 3’-genes proximales. El ARN subgenómico viral puede transcribirse a partir de un promotor interno, cuyas secuencias residen dentro del ARN genómico o su complemento. La transcripción de un ARN subgenómico puede mediarse por polimerasa(s) codificada por virus asociadas con proteínas codificadas por células huésped, ribonucleoproteína(s), o una combinación de estas.

“Replicón subgenómico” se refiere a un ácido nucleico viral que contiene algo menos que el complemento completo de genes y otras características del genoma viral, y aun así es capaz de dirigir la generación de copias de sí mismas. Por ejemplo, los replicones subgenómicos del arterivirus pueden contener la mayor parte de los genes para las proteínas no estructurales del virus, pero carecen de la mayor parte de los genes que codifican para las proteínas estructurales. Los replicones subgenómicos son capaces de dirigir la expresión de todos los genes virales necesarios para la replicación del subgenoma viral (replicación del replicón subgenómico), sin la producción de partículas virales.

“Sujeto” incluye cualquier animal humano o no humano. “Animal no humano” incluye todos los vertebrados, *p. ej.,* mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc. Los términos “sujeto” y “paciente” pueden usarse indistintamente en la presente descripción.

"Tratar", "que trata" o "tratamiento" de una enfermedad o trastorno tal como cáncer se refiere a lograr uno o más de lo siguiente: reducir la severidad y/o duración del trastorno, inhibir el empeoramiento de los síntomas característicos del trastorno tratado, limitar o prevenir la recurrencia del trastorno en un sujeto que ha tenido antes el trastorno, o limitar o prevenir la recurrencia de los síntomas en sujetos que fueron antes sintomáticos para el trastorno.

"Cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva, a dosis y durante períodos de tiempo necesarios, para lograr un resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar dependiendo de factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo, el peso del individuo, y la capacidad de un agente terapéutico o una combinación de agentes terapéuticos para inducir una respuesta deseada en el individuo. Los indicadores ilustrativos de un agente terapéutico o combinación de agentes terapéuticos efectivos incluyen, por ejemplo, un mayor bienestar del sujeto.

"Vacuna" se refiere a una composición que comprende uno o más polipéptidos inmunogénicos, polinucleótidos que codifican polipéptidos o fragmentos inmunogénicos, vectores que comprenden polinucleótidos que codifican polipéptidos inmunogénicos, o cualquier combinación de estos administrada deliberadamente para inducir inmunidad adquirida en el receptor (p. ej., sujeto).

"Vector" se refiere a un polinucleótido capaz de duplicarse dentro de un sistema biológico o que puede moverse entre tales sistemas. Los polinucleótidos vectores contienen, típicamente, elementos tales como orígenes de replicación, señal de poliadenilación o marcadores de selección, que funcionan para facilitar la

duplicación o mantenimiento de esos polinucleótidos en un sistema biológico. Los ejemplos de esos sistemas biológicos pueden incluir una célula, virus, animal, planta, y sistemas biológicos reconstituidos que usan componentes biológicos capaces de duplicar un vector. El polinucleótido que comprende un vector puede ser moléculas de ADN o ARN o un híbrido de estas.

"Vector viral" se refiere a un constructo de vector que incluye al menos un elemento de polinucleótido de origen viral y tiene la capacidad de empaquetarse en una partícula de vector viral.

"Variante", "mutante" o "alterado" se refieren a un polipéptido o a un polinucleótido que difieren de un polipéptido de referencia o de un polinucleótido de referencia en una o más modificaciones, por ejemplo, una o más sustituciones, inserciones o deleciones.

Polipéptidos

En la presente se describen polipéptidos que comprenden secuencias de epítopos de CALR mutante y JAK2 mutante que pueden provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunas modalidades, el polipéptido puede comprender al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRR TRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;

- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1; el epítopo de CALR de la SEQ ID NO:2 que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4. Las secuencias de epítopo de las sec. con núms. de ident.: 1, 2 y 4 pueden estar presentes en cualquier orden y pueden separarse mediante un enlazador. Las secuencias de enlazador ilustrativas incluyen AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, o REKR (SEQ ID NO: 59).

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de cinasa Janus 2 (JAK2) de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, el epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de epítopo de las sec. con núms. de ident.: 6, 1 y 2 pueden estar presentes en cualquier orden y pueden separarse mediante un enlazador. Las

secuencias de enlazador ilustrativas incluyen AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, o REKR (SEQ ID NO: 59).

En algunas modalidades, la descripción también proporciona un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de cinasa Janus 2 (JAK2) de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, el epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de epítopos de las sec. con núms. de ident.: 6, 5, 1 y 2 pueden estar presentes en cualquier orden y pueden separarse mediante un enlazador, tal como AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, o REKR (SEQ ID NO: 59).

La descripción proporciona además un polipéptido que comprende secuencias de aminoácidos de uno o más de los siguientes: SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 31, o un fragmento inmunogénico de estas.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 28 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 28;

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31;

En algunas modalidades, el polipéptido comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. La

descripción también proporciona un polipéptido que comprende dos o más repeticiones de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el polipéptido comprende 2, 3, 4, 5, o más de 5 repeticiones de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, las repeticiones de la SEQ ID NO: 6 pueden separarse mediante un enlazador. Las secuencias enlazadoras ilustrativas incluyen AAY, RR o DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, o REKR (SEQ ID NO: 59).

En algunas modalidades, los enlazadores descritos en la presente descripción pueden comprender un sitio de escisión de proteasa de tal manera que los polipéptidos pueden escindirse in vivo en un sujeto en fragmentos peptídicos que comprenden secuencias de epítopos, que dan como resultado una respuesta inmunitaria mejorada.

En algunas modalidades, los polipéptidos de la descripción pueden comprender además una secuencia líder o secuencia potenciadora de células T (TCE) en el extremo N-terminal. Las secuencias líderes pueden incrementar la expresión y/o incrementar la respuesta inmunológica. Las secuencias líderes ilustrativas incluyen la cadena α del receptor TCR de linfocitos T^2 (HAVT20) (MACPGFLWALVISTC LEFSMA; SEQ ID NO: 8), una secuencia señal de ubiquitina (Ubiq) (MQIFVKTLTGKTITLEVEP SDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGV; SEQ ID NO: 54), o una secuencia potenciadora de células T (TCE), tal como un fragmento de péptido de longitud de 28aa de la cadena invariante del pez mandarín (MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV; SEQ ID NO: 29). Se cree que las

secuencias líderes pueden ayudar a incrementar una respuesta inmunitaria a los epítopos descritos en la presente descripción.

Polinucleótidos

La descripción también proporciona polinucleótidos que codifican cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRR TRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que codifica un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1; el epítopo de CALR de la SEQ ID NO:2 que tiene al menos 90 % de

identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4. Las secuencias de epítopo de las sec. con núms. de ident.: 1, 2 y 4 pueden estar presentes en cualquier orden y pueden separarse mediante un enlazador.

En algunas modalidades, la descripción proporciona polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de cinasa Janus 2 (JAK2) de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, el epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de epítopo de las sec. con núms. de ident.: 6, 1 y 2 pueden estar presentes en cualquier orden y pueden separarse mediante un enlazador.

En algunas modalidades, la descripción proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de cinasa Janus 2 (JAK2) de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, el epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, y el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2. Las secuencias de epítopo de las sec. con núms. de ident.: 6, 5, 1 y 2 pueden estar presentes en cualquier orden y pueden separarse mediante un enlazador.

En algunas modalidades, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;

En algunas modalidades, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;

En algunas modalidades, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7;

En algunas modalidades, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12;

En algunas modalidades, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13;

En algunas modalidades, el polinucleótido aislado codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6;

La descripción también proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que comprende dos o más repeticiones de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, el polinucleótido codifica un polipéptido que comprende 2, 3, 4, 5, o más de 5 repeticiones de la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, las repeticiones de la SEQ ID NO: 6 pueden separarse mediante un enlazador.

En algunas modalidades, el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 16 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 18 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 20 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 21 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 22 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22;

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26; y

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27;

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende ADN.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende ARN.

En algunas modalidades, el ARN es ARNm o ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, el polinucleótido comprende un promotor, un potenciador, un sitio de poliadenilación, una secuencia de Kozak, un codón de terminación, o cualquier combinación de estos.

Los métodos para generar polinucleótidos de la invención son conocidos en la técnica e incluyen síntesis química, síntesis enzimática (p. ej., transcripción *in vitro*), escisión enzimática o química de un precursor más largo, síntesis química de fragmentos más pequeños de los polinucleótidos seguido por ligadura de los fragmentos o métodos de PCR conocidos. La secuencia de polinucleótidos que se sintetizará puede diseñarse con los codones adecuados para la secuencia de

aminoácidos deseada. Generalmente, los codones preferidos pueden seleccionarse para el huésped previsto en el cual se usará la secuencia para expresión.

Vectores

La descripción también proporciona vectores que comprenden cualquiera de los polinucleótidos descritos en la presente descripción. La descripción también proporciona vectores que comprenden un polinucleótido que codifica uno o más polipéptidos descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, el vector comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRR TRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos.

El vector puede ser un vector destinado a la expresión del polinucleótido de la descripción en cualquier huésped, tal como bacterias, levaduras o un

mamífero. Los vectores de expresión adecuados son, típicamente, replicables en los organismos huéspedes ya sea como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. Comúnmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección tales como resistencia a la ampicilina, resistencia a la higromicina, resistencia a la tetraciclina, resistencia a la canamicina o resistencia a la neomicina para permitir la detección de las células transformadas o transducidas con las secuencias de ADN deseadas. Los vectores ilustrativos son los plásmidos, cósmidos, fagos, vectores virales o cromosomas artificiales.

Los vectores ilustrativos que pueden usarse son - bacterianos: pBs, phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBs KS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene, La Jolla, Calif., USA); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, y pRIT5 (Pharmacia, Uppsala, Suecia). Eucariotas: pWLneo, pSV2cat, pOG44, PXR1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia).

La descripción proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la invención. La descripción también proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido de la descripción.

La descripción también proporciona un vector viral que comprende el cualquiera de los polinucleótidos de la descripción.

La descripción también proporciona un vector viral que comprende un polinucleótido que codifica cualquiera de los polipéptidos de la descripción.

Los vectores virales se derivan de genomas de virus de origen natural que típicamente se modifican para ser incompetentes de replicación, p. ej., no replicante. Los virus no replicantes requieren el suministro de proteínas en trans para la

replicación. Típicamente, esas proteínas se expresan establemente o transitoriamente en una línea celular productora viral, de esta manera, permiten la replicación del virus. Por lo tanto, los vectores virales son típicamente infecciosos y no replicantes. Los vectores virales pueden ser vectores de adenovirus, vectores de virus asociados a adeno (AAV, por sus siglas en inglés) (p. ej., AAV tipo 5 y tipo 2), vectores de adenovirus de grandes simios (Gad, por sus siglas en inglés), vectores alfavirus (p. ej., virus de encefalitis equina venezolana (VEE, por sus siglas en inglés), virus Sindbis (SIN, por sus siglas en inglés), virus del bosque Semliki (SFV, por sus siglas en inglés), y quimeras de VEE-SIN), vectores de virus del herpes (p. ej., vectores derivados de citomegalovirus, como Rhesus citomegalovirus (RhCMV, por sus siglas en inglés)), vectores del virus arena (p. ej., vectores del virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV, por sus siglas en inglés)), vectores del virus del sarampión, vectores del virus de la viruela (p. ej., virus vaccinia, virus vaccinia modificado de Ankara (MVA, por sus siglas en inglés), NYVAC (derivado de la cepa del vaccinia de Copenhague), y vectores de viruela aviar: vectores de la viruela del canario (ALVAC, por sus siglas en inglés) y viruela aviar (FPV, por sus siglas en inglés)), vectores del virus de la estomatitis vesicular, vectores retrovirus, vectores lentivirus, partículas de tipo viral y esporas bacterianas.

En algunas modalidades, el vector viral se deriva de adenovirus, poxvirus, alfavirus, virus asociado a adeno, retrovirus o una molécula de ARN autorreplicante.

Vectores adenovirales

En algunas modalidades, el vector viral se deriva de un adenovirus.

Los vectores de adenovirus pueden derivarse de adenovirus humano (Ad), pero también de adenovirus que infectan otras especies, tales como adenovirus bovino (p. ej., adenovirus bovino 3, BAdV3), un adenovirus canino (p. ej., CAdV2), un adenovirus porcino (p. ej., PAdV3 o 5), o grandes simios, tales como chimpancé (*Pan*), gorila (*Gorila*), orangután (*Pongo*), Bonobo (*Pan paniscus*) y chimpancé común (*Pan troglodytes*). Típicamente, los adenovirus de grandes simios de origen natural se aíslan de muestras de heces del gran simio respectivo.

Los vectores de adenovirus humanos pueden derivarse de varios serotipos de adenovirus, por ejemplo, de serotipos de adenovirus humanos hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49 o hAd50 (los serotipos también se denominan Ad5, Ad7, Ad11, Ad26, Ad34, Ad35, Ad48, Ad49 o Ad50).

Los vectores de adenovirus de grandes simios pueden derivarse de diversos serotipos de adenovirus, por ejemplo, de serotipos de adenovirus de grandes simios GAd20, Gad19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAdI7, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2, o PanAd3.

Los vectores de adenovirus se conocen en la técnica. Las secuencias de la mayoría de los adenovirus humanos y no humanos son conocidas, y para otros se pueden obtener mediante el uso de procedimientos de rutina. Una secuencia de genoma ilustrativa de Ad26 se encuentra en el núm. de acceso del GenBank EF153474 y en la SEQ ID NO: 1 de la publicación de la patente internacional núm. WO2007/104792. Una secuencia de genoma ilustrativa de Ad35 se encuentra en la

Figura 6 de la publicación de la patente internacional núm. WO2000/70071. Los vectores basados en Ad26 se describen, por ejemplo, en la publicación de la patente internacional núm. WO2007/104792. Los vectores basados en Ad35 se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 7.270.811 y en la publicación de la patente internacional núm. WO2000/70071. Los vectores basados en ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAd17, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd63 y ChAd82 se describen en WO2005/071093. Los vectores basados en PanAd1, PanAd2, PanAd3, ChAd55, ChAd73, ChAd83, ChAd146, y ChAd147 se describen en la publicación de la patente internacional núm. WO2010/086189.

Los vectores de adenovirus se diseñan para comprender al menos una deleción funcional o una eliminación completa de un producto génico que es esencial para la replicación viral, tal como una o más de las regiones adenovirales E1, E2 y E4, lo que hace que el adenovirus sea incapaz de replicación. La deleción de la región EI puede comprender la deleción de EIA, EIB 55K o EIB 21K, o cualquier combinación de estas. Los adenovirus deficientes en replicación se propagan al proporcionar las proteínas codificadas por la región o regiones eliminadas en trans por la célula productora usando plásmidos cooperadores o la ingeniería genética de la célula productora para expresar las proteínas requeridas. Los vectores de adenovirus también pueden tener una deleción en la región E3, que es dispensable para la replicación y, por lo tanto, tal deleción no tiene que complementarse. El vector de adenovirus de la descripción puede comprender una deleción funcional o una eliminación completa de la región E1 y al menos parte de la región E3. El vector

adenovirus de la descripción puede comprender además una deleción funcional o una eliminación completa de la región E4 y/o la región E2. Las células productoras adecuadas que pueden usarse son células de la retina humana inmortalizadas por El, p. ej., 911 o células PER.C6 (ver, p. ej., patente de los EE. UU. núm. 5.994.128), amniocitos transformados por El (ver, p. ej., EP 1230354), células A549 transformadas con E1 (ver, p. ej. publicación de la patente internacional núm. WO1998/39411, patente de los EE. UU. núm. 5.891.690). Los vectores ilustrativos que pueden usarse son Ad26 que comprende una región codificante E1 funcional que es suficiente para la replicación viral, una deleción en la región codificante E3 y una deleción en la región codificante E4, siempre que no se suprima el marco de lectura abierto 6/7 de E4 (ver p. ej., patente de los EE. UU. núm. 9.750.801)

En algunas modalidades, el vector de adenovirus es un vector de adenovirus humano (Ad). En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad5. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad11. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad7. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad26. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad34. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad35. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad48. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad49. En algunas modalidades, el vector Ad se deriva de Ad50.

En algunas modalidades, el vector de adenovirus es un vector de adenovirus de gran simio (GAd). En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd20. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd19. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd21. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd25. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd26.

En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd27. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd28. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd29. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd30. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de GAd31. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd3. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd4. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd5. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd6. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd7. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd8. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd9. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd9. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd10. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd11. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd16. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd17. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd19. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd20. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd22. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd24. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd26. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd30. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd31. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd32. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd31. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd33. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd37. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd38. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd44. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd55. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd63. En algunas modalidades, el vector

Gad se deriva de ChAd68. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd73. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd82. En algunas modalidades, el vector Gad se deriva de ChAd83. GAd19-21 y GAd25-31 se describen en la publicación de la patente internacional núm. WO2019/008111 y representan cepas con alta inmunogenicidad y sin inmunidad preexistente en la población humana general. La secuencia de polinucleótidos del genoma de GAd20 se describe en la publicación de la patente internacional núm. WO2019/008111.

Los polinucleótidos de la descripción pueden insertarse en un sitio o región (región de inserción) en el vector que no afecte la viabilidad del virus recombinante obtenido. Los polinucleótidos de la descripción pueden insertarse en la región E1 eliminada en orientación paralela (transcrita de 5’ a 3’) o antiparalela (transcrita en una dirección de 3’ a 5’ en relación con la cadena principal del vector). Además, los elementos reguladores transcripcionales adecuados que son capaces de dirigir la expresión del polipéptido o del polipéptido heterólogo de la descripción en las células huésped de mamífero en las que el vector se está preparando para usar pueden unirse operativamente al polipéptido o al polipéptido de la descripción.

Las partículas adenovirales recombinantes pueden prepararse y propagarse de acuerdo con cualquier técnica convencional en el campo de la técnica (p. ej., publ. de la patente internacional núm. WO1996/17070) usando una línea celular complementaria o un virus cooperador, que suministra en trans los genes virales faltantes necesarios para la replicación viral. Las líneas celulares 293, PER.C6, E1 A549 y 911 se usan comúnmente para complementar las deleciones de El. Otras líneas celulares se modificaron para complementar

vectores defectuosos (Yeh, et al., 1996, J. Virol. 70: 559-565; Kroughak and Graham, 1995, Human Gene Ther. 6: 1575-1586; Wang, et al., 1995, Gene Ther. 2: 775-783; Lusky, et al., 1998, J. Virol. 72: 2022-203; EP 919627 y la publ. de la patente internacional núm. WO1997/04119). Las partículas adenovirales pueden recuperarse del sobrenadante del cultivo, pero además de las células después de la lisis y, opcionalmente, se pueden purificar más aún de acuerdo con técnicas estándar (p. ej., cromatografía, ultracentrifugación, como se describe en la publ. de la patente internacional núm. WO1996/27677, publicación de la patente internacional núm. WO1998/00524, publicación de la patente internacional núm. WO1998/26048 y la publicación de la patente internacional núm. WO2000/50573). La construcción y los métodos para propagar vectores adenovirales también se describen en, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. núms. 5.559.099, 5.837.511, 5.846.782, 5.851.806, 5.994.106, 5.994.128, 5.965.541, 5.981.225, 6.040.174, 6.020.191, y 6.113.913.

En la presente descripción se proporciona un vector viral que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción, en donde el vector se deriva de hAd26 (también denominado has Ad26).

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 16 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 17 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al

menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 18 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 20 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 21 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 22 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 23 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al

menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 24 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 25 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 27 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o que tiene al menos

90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15.

En algunas modalidades, el vector de Ad26 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

En la presente descripción se proporciona un vector viral que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción, en donde el vector se deriva de GAd20.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 16 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 17 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 18 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19 o que tiene al menos 90 % de identidad de

secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 20 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 21 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 22 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 23 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 24 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 25 o que tiene al menos 90 % de identidad de

secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 27 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos

90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15.

En algunas modalidades, el vector de GAd20 comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

Vectores de poxvirus

Los vectores de poxvirus (*Poxviridae*) pueden derivarse de virus de viruela (variola), virus vaccinia, virus de viruela de vaca o virus de viruela de simio. Los virus vaccinia ilustrativos son el virus vaccinia de Copenhagen (W), virus vaccinia atenuado de Nueva York (NYVAC), ALVAC, TROVAC o vaccinia modificado de Ankara (MVA).

El MVA se origina de la cepa dérmica de vaccinia de Ankara (virus vaccinia Chorioalantois de Ankara (CVA)) que se mantuvo en el Vaccination Institute, Ankara, Turkey durante muchos años y se usó como base para la vacunación de humanos. Sin embargo, debido a las complicaciones posvacunas frecuentemente graves asociadas con los virus vaccinia (VACV), hubo varios intentos de generar una vacuna de viruela más atenuada y segura.

El MVA se ha generado mediante 516 pases seriados en fibroblastos de embriones de pollo del virus CVA (Meyer et al., *J. Gen. Virol*., 72: 1031-1038 (1991) y patente de los EE. UU. núm. 10.035.832). Como consecuencia de estos pases a largo plazo, el virus MVA resultante eliminó aproximadamente 31 kilobases de su secuencia genómica y, por lo tanto, se describió como altamente restringido por células huésped a células aviares (Meyer, H. et al., Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038, 1991; Meisinger-Henschel et al., Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara, J. Gen. Virol. 88, 3249-3259, 2007). La comparación del genoma del MVA con su parental, CVA, reveló 6 deleciones principales de ADN genómico (deleción I, II, III, IV, V y VI), con un total de 31.000 pares de bases. (Meyer et al., J. Gen. Virol. 72:1031-8 (1991)). Se

demostró en una variedad de modelos animales que el MVA resultante era significativamente avirulento (Mayr, A. & Danner, K. Vaccination against pox diseases under immunosuppressive conditions, Dev. Biol. Stand. 41: 225-34, 1978). Debido a que se usaron muchos pases para atenuar el MVA, existen varias cepas o aislados diferentes, dependiendo del número de pase en células CEF, tales como MVA 476 MG/14/78, MVA-571, MVA-572, MVA-574, MVA-575 y MVA-BN. MVA 476 MG/14/78 se describe, por ejemplo, en la publicación de la patente internacional núm. WO2019/115816A1. La cepa MVA-572 se depositó en la European Collection of Animal Cell Cultures ("ECACC"), Health Protection Agency, Microbiology Services, Porton Down, Salisbury SP4 0JG, Reino Unido ("Reino UNIDO"), bajo el número de depósito ECACC 94012707 el 27 de enero de 1994. La cepa MVA-575 se depositó en el ECACC bajo el número de depósito ECACC 00120707 el 7 de diciembre de 2000; La cepa MVA-Bavarian Nordic ("MVA-BN") se depositó en el ECACC bajo el número de depósito V00080038 el 30 de agosto de 2000. Las secuencias genómicas de MVA-BN y MVA-572 están disponibles en GenBank (números de acceso DQ983238 y DQ983237, respectivamente). Las secuencias genómicas de otras cepas del MVA pueden obtenerse usando métodos de secuenciación convencionales.

Los vectores y virus de la descripción pueden derivarse de cualquier cepa del MVA u otros derivados de la cepa del MVA. Otra cepa ilustrativa del MVA es el depósito VR-1508, depositado en la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Va. 20108, EE. UU.

Derivados de MVA se refiere a virus que exhiben esencialmente las mismas características que el MVA parental, pero exhiben diferencias en una o más partes de sus genomas.

En algunas modalidades, el vector MVA se deriva de MVA 476 MG/14/78. En algunas modalidades, el vector de MVA se deriva del MVA-571. En algunas modalidades, el vector de MVA se deriva del MVA-572. En algunas modalidades, el vector de MVA se deriva del MVA-574. En algunas modalidades, el vector de MVA se deriva del MVA-575. En algunas modalidades, el vector de MVA se deriva de MVA-BN.

El polinucleótido de la descripción puede insertarse en un sitio o región (región de inserción) en el vector de MVA que no afecte la viabilidad del virus recombinante obtenido. Tales regiones pueden identificarse fácilmente mediante la prueba de segmentos de ADN viral para regiones que permiten la formación recombinante sin afectar seriamente la viabilidad viral del virus recombinante. El gen de timidina quinasa (TK) es una región de inserción que puede usarse y está presente en muchos virus, tales como en todos los genomas de poxvirus examinados. Además, el MVA contiene 6 sitios de deleción naturales, cada uno de los cuales puede usarse como sitios de inserción (p. ej., deleción I, II, III, IV, V y VI; Ver, por ejemplo, la patente de los EE. UU. núm. 5.185.146 y patente de los EE. UU. núm. 6.440.442). Una o más regiones intergénicas (IGR) del MVA pueden usarse además como un sitio de inserción, tal como las IGR IGR07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137, e IGR 148/149 (ver, p. ej., la publicación de la patente internacional núm. 2018/0064803). Los sitios de inserción adecuados adicionales se describen en la publicación de la patente internacional núm. WO2005/048957.

Las partículas poxvirales recombinantes, tales como rMVA, se preparan como se describe en la técnica (Piccini, et al., 1987, Methods of Enzymology 153: 545-563; la patente de los EE. UU. núm. 4.769.330; la patente de los EE. UU. núm. 4.772.848; la patente de los EE. UU. núm. 4.603.112; la patente de los EE. UU. núm. 5.100.587 y la patente de los EE. UU núm. 5.179.993). En un método ilustrativo, la secuencia de ADN que se insertará en el virus puede colocarse en un constructo plásmido de E. coli en el que se ha insertado ADN homólogo a una sección de ADN del MVA. Por separado, la secuencia de ADN que se insertará puede ligarse a un promotor. El enlace promotor-gen se puede ubicar en el constructo plásmido de tal manera que el enlace promotor-gen esté flanqueado en ambos extremos por ADN homólogo a una secuencia de ADN que flanquea una región de ADN del MVA que contiene un locus no esencial. El constructo plásmido resultante puede amplificarse mediante la propagación dentro de bacterias de E. coli y aislarse. El plásmido aislado que contiene la secuencia génica de ADN que se insertará puede transfectarse en un cultivo celular, p. ej., de fibroblastos de embriones de pollo (CEF), al mismo tiempo que el cultivo se infecta con el MVA. La recombinación entre ADN de MVA homólogo en el plásmido y el genoma viral, respectivamente, puede generar un MVA modificado por la presencia de secuencias de ADN extrañas. Las partículas de rMVA pueden recuperarse del sobrenadante de cultivo o de las células cultivadas después de una etapa de lisis (p. ej., lisis química, congelamiento/descongelamiento, choque osmótico, sonicación y lo similar). Se pueden usar rondas consecutivas de purificación de placa para eliminar la contaminación del virus silvestre. Después, las partículas virales pueden

purificarse usando técnicas conocidas en la técnica (p. ej., métodos cromatográficos o ultracentrifugación en gradientes de sacarosa o cloruro de cesio).

En la presente descripción se proporciona un vector viral que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción, en donde el vector se deriva de MVA.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 16 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 17 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 18 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 20 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al

menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 21 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 22 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 23 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 24 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 25 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al

menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido de la SEQ ID NO: 27 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al

menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15.

En algunas modalidades, el vector de MVA comprende un polinucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

Moléculas de ARN autorreplicante

El ARN autorreplicante puede derivarse de alfavirus. Los alfavirus pueden pertenecer al grupo VEEV/EEEV, o al grupo SF, o al grupo SIN. Los ejemplos no limitantes de alfavirus del grupo SF incluyen virus del bosque Semliki, virus o'nyong-nyong, virus del río Ross, virus de Middelburg, virus de la Chikungunya, virus Barmah

Forest, virus Getah, virus Mayaro, virus Sagiyama, virus Bebaru y virus Una. Los ejemplos no limitantes de alfavirus del grupo SIN incluyen virus Sindbis, virus Girdwood S. A., arbovirus sudafricano núm. 86, virus Ockelbo, virus Aura, virus Babanki, virus Whataroa y virus Kyzylagach. Los ejemplos no limitantes de alfavirus del grupo VEEV/EEEV incluyen virus de la encefalitis equina del este (EEEV, por sus siglas en inglés), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV, por sus siglas en inglés), virus Everglades (EVEV), virus Mucambo (MUCV), virus Pixuna (PIXV), virus Middleburg (MIDV), virus de la Chikungunya (CHIKV), virus o'nyong-nyong (ONNV), virus del río Ross (RRV), virus Barmah Forest (BF), virus Getah (GET), virus Sagiyama (SAGV), virus Bebaru (BEBV), virus Mayaro (MAYV) y virus Una (UNAV).

La moléculas de ARN autorreplicante pueden derivarse de genomas de alfavirus, lo que significa que tienen algunas de las características de genomas de alfavirus, o similar a ellas. Las moléculas de ARN autorreplicante pueden derivarse de genomas de alfavirus modificados.

Las moléculas de ARN autorreplicante pueden derivarse del virus de la encefalitis equina del este (EEEV), virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV), virus Everglades (EVEV), virus Mucambo (MUCV), virus del bosque Semliki (SFV), virus Pixuna (PIXV), virus Middleburg (MIDV), virus de la Chikungunya (CHIKV), virus o'nyong-nyong (ONNV), virus del río Ross (RRV), virus Barmah Forest (BF), virus Getah (GET), virus Sagiyama (SAGV), virus Bebaru (BEBV), virus Mayaro (MAYV), virus Una (UNAV), virus Sindbis (SINV), virus Aura (AURAV), virus Whataroa (WHAV), virus Babanki (BABV), virus Kyzylagach (KYZV), virus de la encefalitis equina occidental (WEEV, por sus siglas en inglés), virus de Highland J (HJV, por sus siglas en inglés), virus Fort Morgan (FMV), virus Ndumu (NDUV) y virus Buggy Creek. Las cepas

de alfavirus virulentas y avirulentas son adecuadas. En algunas modalidades, el replicón de ARN del alfavirus es de un virus Sindbis (SIN), un virus del bosque Semliki (SFV), un virus del río Ross (RRV), un virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) o un virus de la encefalitis equina del este (EEEV).

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante derivada de alfavirus es un virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV).

Las moléculas de ARN autorreplicante pueden contener secuencias de ARN de (o secuencias de aminoácidos codificadas por) un genoma de alfavirus del Nuevo Mundo o del Viejo Mundo tipo silvestre. Cualquiera de las moléculas de ARN autorreplicante descritas en la presente descripción puede contener secuencias de ARN "derivadas de" o "basadas en" secuencias del genoma de alfavirus tipo silvestre, lo que significa que tienen al menos 60 % o al menos 65 % o al menos 68 % o al menos 70 % o al menos 80 % o al menos 85 % o al menos 90 % o al menos 95 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % o 100 % o 80-99 % o 90-100 % o 95-99 % o 95-100 % o 97-99 % o 98-99 % de identidad de secuencia con una secuencia de ARN (que puede ser una secuencia de ARN correspondiente) de un genoma de alfavirus de ARN silvestre, que puede ser un genoma de alfavirus del Nuevo Mundo o del Viejo Mundo tipo silvestre.

Las moléculas de ARN autorreplicante contienen toda la información genética requerida para dirigir su propia amplificación o autorreplicación dentro de una célula permisiva. Para dirigir su propia replicación, las moléculas de ARN autorreplicante codifican polimerasa, replicasa, u otras proteínas que pueden interactuar con las proteínas virales o derivadas de la célula huésped, ácidos nucleicos o ribonucleoproteínas para catalizar el proceso de amplificación del ARN; y contiene

secuencias de ARN que actúan en cis que son requeridas para la replicación y transcripción del ARN codificado por replicón. Por lo tanto, la replicación del ARN conduce a la producción de múltiples ARN secundarios. Estos ARN secundarios, así como los transcritos subgenómicos colineales, pueden traducirse para proporcionar expresión in situ de un gen de interés, o pueden transcribirse para proporcionar transcritos adicionales con el mismo sentido que el ARN suministrado que se traduce para proporcionar expresión in situ del gen de interés. Los resultados generales de esta secuencia de transcripciones son una enorme amplificación en el número de ARN del replicón introducidos y, por lo tanto, el gen codificado de interés se convierte en un producto polipeptídico principal de las células.

Hay dos marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) en el genoma de los alfavirus, genes estructurales y no estructurales (ns, por sus siglas en inglés). El ORF ns codifica proteínas (nsP1-nsP4) necesarias para la transcripción y replicación de ARN viral y se producen como una poliproteína y son la maquinaria de replicación del virus. El ORF estructural codifica tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside central y las proteínas sobre P62 y El que se asocian como un heterodímero. Las glicoproteínas de superficie ancladas a la membrana viral son responsables del reconocimiento del receptor y la entrada en las células diana a través de la fusión de membrana. Los cuatro genes de la proteína ns se codifican por genes en los dos tercios 5’ del genoma, mientras que las tres proteínas estructurales se traducen a partir de un ARNm subgenómico colineal con el tercio 3’ del genoma. En la Figura 18A se muestra una representación ilustrativa de un genoma de alfavirus.

Las moléculas de ARN autorreplicante pueden usarse como base para introducir secuencias extrañas en las células huésped reemplazando secuencias virales que codifican genes estructurales o insertando las secuencias extrañas 5’ o 3’ de las secuencias que codifican los genes estructurales. Pueden diseñarse por ingeniería para reemplazar los genes estructurales virales corriente abajo de la replicasa, que están bajo el control de un promotor subgenómico, por genes de interés (GOI), p. ej., el polinucleótido que codifica el polipéptido de la descripción. Tras la transfección, la replicasa que se traduce inmediatamente interactúa con los extremos 5’ y 3’ del ARN genómico y sintetiza copias de ARN genómico complementarias. Estas actúan como plantillas para la síntesis de nuevas copias genómicas de cadena positiva, con remate, y poliadeniladas, y de transcritos subgenómicos (Figura 18B). La amplificación eventualmente conduce a un número muy alto de copias de ARN de hasta 2×10^5 copias por célula. El resultado es una expresión uniforme y/o potenciada de un GOI (p. ej., un polinucleótido que codifica el polipéptido de la descripción) que puede afectar la eficacia de la vacuna o el impacto terapéutico de un tratamiento. Por lo tanto, las vacunas basadas en moléculas de ARN autorreplicante pueden dosificarse a niveles muy bajos debido a las muy altas copias de ARN generadas en comparación con el vector viral convencional. Uno de los valores significativos de las composiciones y métodos descritos en la presente es que la eficacia de la vacuna se puede aumentar en individuos que están en un estado crónico o agudo de la activación inmunitaria.

Las moléculas de ARN autorreplicantes de la descripción que comprenden el ARN que codifica los polipéptidos de CALR/JAK2 o epítopo 2 de JAK2 de la descripción pueden usarse como agentes terapéuticos al suministrarlos

a un sujeto que tiene neoplasias mieloproliferativas usando diversas tecnologías, que incluyen vectores virales, como se describe en la presente descripción u otras tecnologías de suministro como también se describe en la presente descripción.

La descripción proporciona una molécula de ARN autorreplicante que contiene toda la información genética necesaria para dirigir su propia amplificación o autorreplicación dentro de una célula permisiva.

La descripción también proporciona una molécula de ARN autorreplicante que puede usarse como base para introducir secuencias foráneas a células huésped (p. ej., los polipéptidos de CALR/JAK2 o el epítopo 2 de JAK2 de la descripción) mediante el reemplazo de secuencias virales que codifican genes estructurales.

En la presente descripción se proporciona un vector viral que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 16 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 17 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 18 o que tiene

al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 19 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 20 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 21 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 22 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 23 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 23.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 24 o que tiene

al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 24.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 25 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 25.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN derivada de un polinucleótido de la SEQ ID NO: 27 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de

identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID

NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia, o al menos 95 % de identidad de secuencia, o al menos 99 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

Cualquiera de las moléculas de ARN autorreplicante mencionadas anteriormente puede comprender además uno o más de los siguientes:

- uno o más genes no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4;
- al menos uno de un motivo DLP, una 5’ UTR, una 3’UTR y una poli A; y
- un promotor subgenómico.

En algunas modalidades, por ejemplo, la molécula de ARN autorreplicante puede comprender uno o más de los siguientes:

- uno o más genes no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4;
- al menos uno de un motivo DLP, una 5’ UTR, una 3’UTR y una poli A; y
- un promotor subgenómico; y
- un ARN que codifica aminoácidos de las sec. con núms. de ident.: 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 31, y unido operativamente al promotor subgenómico.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende una secuencia de ARN que codifica una proteína o péptido; regiones no traducidas de alfavirus 5’ y 3’; secuencias de ARN que codifican secuencias de aminoácidos derivadas de proteínas no estructurales de VEEV del alfavirus del Nuevo Mundo nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4; un promotor subgenómico que se enlaza operativamente y regula la traducción de la secuencia de ARN que codifica la proteína; un casquete 5’ y una cola de poli-A 3’; ARN monocatenario codificante; un DLP del virus Sindbis corriente arriba de la proteína no estructural 1 (nsP1); un elemento de salto de ribosoma 2A; y una repetición de nucleótidos nsp1 corriente abajo de 5’-UTR y corriente arriba de la DLP.

En algunas modalidades, las molécula de ARN autorreplicante puede tener un tamaño de al menos 1 kb o al menos 2 kb o al menos 3 kb o al menos 4 kb o al menos 5 kb o al menos 6 kb o al menos 7 kb o al menos 8 kb o al menos 10 kb o al menos 12 kb o al menos 15 kb o al menos 17 kb o al menos 19 kb o al menos 20 kb, o puede tener un tamaño de 100 pb-8 kb o 500 pb-8 kb o 500 pb-

7 kb o 1-7 kb o 1-8 kb o 2-15 kb o 2-20 kb o 5-15 kb o 5-20 kb o 7-15 kb o 7-18 kb o 7-20 kb.

Cualquiera de las moléculas de ARN autorreplicante descritas anteriormente puede incluir además una secuencia codificante para un péptido de autoproteasa (p. ej., péptido de autoescisión autocatalítico), donde la secuencia codificante de la autoproteasa se enlaza opcionalmente de manera operativa corriente arriba a la segunda secuencia de ácido nucleico.

Generalmente, cualquier sitio de escisión proteolítica conocida en la técnica puede incorporarse a las moléculas de ácido nucleico de la descripción y pueden ser, por ejemplo, secuencias de escisión proteolítica que se escinden después de la producción por una proteasa. Otros sitios de escisión proteolítica adecuados también incluyen secuencias de escisión proteolítica que pueden escindirse tras la adición de una proteasa externa. Como se usa en la presente descripción, el término "autoproteasa" se refiere a un péptido "autoescindible" que posee actividad autoproteolítica y es capaz de escindirse a sí mismo de una entidad polipeptídica más grande. Identificado por primera vez en el virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FMDV, por sus siglas en inglés), un miembro del grupo de picornavirus, se han identificado posteriormente varias autoproteasas como, por ejemplo, péptidos "similar a 2A" del virus de la rinitis A equina (E2A), teschovirus porcino 1 (P2A) y virus de Thosea asigna (T2A), y sus actividades en la escisión proteolítica se han demostrado en varios sistemas eucariotas ex vitro e in vivo. Como tal, el concepto de autoproteasa está disponible para un experto en la técnica puesto que se han identificado muchos sistemas naturales de autoproteasa. Los sistemas de autoproteasa bien estudiados son, p. ej., proteasas virales, proteínas

de desarrollo (p. ej., HetR, proteínas Hedgehog), dominio de autoproteasa RumA, UmuD, etc.). Los ejemplos no limitantes de péptidos de autoproteasa adecuados para las composiciones y métodos de la presente descripción incluyen las secuencias de péptidos del teschovirus porcino 1 2A (P2A), un virus de la fiebre aftosa (FMDV) 2A (F2A), un virus de rinitis equina (ERAV) 2A (E2A), un virus de Thosea asigna 2A (T2A), un virus de poliedrosis citoplasmática 2A (BmCPV2A), un virus de flacherie 2A (BmIFV2A), o una combinación de estos.

En algunas modalidades, la secuencia codificante del péptido autoproteasa se enlaza operativamente corriente abajo del motivo DLP, y corriente arriba del primer y segundo polinucleótidos.

En algunas modalidades, el péptido autoproteasa comprende, o consiste en, una secuencia peptídica seleccionada del grupo que consiste en teschovirus porcino 1 2A (P2A), un virus de la fiebre aftosa (FMDV) 2A (F2A), un virus de rinitis equina (ERAV) 2A (E2A), un virus de Thosea asigna 2A (T2A), un virus de la poliedrosis citoplasmática 2A (BmCPV2A), un virus de flacherie 2A (BmIFV2A), y una combinación de estos. En algunas modalidades, el péptido autoproteasa incluye una secuencia peptídica de teschovirus porcino 1 2A (P2A).

En algunas modalidades, el péptido autoproteasa se selecciona del grupo que consiste en teschovirus-1 porcino 2A (P2A), virus de la fiebre aftosa (FMDV) 2A (F2A), virus de rinitis equina (ERAV) 2A (E2A), virus de Thosea asigna 2A (T2A), virus de la poliedrosis citoplasmática 2A (BmCPV2A), virus de flacherie 2A (BmIFV2A), y una combinación de estos.

En algunas modalidades, el péptido autoproteasa es teschovirus porcino 1 2A (P2A).

La incorporación del péptido P2A en los replicones de ARN viral modificado de la presente descripción permite la liberación de la proteína codificada por GOI (p. ej., polipéptido de CALR-JAK2 o del epítopo 2 de JAK2 de la descripción) a partir de la fusión de cápside-GOI.

En algunas modalidades descritas en la presente descripción, la secuencia del péptido teschovirus porcino 1 2A (P2A) se diseña por ingeniería en marco inmediatamente después de la secuencia de DLP y en marco inmediatamente corriente arriba de todos los GOI.

Cualquiera de las moléculas de ARN autorreplicante descritas anteriormente puede incluir además un motivo de bucle corriente abajo (DLP) de secuencia codificante.

Algunos virus tienen secuencias capaces de formar una o más estructuras de tallo-bucle que regulan, por ejemplo, incrementar la expresión del gen de cápside. El potenciador de cápside viral, como se usa en la presente descripción, se refiere a un elemento regulador que comprende secuencias capaces de formar tales estructuras de tallo-bucle. En algunos ejemplos, las estructuras de tallo-bucle se forman por secuencias dentro de la secuencia codificante de una proteína de cápside y se denominan secuencia de bucle descendente (DLP). Como se describe en la presente descripción, estas estructuras de tallo-bucle o variantes de estas pueden usarse para regular, por ejemplo incrementar, el nivel de expresión de genes de interés. Por ejemplo, estas estructuras de tallo-bucle o variantes de estas pueden usarse en un vector recombinante (p. ej., en un genoma viral heterólogo) para potenciar la transcripción y/o traducción de la secuencia codificante enlazada operativamente corriente abajo a esta.

Se sabe que la replicación del alfavirus en células huésped induce la proteína quinasa dependiente de ARN bicatenaria (PKR). PKR fosforila el factor de iniciación de la traducción eucariota 2α (eIF2α). La fosforilación de eIF2α bloquea el inicio de la traducción de ARNm y, al hacerlo, evita que los virus completen un ciclo de replicación productivo. La infección de células con virus Sindbis induce PKR que da como resultado la fosforilación de eIF2α, pero el ARNm subgenómico viral se traduce eficientemente mientras se restringe la traducción de todos los demás mARN celulares. La traducción eficiente del ARNm subgenómico viral en el virus Sindbis es posible mediante la presencia de un bucle de horquilla de ARN estable (o motivo DLP) ubicado corriente abajo del codón iniciador AUG de tipo silvestre para la proteína de la cápside del virus (por ejemplo, potenciador de la cápside). Se ha reportado que la estructura de DLP puede detener un ribosoma en el AUG tipo silvestre y esto apoya la traducción del ARNm subgenómico sin el requisito de eIF2α funcional. Por lo tanto, los ARNm subgenómicos de virus Sindbis (SINV) así como de otros alfavirus se traducen efectivamente incluso en células que tienen PKR altamente activa, lo que resulta en la fosforilación completa de eIF2α.

La estructura de DLP se caracterizó primero en el ARNm del virus Sindbis (SINV) 26S y también se detectó en el virus del bosque Semliki (SFV). Se ha informado de la presencia de estructuras de DLP similares en al menos otros 14 miembros del género alfavirus, que incluye miembros del Nuevo Mundo (por ejemplo, MAYV, UNAV, EEEV (NA), EEEV (SA), AURAV) y Viejo Mundo (SV, SFV, BEBV, RRV, SAG, GETV, MIDV, CHIKV y ONNV). Las estructuras previstas de estos ARNm de Alphavirus 26S se construyeron en base a datos de SHAPE (acilación de

2’-hidroxilo selectiva y extensión del cebador) (Toribio et al., Nucleic Acids Res. Mayo 19; 44(9):4368-80, 2016), cuyo contenido se incorpora en la presente por referencia). Se detectaron estructuras estables de tallo-bucle en todos los casos excepto por CHIKV y ONNV, mientras que MAYV y EEEV mostraron DLP de menor estabilidad (Toribio et al., 2016 supra). Las actividades más altas de DLP se informaron para aquellos alfavirus que contenían las estructuras de DLP más estables.

Como un ejemplo, los miembros del género alfavirus pueden resistir la activación de la proteína quinasa activada por ARN antiviral (PKR) por medio del bucle corriente abajo (DLP) presente en las transcripciones virales 26S, lo que permite un inicio de traducción independiente de eIF2 de estos ARNm. El bucle corriente abajo (DLP) se encuentra corriente abajo del AUG en el ARNm de SINV 26S y en otros miembros del género alfavirus.

En algunas modalidades, las moléculas de ácido nucleico de la descripción pueden incluir una secuencia codificante para un gen de interés (GOI) operativamente enlazado a motivo(s) DLP y/o la secuencia codificante para los motivos DLP.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante de la descripción comprende un bucle corriente abajo (DLP).

En algunas modalidades, el bucle corriente abajo (DLP) comprende al menos un bucle de tallo de ARN.

En algunos casos, la actividad de DLP depende de la distancia entre el motivo DLP y el codón de iniciación AUG (AUGi). La separación AUG-DLP en los ARNm de alfavirus 26S se ajusta a la topología de la región ES6S del ARNr 18S ribosómico de una manera que permite la colocación del AUGi en el sitio P de la

subunidad 40S bloqueada por el DLP, lo que permite la incorporación de Met-tRNA sin la participación de eIF2. En el caso del virus Sindbis, el motivo DLP se encuentra en el primer 150 nt del ARN subgenómico de Sindbis. La horquilla se ubica corriente abajo del codón de iniciación AUG de la cápside de Sindbis (AUG en el nt 50 del ARN subgenómico de Sindbis) y da como resultado el estancamiento de un ribosoma de tal manera que se usa el gen de la cápside AUG correcto para iniciar la traducción. Estudios anteriores de comparaciones de secuencias y análisis de ARN estructural revelaron la conservación evolutiva de DLP en SINV y predijeron la existencia de estructuras de DLP equivalentes en muchos miembros del género Alphavirus (ver, por ejemplo, Ventoso, J. Virol. 9484-9494, vol. 86, setiembre de 2012).

Sin estar ligado a ninguna teoría en particular, se cree que colocar el motivo DLP corriente arriba de una secuencia codificante para cualquier GOI típicamente da como resultado una proteína de fusión de aminoácidos de la cápside N-terminal que se codifican en la región de la horquilla para la proteína codificada por GOI porque la iniciación ocurre en la cápside AUG, no en el AUG de GOI.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende un bucle corriente abajo colocado corriente arriba de la proteína no estructural 1 (nsP1).

En algunas modalidades, el bucle corriente abajo se coloca corriente arriba de la proteína no estructural 1 (nsP1) y se vinculan a la nsP1 por un elemento de omisión de ribosoma de teschovirus porcino 1 2A (P2A).

El ARN autorreplicante que contiene DLP de la descripción puede ser útil para conferir resistencia al sistema inmunológico innato en un sujeto. Los

replicones de ARN sin modificar son sensibles al estado inicial del sistema inmunológico innato de las células en las que se introducen. Si las células/individuos se encuentran en un estado del sistema inmunológico innato altamente activo, el rendimiento del replicón de ARN (p. ej., replicación y expresión de un GOI) puede verse afectado negativamente. Mediante diseño por ingeniería de un DLP para controlar el inicio de la traducción de proteínas, particularmente de proteínas no estructurales, se elimina o disminuye el impacto del estado de activación preexistente del sistema inmunológico innato para influir en la replicación eficiente del replicón de ARN. El resultado es una expresión más uniforme y/o potenciada de un GOI que puede afectar la eficacia de la vacuna o el impacto terapéutico de un tratamiento.

El motivo DLP del ARN autorreplicante de la descripción puede conferir una traducción de ARNm eficiente en entornos celulares donde se inhibe la traducción de ARNm celular. Cuando un DLP se enlaza con la traducción de genes de proteínas no estructurales de un vector replicón, las proteínas replicasa y transcriptasa son capaces de iniciar la replicación funcional en entornos celulares activados por PKR. Cuando un DLP se enlaza con la traducción de ARNm subgenómicos, es posible una expresión robusta de GOI incluso cuando el ARNm celular está restringido debido a la activación inmune innata. En consecuencia, la ingeniería de ARN autorreplicante que contiene estructuras de DLP para ayudar a impulsar la traducción de genes de proteínas no estructurales y ARNm subgenómicos proporciona una forma poderosa de superar la activación inmune innata.

Se describen ejemplos de un vector de ARN autorreplicante que comprende un motivo DLP en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núm.

US2018/0171340 y la publicación de solicitud de patente internacional WO2018106615, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

Cualquiera de las moléculas de ARN autorreplicante descritas anteriormente puede comprender además genes no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y/o nsP4. En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante no codifica proteína estructural viral funcional.

Los genomas de alfavirus codifican proteínas no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, que se producen como un único precursor de poliproteína, a veces denominado P1234 (o nsP1-4 o nsP1234), y que se escinde en las proteínas maduras mediante el procesamiento proteolítico (Figura 18B). nsP1 puede tener un tamaño de aproximadamente 60 kDa y puede tener actividad metiltransferasa y se involucra en la reacción de protección viral. nsP2 tiene un tamaño de aproximadamente 90 kDa y puede tener actividad helicasa y proteasa, mientras que nsP3 tiene aproximadamente 60 kDa y contiene tres dominios: un macrodominio, un dominio central (o alfavirus único) y un dominio hipervariable (HVD). nsP4 tiene un tamaño de aproximadamente 70 kDa y contiene el dominio catalítico de la ARN polimerasa (RdRp) dependiente de ARN del núcleo. Después de la infección, el ARN genómico del alfavirus se traduce para producir una poliproteína P1234, que se escinde en las proteínas individuales.

Los genomas de alfavirus también codifican tres proteínas estructurales: la proteína C de la nucleocápside central, y las proteínas de la envoltura P62 y E1 que se asocian como un heterodímero. Las proteínas estructurales están bajo el

control de un promotor subgenómico y pueden reemplazarse por genes de interés (GIO).

En algunas modalidades de la presente descripción, el ARN autorreplicante puede carecer (o no contener) la(s) secuencia(s) de al menos una (o todas) de las proteínas virales estructurales (p. ej., proteína C de nucleocápside y proteínas de cubierta P62, 6K y E1). En estas modalidades, las secuencias que codifican uno o más genes estructurales pueden sustituirse con una o más secuencias, tales como, por ejemplo, una secuencia codificante para al menos una proteína o un péptido (u otro gen de interés (GOI)), p. ej., polipéptidos de CALR/JAK2 o polipéptidos del epítopo 2 de JAK2 de la descripción.

En algunas modalidades, el ARN autorreplicante carece de secuencias que codifican proteínas estructurales de alfavirus; o no codifican proteínas estructurales de alfavirus (u, opcionalmente, cualquier otra). En algunas modalidades, las moléculas de ARN autorreplicante están desprovistas además de una parte o de la región codificante completa para una o más proteínas estructurales virales. Por ejemplo, el sistema de expresión de alfavirus puede estar desprovisto de una porción o de la secuencia codificante completa para una o más de la proteína C de la cápside viral, la glicoproteína E1, la glicoproteína E2, la proteína E3 y la proteína 6K.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante no contiene secuencias codificantes para al menos una de las proteínas virales estructurales. En estos casos, las secuencias que codifican genes estructurales pueden sustituirse con una o más secuencias tal como, por ejemplo, una

secuencia codificante para un GOI, p. ej., polipéptidos de CALR/JAK2 o polipéptidos del epítopo 2 de JAK2 de Figura 18 de la descripción.

La descripción también proporciona una molécula de ARN autorreplicante que comprende los genes no estructurales nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4, y en donde la molécula de ARN autorreplicante no codifica una proteína estructural viral funcional.

En algunas modalidades, la descripción proporciona una molécula de ARN autorreplicante que comprende la secuencia codificante de al menos una, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro proteínas virales no estructurales (p. ej., nsP1, nsP2, nsP3, nsP4). Las proteínas nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 codificadas por el replicón son proteínas funcionales o biológicamente activas.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante incluye la secuencia codificante de una porción de la al menos una proteína viral no estructural. Por ejemplo, las moléculas de ARN autorreplicante pueden incluir aproximadamente 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % o un rango entre cualquiera de los dos de estos valores de la secuencia codificante de la al menos una proteína viral no estructural. En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante puede incluir la secuencia codificante de una porción sustancial de la al menos una proteína viral no estructural. Como se usa en la presente descripción, una “porción sustancial” de una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína viral no estructural comprende suficiente secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína viral no estructural para permitir la identificación putativa de esa proteína, ya sea por evaluación manual de la secuencia por un experto en la técnica, o mediante comparación e identificación de secuencias automatizadas por computadora

usando algoritmos como BLAST (ver, por ejemplo, en "Basic Local Alignment Search Tool"; Altschul S F et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1993).

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante puede incluir la secuencia codificante completa para la al menos una proteína no estructural. En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende sustancialmente toda la secuencia codificante de las proteínas no estructurales virales nativas. En ciertas modalidades, una o más proteínas virales no estructurales se derivan del mismo virus.

En algunas modalidades, el bucle corriente abajo de DLP de la molécula de ARN autorreplicante ubicada corriente arriba de la proteína no estructural 1(nsP1) se deriva de Sindbis virus.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende secuencias nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 derivadas del virus de la encefalitis equina venezolana (VEEV) y un motivo DLP derivado del virus Sindbis (SIN).

En algunas modalidades, las moléculas de ARN autorreplicante también tienen una subsecuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de un macrodominio de alfavirus nsP3 y una subsecuencia de ARN que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de un dominio central de alfavirus nsP3. Las moléculas de ARN autorreplicante también pueden tener una subsecuencia de ARN que codifique una secuencia de aminoácidos derivada completamente de un dominio hipervariable de nsP3 de alfavirus del Viejo Mundo; o puede tener una secuencia de aminoácidos que tiene una porción derivada de un dominio hipervariable de alfavirus nsP3 del Nuevo Mundo, y una porción derivada de un dominio hipervariable de alfavirus nsP3 del Viejo Mundo, es decir, el dominio

hipervariable (HVD) puede ser una secuencia híbrida o quimérica del Nuevo Mundo/Viejo Mundo.

En algunas modalidades, las moléculas de ARN autorreplicante pueden tener una secuencia de ARN que codifica secuencias de aminoácidos derivadas de secuencias de proteínas nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4 de alfavirus del Nuevo Mundo tipo silvestre. En otras modalidades, una o más proteínas no estructurales derivan de diferentes virus.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante puede tener una secuencia de ARN que codifica un macro dominio nsP3 derivado de un alfavirus silvestre nsP3, y un dominio central nsP3 derivado de un alfavirus silvestre nsP3. En diversas modalidades, el(los) macrodominio(s) y el(los) dominio(s) central(es) pueden derivarse ambos de un alfavirus nsP3 del Nuevo Mundo tipo silvestre o ambos pueden derivarse de una proteína nsP3 de alfavirus del Viejo Mundo tipo silvestre. En otras modalidades, el macrodominio puede derivarse de un macrodominio de alfavirus del Nuevo Mundo tipo silvestre y el dominio central puede derivarse de un dominio central de alfavirus del Viejo Mundo tipo silvestre, o viceversa. Los diversos dominios pueden ser de cualquier secuencia descrita en la presente descripción.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante contiene proteínas no estructurales de VEEV nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4.

La evidencia experimental acumulada ha demostrado que la replicación/amplificación de VEEV y otros genomas de alfavirus y sus ARN de interferencia defectuosos (DI, por sus siglas en inglés) se determina por tres elementos promotores: (i) el elemento de secuencia terminal de 3’ (CSE 3’) conservado y la siguiente cola poli(A); (ii) la 5’-UTR, que funciona como un

elemento promotor clave para la síntesis de ARN de cadena positiva y negativa; y (iii) el elemento de secuencia conservada de 51-nt (CSE de 51-nt), que se ubica en la secuencia que codifica nsP1 y funciona como un potenciador de la replicación del genoma del alfavirus (Kim et al., PNAS, 2014, 111: 10708–10713, y las referencias en este).

Cualquiera de las moléculas de ARN autorreplicante descritas anteriormente puede incluir además una región no traducida no modificada 5’ (5’-UTR).

Los estudios previos han demostrado que durante las infecciones por virus de VEEV y Sindbis, solo una pequeña porción de las proteínas no estructurales virales (nsP) se colocaliza con intermediarios de replicación de ARNbc. Por lo tanto, parece que una gran fracción de nsP no están implicadas en la replicación de ARN (Gorchakov R, et al. (2008) Una nueva función para la escisión de poliproteína ns en replicación del virus Sindbis. J Virol 82(13):6218–6231). Esto ha proporcionado una oportunidad para explotar las proteínas ns infrausadas para la amplificación de los ARN subgenómicos que codifican proteínas de interés, que normalmente se transcriben a partir del promotor subgenómico y no se amplifica adicionalmente

En algunas modalidades, un fragmento del nsP1 de la molécula de ARN autorreplicante de la descripción se duplica corriente abajo de la 5’-UTR y corriente arriba de la DLP.

En algunas modalidades, los primeros 193 nucleótidos de nsP1 se duplican corriente abajo de la 5’-UTR y corriente arriba de la DLP.

En alguna modalidad, una molécula de ARN autorreplicante comprende una región no traducida modificada 5’ (5’-UTR). Por ejemplo, la 5’-UTR modificada

puede comprender una o más sustituciones de nucleótidos en la posición 1, 2, 4 o una combinación de estos. Preferentemente, la 5’-UTR modificada comprende una sustitución de nucleótidos en la posición 2, con mayor preferencia, la 5’-UTR modificada tiene una sustitución U->G en la posición 2. Se describen ejemplos de tales moléculas de ARN autorreplicante en la publicación de solicitud de patente de los EE. UU. núm. US2018/0104359 y la publicación de solicitud de patente internacional núm. WO2018075235, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.

En algunas modalidades, las UTR pueden ser secuencias de UTR de alfavirus del Nuevo Mundo o del Viejo Mundo tipo silvestre, o una secuencia derivada de cualquiera de ellas. La 5’-UTR’ puede tener cualquier longitud adecuada, tales como aproximadamente 60 nt o 50-70 nt o 40-80 nt. En algunas modalidades, la 5’-UTR también puede tener estructuras primarias o secundarias conservadas (p. ej., uno o más tallo-bucles) y puede participar en la replicación del alfavirus o del replicón de ARN. La 3’-UTR puede tener hasta varios cientos de nucleótidos, por ejemplo, puede ser 50-900 o 100-900 o 50-800 o 100-700 o 200 nt - 700 nt. El 3’-UTR también puede tener estructuras secundarias, p. ej., un bucle escalonado, y puede ir seguido de un tracto de poliadenilato o una cola poli-A.

Las regiones no traducidas 5’ y 3’ pueden enlazarse operativamente a cualquiera de las otras secuencias codificadas por el replicón. Las UTR pueden enlazarse operativamente a un promotor y/o secuencia que codifica una proteína o péptido proporcionando secuencias y separación necesarias para el reconocimiento y transcripción de las otras secuencias codificadas.

El GOI, p. ej., los polinucleótidos de CALR/JAK2 o del epítopo 2 de JAK2 de la descripción se pueden expresar bajo el control de un promotor subgenómico. En determinadas modalidades, en lugar del promotor subgenómico nativo, el ARN subgenómico puede colocarse bajo el control del sitio de entrada del ribosoma interno (IRES, por su siglas en inglés) derivado del virus de la encefalomiocarditis (EMCV), virus de la diarrea viral bovina (BVDV), poliovirus, virus de la enfermedad de fiebre aftosa (FA), enterovirus 71, o virus de la hepatitis C. Los promotores subgenómicos varían de 24 nucleótidos (virus Sindbis) a más de 100 nucleótidos (virus de la rizomanía de la remolacha) y usualmente se encuentran corriente arriba del inicio de la transcripción.

Las moléculas de ARN autorreplicante pueden tener una cola poli-A 3'. También puede incluir una secuencia de reconocimiento de polimerasa poli-A (p. ej., AAUAAA) cerca de su extremo 3'.

En aquellos casos donde la molécula de ARN autorreplicante debe empaquetarse en una partícula de alfavirus recombinante, puede contener una o más secuencias, las denominadas señales de empaquetamiento, que sirven para iniciar interacciones con proteínas estructurales de alfavirus que conducen a la formación de partículas. En algunas modalidades, las partículas de alfavirus comprenden ARN derivadas de uno o más alfavirus; y proteínas estructurales en donde al menos una de dichas proteínas estructurales se deriva de dos o más alfavirus.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante comprende un vector derivado de VEEV en donde las proteínas virales estructurales (p. ej., proteína de nucleocápside C y proteínas de envoltura P62, 6K y E1) se eliminan y

se reemplazan por la secuencia codificante de CARL.JAK2 o los polipéptidos del epítopo 2 de JAK2 de la descripción.

Otros vectores virales y virus recombinantes

El vector viral que comprende el polinucleótido de la descripción puede derivarse de otros vectores virales que incluyen vectores derivados de virus humanos asociados a adeno, tales como AAV-2 (virus asociados a adeno tipo 2). Una característica atractiva de los vectores AAV es que no expresan ningún gen viral. Las únicas secuencias de ADN viral incluidas en los vectores AAV son las repeticiones terminales invertidas (ITR) de 145 pb. Por lo tanto, como en la inmunización con ADN desnudo, el único gen expresado es el del antígeno, o antígeno quimérico. Adicionalmente, se conoce que los vectores AAV transducen tanto las células divisorias como las no divisorias, tales como las células dendríticas derivadas de monocitos de sangre periférica humana, con expresión transgénica persistente, y con la posibilidad de administración oral e intranasal para la generación de inmunidad de la mucosa. Además, la cantidad de ADN requerido parece ser mucho menor por varios órdenes de magnitud, con respuestas máximas a las dosis de 10^{10} a 10^{11} partículas o copias de ADN, a diferencia de dosis de ADN desnudo de 50 µg o aproximadamente 10^{15} copias. Los vectores AAV se empaquetan mediante la cotransfección de una línea celular adecuada (p. ej., células 293 humanas) con el ADN contenido en la proteína quimérica ITR de AAV que codifica constructos y un plásmido cooperador ACG2 de AAV que contiene la región codificante de AAV (genes rep y cap de AAV) sin los ITR. Posteriormente, las células se infectan con el adenovirus Ad5. Los vectores pueden purificarse a partir de lisados celulares usando métodos conocidos en la técnica (p. ej.,

tal como ultracentrifugación de gradiente de densidad de cloruro de cesio) y se validan para asegurar que están libres de AAV o adenovirus competentes de replicación detectable (p. ej., mediante un bioensayo de efecto citopático).

El vector viral que comprende el polinucleótido de la descripción también incluye vectores retrovirales. Los retrovirus son una clase de virus integrativos que se replican usando una transcriptasa inversa codificada por virus, para replicar el genoma de ARN viral en ADN bicatenario que se integra en ADN cromosómico de las células infectadas (p. ej., células diana). Tales vectores incluyen los derivados de virus de leucemia murina, especialmente Moloney (Gilboa, et al., 1988, Adv. Exp. Med. Biol. 241: 29) o cepas FB29 de Friend (publicación de la patente internacional núm. WO1995/01447). Generalmente, un vector retroviral se elimina de la totalidad o parte de los genes virales gag, pol y env y retiene LTR 5' y 3' y una secuencia de encapsidación. Estos elementos pueden modificarse para aumentar el nivel de expresión o estabilidad del vector retroviral. Tales modificaciones incluyen el reemplazo de la secuencia de encapsidación retroviral por uno de un retrotransposón tal como VL30 (ver, p. ej., patente de los EE. núm. 5.747.323).

Los polinucleótidos que codifican el polipéptido de la descripción pueden insertarse corriente abajo de la secuencia de encapsidación, tal como en dirección opuesta en relación con el genoma retroviral. Las partículas retrovirales se preparan en presencia de un virus cooperador o en una línea celular de complementación adecuada (empaquetado) que contiene integrados en su genoma los genes retrovirales para los cuales el vector retroviral es defectuoso (p. ej., gag/pol y env). Tales líneas celulares se describen en la técnica anterior (Miller and Rosman, 1989, BioTechniques 7: 980; Danos and Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85

6460; Markowitz, et al., 1988, Virol. 167: 400). El producto del gen env es responsable de la unión de la partícula viral a los receptores virales presentes en la superficie de la célula diana y, por lo tanto, determina el rango huésped de la partícula retroviral. La línea celular de empaque, tal como las células PA317 (ATCC CRL 9078) o 293EI6 (W097/35996) que contienen una proteína envolvente amfotrópica puede usarse, por lo tanto, para permitir la infección de las células diana humanas y de otras especies. Las partículas retrovirales se recuperan del sobrenadante del cultivo y, opcionalmente, pueden purificarse adicionalmente de acuerdo con técnicas estándar (p. ej., cromatografía, ultracentrifugación).

Elementos reguladores

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos de la descripción pueden unirse operativamente a uno o más elementos reguladores en el vector. Los elementos reguladores pueden comprender promotores, potenciadores, señales de poliadenilación, represores y lo similar. Como se usa en la presente descripción, el término "enlazado operativamente" debe tomarse en su contexto razonable más amplio y se refiere a un enlace de elementos polinucleotídicos en una relación funcional. Un polinucleótido se "enlaza operativamente" cuando se coloca en una relación funcional con otro polinucleótido. Por ejemplo, un promotor se enlaza operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia codificante.

Algunos de los potenciadores y secuencias promotoras comúnmente usados en vectores de expresión y vectores virales son, por ejemplo, el citomegalovirus humano (hCMV), el promotor temprano/tardío de vaccinia P7.5, los promotores CAG,

SV40, CMV de ratón (mCMV), EF-l y hPGK. Debido a su alta potencia y tamaño moderado de aproximadamente 0,8 kB, el promotor de hCMV es uno de los más usados comúnmente de estos promotores. El promotor hPGK se caracteriza por un tamaño pequeño (ca. 0,4 kB), pero es menos potente que el promotor de hCMV. Por otra parte, el promotor CAG que consiste en un elemento potenciador temprano de citomegalovirus, promotor, primer exón e intrón del gen beta-actina de pollo, y aceptor de empalme del gen beta-globina de conejo, puede dirigir una expresión génica muy potente comparable con el promotor hCMV, pero su tamaño grande lo hace menos adecuado en vectores virales donde las limitaciones de espacio pueden ser una preocupación significativa, p. ej., en vectores adenovirales (AdV), vectores virales adenoasociados (AAV) o vectores lentivirales (LV).

Los promotores adicionales que pueden usarse son el promotor temprano principal inmediato de Aotine Herpesvirus 1 (promotor AoHV-1) descrito en la publicación de la patente internacional núm. WO2018/146205. El promotor se puede acoplar operativamente a una secuencia operadora represora a la cual se puede unir una proteína represora para reprimir la expresión del promotor en presencia de la proteína represora. En ciertas modalidades, la secuencia operadora represora es una secuencia TetO o una secuencia CuO (ver, p. ej., patente US9790256).

En ciertos casos, puede ser deseable expresar al menos dos polipéptidos separados del mismo vector. En este caso, cada polinucleótido puede unirse operativamente al mismo o diferente promotor y/o secuencias potenciadoras, o pueden usarse sistemas de expresión bicistrónica muy conocidos, por ejemplo, usando el sitio de entrada interno al ribosoma (IRES, por sus siglas en inglés) del

virus de la encefalomiocarditis. Alternativamente, pueden usarse promotores sintéticos bidireccionales, tales como un promotor de hCMV-rhCMV y otros promotores descritos en la publicación de la patente internacional núm. WO2017/220499. Las señales de poliadenilación pueden derivarse de SV40 u hormona de crecimiento bovino (BGH, por sus siglas en inglés).

Los vectores de ARN autorreplicante que comprenden el polinucleótido que codifica el polipéptido de la descripción pueden comprender además cualquier elemento regulador para establecer función(es) convencional(es) del vector, que incluyen, peor no se limitan a, la replicación y expresión del polipéptido de la descripción codificada por la secuencia del polinucleótido del vector. Los elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a, un promotor, un potenciador, una señal de poliadenilación, codón de terminación de la traducción, un elemento de unión al ribosoma, un terminador de la transcripción, marcadores de selección, origen de replicación, etc. Un vector puede comprender uno o más casetes de expresión. Un "casete de expresión" es parte de un vector que dirige la maquinaria celular para producir ARN y proteína. Un casete de expresión comprende típicamente tres componentes: una secuencia promotora, un marco de lectura abierto, una región no traducida (RNT) 3' que comprende, opcionalmente, una señal de poliadenilación. Un marco de lectura abierto (ORF) es un marco de lectura que contiene una secuencia codificante de una proteína de interés (p. ej., los polipéptidos de la descripción) desde un codón de iniciación hasta un codón de terminación. Los elementos reguladores del casete de expresión pueden enlazarse operativamente a una secuencia de polinucleótidos que codifica los polipéptidos de interés. Cualquier componente adecuado para usar en un casete de expresión descrito en la presente descripción

puede usarse en cualquier combinación y en cualquier orden para preparar vectores de la solicitud.

El vector puede comprender una secuencia promotora, preferentemente dentro de un casete de expresión, para controlar la expresión de los polipéptidos de la descripción. El término "promotor" se usa en su sentido convencional y se refiere a una secuencia de nucleótidos que inicia la transcripción de una secuencia de nucleótidos unida operativamente. Un promotor se ubica en la misma cadena cerca de la secuencia de nucleótidos que transcribe. Los promotores pueden ser constitutivos, inducibles o reprimibles. Los promotores pueden ser de origen natural o sintéticos. Un promotor puede derivarse de fuentes que incluyen virus, bacterias, hongos, plantas, insectos y animales. Un promotor puede ser un promotor homólogo (es decir, derivado de la misma fuente genética que el vector) o un promotor heterólogo (es decir, derivado de un vector o fuente genética diferente). Preferentemente, el promotor se ubica corriente arriba del polinucleótido que codifica los polipéptidos de la descripción dentro de un casete de expresión. Por ejemplo, en un ARN autorreplicante, el promotor puede ser un promotor subgenómico para el alfavirus.

En un ARN autorreplicante, el vector puede comprender además secuencias de polinucleótidos adicionales que estabilizan el transcrito expresado, potencian la exportación nuclear del transcrito de ARN y/o mejoran el acoplamiento de la transcripción-traducción. Los ejemplos de tales secuencias incluyen señales de poliadenilación y secuencias potenciadoras. Una señal de poliadenilación se ubica típicamente corriente abajo de la secuencia codificante para una proteína de interés (p. ej., los polipéptidos de la descripción) dentro de un casete de expresión del

vector. Las secuencias potenciadoras son secuencias de ADN reguladoras que, cuando se unen por factores de transcripción, potencian la transcripción de un gen asociado. Una secuencia potenciadora se ubica preferentemente corriente arriba de la secuencia de polinucleótidos que codifica los polipéptidos de la descripción, pero corriente abajo de una secuencia promotora dentro de un casete de expresión del vector.

Puede usarse cualquier secuencia potenciadora conocida por los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

Cualquiera de los componentes o secuencias del vector de ARN autorreplicante de la descripción puede unirse funcional u operativamente a cualquier otro de los componentes o secuencias. Los componentes o secuencias de la molécula de ARN autorreplicante pueden enlazarse operativamente para la expresión de al menos una proteína o péptido (o bioterapéutico) en una célula huésped u organismo tratado y/o para la capacidad de autorreplicación del replicón.

Un promotor o UTR enlazado operativamente a una secuencia codificante es capaz de efectuar la transcripción y expresión de la secuencia codificante cuando están presentes las enzimas adecuadas. No es necesario que el promotor sea contiguo a la secuencia codificante, siempre que funcione para dirigir la expresión de esta. Por lo tanto, un enlace operable entre una secuencia de ARN que codifica una proteína o péptido y una secuencia reguladora (por ejemplo, un promotor o UTR) es un enlace funcional que permite la expresión del polinucleótido de interés. Operativamente enlazado también puede referirse a secuencias tales como las secuencias que codifican RdRp (p. ej., nsP4), nsP1-4, las UTR, promotores y otras

secuencias que codifican en el replicón de ARN, se enlazan de tal manera que permitan la transcripción y traducción de la molécula bioterapéutica y/o la replicación del replicón. Las UTR pueden unirse operativamente proporcionando secuencias y separación necesarias para el reconocimiento y traducción por un ribosoma de otras secuencias codificadas.

Una molécula es funcional o biológicamente activa si realiza al menos 50 % de la misma actividad que su molécula correspondiente natural (o tipo silvestre), pero una molécula funcional también puede realizar al menos 60 % o al menos 70 % o al menos 90 % o al menos 95 % o 100 % de la misma actividad que su molécula correspondiente natural (o tipo silvestre). Las moléculas de ARN autorreplicante también pueden codificar una secuencia de aminoácidos derivada de o basada en una secuencia de aminoácidos de alfavirus tipo silvestre, lo que significa que tienen al menos 60 % o al menos 65 % o al menos 68 % o al menos 70 % o al menos 80 % o al menos 70 % o al menos 80 % o al menos 90 % o al menos 95 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % o 100 % o 80-99 % o 90-100 % o 95-99 % o 95-100 % o 97-99 % o 98-99 % de identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos (que puede ser una secuencia correspondiente) codificada por un genoma de alfavirus de ARN tipo silvestre, que puede ser un genoma del alfavirus del Nuevo Mundo o del Viejo Mundo. Las secuencias derivadas de otras secuencias pueden ser hasta 5 % o hasta 10 % o hasta 20 % o hasta 30 % más largas o cortas que la secuencia original. En cualquiera de las modalidades, la identidad de secuencia puede ser al menos 95 % o al menos 97 % o al menos 98 % o al menos 99 % o 100 % para cualquier secuencia de nucleótidos que codifique (o secuencia de aminoácidos que tenga) un

sitio de unión a G3BP o FXR sobre eso. Estas secuencias también pueden ser de hasta 5 % o hasta 10 % o hasta 20 % o hasta 30 % más largas o cortas que la secuencia original.

Células huésped

La descripción también proporciona una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores anteriores de la descripción. En algunas modalidades, la célula hospedadora es una célula procariota o eucariótica. En algunas modalidades, la célula hospedadora es PER.C6, PER.C6 TetO, una célula de fibroblasto de embrión de pollo (CEF), CHO, HEK293, HT-1080, HKB-11, CAP, HuH-7, o línea celular Age1.

Composiciones

La descripción también proporciona composiciones que comprenden cualquiera de los polinucleótidos, cualquiera de los polipéptidos, y cualquiera de los vectores descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, las composiciones pueden comprender un vector que comprende cualquiera de los nucleótidos descritos en la presente descripción, en donde el vector se selecciona de Ad26, GAd20, MVA, o una molécula de ARN autorreplicante.

Cualquiera de las composiciones descritas anteriormente puede comprender o pueden formularse en una composición farmacéutica que comprende la composición y un excipiente farmacéuticamente aceptable. “Farmacéuticamente aceptable” se refiere al excipiente que en las dosificaciones y concentraciones usadas no causa efectos no deseados o nocivos en los sujetos a los que se

administran e incluye portadores, reguladores, estabilizantes u otros materiales muy conocidos por el experto en la técnica. La naturaleza precisa del portador u otro material puede depender de la vía de administración, p. ej., vías intramuscular, subcutánea, oral, intravenosa, cutánea, intramucosal (p. ej., por el intestino), intranasal o intraperitoneal. Pueden incluirse portadores líquidos tales como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Pueden incluirse además solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol. Las formulaciones ilustrativas son el Estándar Mundial de Adenovirus (Hoganson et al., 2002): 20 mM Tris pH 8, 25 mM NaCl, 2,5 % glicerol; o 20 mM Tris, 2 mM MgCl2, 25 mM NaCl, sacarosa 10 % p/v, polisorbato-80 0,02 % p/v; o 10-25 mM de regulador citrato pH 5,9-6,2, 4-6 % (p/p) de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD), 70-100 mM de NaCl, 0,018-0,035 % (p/p) de polisorbato-80 y opcionalmente 0,3-0,45 % (p/p) de etanol. Pueden usarse muchos otros reguladores, y se conocen ejemplos de formulaciones adecuadas para el almacenamiento y para la administración farmacéutica de preparaciones farmacéuticas purificadas.

La composición puede comprender uno o más adyuvantes. Los ejemplos de tales adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, adyuvantes inorgánicos (p. ej., sales metálicas inorgánicas tales como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio), adyuvantes orgánicos (p. ej., saponinas o escualeno), adyuvantes a base de aceite (p. ej., adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund), liposomas o microesferas biodegradables), virosomas, adyuvantes bacterianos (p. ej., monofosforil lípido A o péptidos de muramilo), adyuvantes sintéticos (p. ej.,

copolímeros de bloque no iónicos, análogos de péptido de muramilo, o lípido A sintético) o adyuvantes de polinucleótidos sintéticos (p. ej., poliarginina o polilisina). Otros ejemplos no limitantes de adyuvantes incluyen QS-21, Detox-PC, MPL- SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL- 1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjumer, PG-026, GSK-I, GcMAF, B-alethine, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, Betafectin, Alum, y MF59.

Otros adyuvantes que pueden usarse incluyen lectinas, factores de crecimiento, citocinas y linfocinas tales como interferón-alfa, interferón-gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor estimulante de colonias de granulocitos (GCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GMCSF), factor de necrosis tumoral (TNF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), agonistas de IL- 1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 o de TLR, y adyuvantes particulares (p. ej., complejos inmunoestimulantes (ISCOM, por sus siglas en inglés).

Nanopartículas

En algunas modalidades, las composiciones pueden comprender nanopartículas. Cualquiera de los polinucleótidos de la descripción puede acoplarse o entrar en contacto con nanopartículas para su suministro a un sujeto. El suministro de cualquiera de los polinucleótidos o polipéptidos de la descripción usando nanopartículas puede eliminar la necesidad de incluir un virus o un adyuvante en la composición de vacuna. Los polinucleótidos de la descripción pueden ser el ADN o el ARN. Las nanopartículas pueden contener señales de peligro inmunitario que ayudan a inducir efectivamente una respuesta inmunitaria a los

péptidos. Las nanopartículas pueden inducir la activación y maduración de células dendríticas (DC), requeridas para una respuesta inmunitaria robusta. Las nanopartículas pueden contener componentes distintos a sí mismos que mejoran la captación de las nanopartículas y, por lo tanto, los péptidos por parte de las células, tales como las células presentadoras de antígeno.

Las nanopartículas tienen típicamente de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 100 nm de diámetro, tal como de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 40 nm. Las nanopartículas con un diámetro medio de 20 a 40 nm pueden facilitar la captación de la nanopartícula al citosol (ver, p. ej., la patente núm. WO2019/135086). Las nanopartículas ilustrativas son nanopartículas poliméricas, nanopartículas inorgánicas, liposomas, nanopartículas lipídicas (LNP), un complejo estimulante inmunitario (ISCOM), una partícula similar a un virus (VLP) o una proteína autoensamblada. Las nanopartículas pueden ser nanopartículas de fosfato de calcio, nanopartículas de silicio o nanopartículas de oro. Las nanopartículas poliméricas pueden comprender uno o más polímeros sintéticos, tales como poli(d,l-lactida-co-glicolida) (PLG), poli(d,l-ácido láctico-coglicólico) (PLGA), poli(ácido g-glutámico) (g-PGA)m poli(etilenglicol) (PEG), o poliestireno o uno o más polímeros naturales, tales como un polisacárido, por ejemplo, pululana, alginato, inulina, y quitosana. El uso de nanopartículas poliméricas puede ser ventajoso debido a las propiedades de los polímeros que pueden incluirse en la nanopartícula. Por ejemplo, los polímeros naturales y sintéticos mencionados anteriormente pueden tener buena biocompatibilidad y biodegradabilidad, una naturaleza no tóxica y/o la capacidad de manipularse en las formas y tamaños deseados. La nanopartícula polimérica

también puede formar nanopartículas de hidrogel, redes poliméricas tridimensionales hidrófilas con propiedades favorables que incluyen tamaño de malla flexible, área superficial grande para la conjugación multivalente, alto contenido de agua y alta capacidad de carga para antígenos. Polímeros tales como poli(ácido L-láctico) (PLA), PLGA, PEG y polisacáridos son adecuados para formar nanopartículas de hidrogel. Las nanopartículas inorgánicas tienen típicamente una estructura rígida y comprenden una cubierta en la que se encapsula un antígeno o un núcleo al que el antígeno puede unirse covalentemente. El núcleo puede comprender uno o más átomos tales como átomos de oro (Au), plata (Ag), cobre (Cu), Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd o Au/Ag/Cu/Pd o fosfato de calcio (CaP).

En algunas modalidades, las nanopartículas pueden ser liposomas. Los liposomas se forman típicamente a partir de fosfolípidos biodegradables no tóxicos y comprenden una cubierta de fosfolípido bicapa autoensamblada con un núcleo acuoso. Los liposomas pueden ser una vesícula unilamelar que comprende un solo fosfolípido bicapa, o una vesícula multilamelar que comprende varias cubiertas fosfolipídicas concéntricas separadas por capas de agua. Como consecuencia, los liposomas pueden adaptarse para incorporar moléculas hidrófilas en el núcleo acuoso o moléculas hidrófobas dentro de las bicapas fosfolípidos. Los liposomas pueden encapsular polinucleótidos o los polipéptidos heterólogos o fragmentos de estos de la descripción dentro del núcleo para el suministro. Los liposomas y formulaciones liposomales pueden prepararse de acuerdo con métodos estándar y son muy conocidos en la técnica, ver, p. ej., Remington; Akimaru, 1995, Cytokine Mol. Ther. 1: 197-210; Alving, 1995, Immunol. Rev. 145: 5-31; Szoka, 1980,

Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; la patente de los EE. UU. núm. 4.235.871; la patente de los EE. UU. núm. 4.501.728; y la patente de los EE. UU. núm. 4.837.028. Los liposomas pueden comprender una molécula para dirigir complejos de liposomas a un tipo de célula particular. La molécula que dirige puede comprender una pareja de unión (p. ej., un ligando o receptor) para una biomolécula (p. ej., un receptor o ligando) en la superficie de un vaso sanguíneo o una célula que se encuentra en un tejido diana. La carga del liposoma es un determinante importante en el aclaramiento del liposoma de la sangre; los liposomas con carga negativa son absorbidos más rápidamente por el sistema reticuloendotelial (Juliano, 1975, Biochem. Biophys. Res. Commun. 63: 651) y, por lo tanto, tienen vidas medias más cortas en el torrente sanguíneo. La incorporación de derivados de fosfatidiletanolamina mejora el tiempo de circulación al evitar la agregación liposomal. Por ejemplo, la incorporación de N-(omega-carboxi)acilamidofosfatidiletanolaminas en vesículas unilamelares grandes de L-alfa-distearoilfosfatidilcolina incrementa dramáticamente la vida útil de la circulación liposomal *in vivo* (véase, p. ej., Ahl, 1997, Biochim. Biophys. Acta 1329: 370-382). Típicamente, los liposomas se preparan con aproximadamente 5 a 15 por ciento molar de fosfolípidos con carga negativa, tales como fosfatidilglicerol, fosfatidilserina o fosfatidil-inositol. Los fosfolípidos con carga negativa añadidos, tales como fosfatidilglicerol, sirven además para prevenir la agregación espontánea de liposomas y, por lo tanto, minimizar el riesgo de formación de agregados liposomales de menor tamaño. Los agentes rigidizantes de membrana, tales como esfingomielina o un fosfolípido neutro saturado, en una concentración de al menos aproximadamente 50 por ciento molar, y 5 a 15 por

ciento molar de monosialilgangliósidos también pueden impartir deseablemente propiedades de los liposomas, tales como rigidez (ver, p. ej., patente de los EE. UU. núm. 4.837.028). Además, la suspensión de liposomas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra los daños por radicales libres y peroxidación de lípidos durante el almacenamiento. Se prefieren inhibidores lipofílicos de radicales libres, tales como alfa-tocoferol y quelantes específicos para hierro solubles en agua, tales como ferrioxianina.

Las moléculas de ARN autorreplicante y/o composiciones que las comprenden también pueden formularse como una nanopartícula usando una combinación de polímeros, lípidos y/u otros agentes biodegradables, tales como, pero no se limitan a, polímeros, fosfato de calcio. Los componentes pueden combinarse en una arquitectura de núcleo-capa, híbrida y/o capa por capa para permitir el ajuste fino de la nanopartícula de modo que pueda potenciar el suministro de las moléculas y/o composiciones de la descripción.

En algunas modalidades, las nanopartículas pueden incluir vesículas multilamelares de tamaños heterogéneos. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas pueden disolverse en un solvente orgánico o sistema solvente adecuado y secarse al vacío o en un gas inerte para formar una película lipídica delgada. Si se desea, la película puede disolverse nuevamente en un solvente adecuado, tal como butanol terciario y, después, liofilizarse para formar una mezcla lipídica más homogénea que está en una forma similar a un polvo más fácilmente hidratado. Esta película se cubre con una solución acuosa del polipeptídico o polinucleótido y se deja hidratar, típicamente durante un período de 15 a 60 minutos con agitación. La distribución de tamaño de las vesículas multilamelares resultantes puede cambiarse

hacia tamaños más pequeños hidratando los lípidos en condiciones de agitación más vigorosas o añadiendo detergentes solubilizantes, tales como deoxicolato. El medio de hidratación puede comprender el ácido nucleico en una concentración que se desea en el volumen interior de los liposomas en la suspensión final de liposomas. Los lípidos adecuados que pueden usarse para formar vesículas multilamelares incluyen DOTMA (Feigner, et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-7417), DOGS o Transfectain™ (Behr, et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6982-6986), DNERIE o DORIE (Feigner, et al., Methods 5: 67-75), DC-CHOL (Gao y Huang, 1991, BBRC 179: 280-285), DOTAP™ (McLachlan, et al., 1995, Gene Therapy 2: 674-622), Lipofectamine™. y compuestos glicerolípidos (ver, p. ej., las patentes núms. EP901463 y W098/37916).

En algunas modalidades, la nanopartícula puede ser un complejo estimulante inmunitario (ISCOM). Los ISCOM son partículas tipo jaula que se forman típicamente a partir de micelas que contienen saponina coloidal. Los ISCOM pueden comprender colesterol, fosfolípidos (tales como fosfatidiletanolamina o fosfatidilcolina) y saponina (tales como Quil A del árbol Quillaia saponaria).

En algunas modalidades, la nanopartícula puede ser una partícula similar a virus (VLP). Las VLP son nanopartículas autoensambladas que carecen de ácido nucleico infeccioso, que se forman por el autoensamblaje de la proteína cápside biocompatible. Las VLP tienen típicamente de aproximadamente 20 a aproximadamente l50 nm, tal como de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 nm, de aproximadamente 30 a aproximadamente l40 nm, de aproximadamente 40 a aproximadamente l30 nm, de aproximadamente 50 a aproximadamente l20 nm, de

aproximadamente 60 a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 100 nm o de aproximadamente 80 a aproximadamente 90 nm de diámetro. Las VLP aprovechan ventajosamente el poder de la estructura viral desarrollada, que se optimiza naturalmente para la interacción con el sistema inmune. El tamaño de nanopartículas y el orden estructural repetitivo naturalmente optimizados significan que las VLP inducen respuestas inmunitarias potentes, incluso en ausencia de adyuvante.

Otras moléculas adecuadas para formar complejos con los polinucleótidos de la descripción incluyen moléculas catiónicas, tales como, poliamidoamina (Haensler and Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), polilisina dendrítica (publicación de la patente internacional núm. WO1995/24221), polietilenirinina o polipropilen h-nina (publicación de la patente internacional núm. WO1996/02655), polilisina (patente de los EE. UU. núm. 5.595.897), quitosana (patente de los EE. UU. núm. 5.744.166), coacervados ADN-gelatina (ver, p. ej., patente de los EE. UU. núm. 6.207.195; la patente de los EE. UU. núm. 6.025.337; la patente de los EE. UU. núm. 5.972.707) o DEAE dextrano (Lopata, et al., 1984, Nucleic Acid Res. 12: 5707-5717).

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante puede envasarse o encapsularse en moléculas catiónicas, tales como, poliamidoamina (Haensler and Szoka, 1993, Bioconjugate Chem. 4: 372-379), polilisina dendrítica (publicación de la patente internacional núm. WO1995/24221), polietilenirinina o polipropilen h-nina (publicación de la patente internacional núm. WO1996/02655), polilisina (patente de los EE. UU. núm. 5.595.897), quitosana (patente de los EE. UU. núm. 5.744.166), coacervados ADN-gelatina (ver, p. ej., patente de los EE. UU.

núm. 6.207.195; la patente de los EE. UU. núm. 6.025.337; la patente de los EE. UU. núm. 5.972.707) o DEAE dextrano (Lopata, et al., 1984, Nucleic Acid Res. 12: 5707-5717), dendrímeros (ver, p. ej., patente núm. WO1996/19240), o polietilenimina (PEI) (ver, p. ej., Sun et al., 2014, Mol Med Rep. 10(5):2657–2662).

Las moléculas de ARN autorreplicante descritas y/o las composiciones que comprenden las moléculas de ARN autorreplicante que codifican cualquiera de los polipéptidos de la descripción pueden encapsularse usando uno o más liposomas, lipoplejos y/o nanopartículas lipídicas. Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente que pueden componerse principalmente por una bicapa lipídica y pueden usarse como vehículo de suministro para la administración de polinucleótidos y moléculas de ARN autorreplicante. Los liposomas pueden ser de diferentes tamaños tales como, pero no se limitan a, una vesícula multilaminar (MLV, por sus siglas en inglés) que puede tener cientos de nanómetros de diámetro y puede contener una serie de bicapas concéntricas separadas por compartimentos acuosos estrechos, una pequeña vesícula unicelular (SUV, por sus siglas en inglés) que puede ser menor de 50 nm de diámetro, y una gran vesícula unilaminar (LUV, por sus siglas en inglés) que puede tener entre 50 y 500 nm de diámetro. El diseño de liposomas puede incluir, pero no se limita a, opsoninas o ligandos para mejorar la unión de los liposomas al tejido no saludable o para activar eventos tales como, pero sin limitarse a, endocitosis. Los liposomas pueden contener un pH bajo o alto para mejorar el suministro de los polinucleótidos y las moléculas de ARN autorreplicante descritas en la presente descripción.

La formación de liposomas puede depender de las características fisicoquímicas tales como, pero no se limita a, la formulación farmacéutica atrapada

y los ingredientes liposomales, la naturaleza del medio en el que se dispersan las vesículas lipídicas, la concentración efectiva de la sustancia atrapada y su potencial toxicidad, cualquier proceso adicional involucrado durante la aplicación y/o suministro de las vesículas, el tamaño de optimización, polidispersidad y la vida útil de las vesículas para la aplicación prevista, y la reproducibilidad de lote a lote y la posibilidad de producción a gran escala de productos liposomales seguros y eficientes.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante se encapsula, liga o adsorbe en un liposoma, un lipoplex, una nanopartícula lipídica o combinaciones de estos, preferentemente la molécula de ARN autorreplicante se encapsula en una nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante que codifica cualquiera de los polipéptidos de la descripción puede encapsularse completamente dentro de la porción lipídica de la partícula, protegiendo de esta manera al ARN de la degradación por nucleasa. “Completamente encapsulado” significa que el ARN no se degrada significativamente después de la exposición al suero o un ensayo de nucleasa que degradaría significativamente el ARN libre. Cuando está completamente encapsulado, preferentemente menos que 25 % del ácido nucleico en la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría 100 % de ácido nucleico libre, con mayor preferencia menos que 10 % y con la máxima preferencia menos que 5 % del ácido nucleico en la partícula se degrada. “Completamente encapsulado” también significa que las partículas de ácido nucleico-lípido no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras la administración in vivo.

En algunas modalidades, las moléculas de ARN autorreplicante y/o las composiciones de la descripción que las comprenden pueden formularse en una vesícula lipídica que puede tener retículas entre bicapas lipídicas funcionalizadas. En algunas modalidades, las moléculas de ARN autorreplicante y/o composiciones de la descripción pueden formularse en un complejo de policatión de lípidos. La formación del complejo de policatión de lípidos puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica. Como ejemplo no limitante, el policatión puede incluir un péptido catiónico o un polipéptido tal como, pero sin limitarse a, polilisina, poliornitina y/o poliarginina y los péptidos catiónicos. En algunas modalidades, las moléculas de ARN autorreplicante y/o composiciones descritas en la presente descripción pueden formularse en un complejo de policatión de lípidos que puede incluir además un lípido neutro tal como, pero no se limita a, colesterol o dioleil fosfatidiletanolamina (DOPE). La formulación de nanopartículas lipídicas puede verse influenciada por, pero sin limitarse a, la selección del componente lipídico catiónico, el grado de saturación lipídica catiónica, la naturaleza de la PEGilación, la relación de todos los componentes y parámetros biofísicos como el tamaño.

En algunas modalidades, la molécula de ARN autorreplicante descrita en la presente descripción se encapsula en una nanopartícula lipídica (LNP) como se muestra en la Figura 20. Las nanopartículas lipídicas comprenden típicamente cuatro lípidos diferentes: un lípido ionizable, un lípido auxiliar neutro, colesterol y un lípido de polietilenglicol difusible (PEG). Las LNP son similares a los liposomas, pero tienen una función y composición ligeramente diferentes. Las LNP se diseñan para encapsular polinucleótidos, tales como ADN, ARNm, ARNip y ARNp. Los liposomas tradicionales contienen un núcleo acuoso rodeado por una o más bicapas lipídicas. Las LNP pueden

asumir una estructura similar a la micela, encapsulando polinucleótidos en un núcleo no acuoso. Las LNP contienen típicamente un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido que previene la agregación de la partícula (p. ej., un conjugado de PEG-lípido). Las LNP son útiles para aplicaciones sistémicas, ya que exhiben tiempos de vida de circulación prolongados después de la inyección intravenosa (es decir,) y se acumulan en sitios distales (p. ej., sitios físicamente separados del sitio de administración). Las LNP pueden tener un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, tal como de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicas. La preparación de LNP cargadas de polinucleótidos se describe en, p. ej., las patentes de los EE. UU. núm. 5.976.567; 5.981.501; 6.534.484; 6.586.410; 6.815.432; y la publicación PCT núm. 96/40964. Los polinucleótidos que contienen LNP se describen, por ejemplo, en WO2019/191780.

En algunas modalidades, las nanopartículas de lípidos comprenden un lípido catiónico (p. ej., uno o más lípidos catiónicos o sales de estos descritos en la presente descripción), un fosfolípido, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (p. ej., uno o más conjugados de PEG-lípido). Las partículas de lípidos también pueden incluir colesterol. Las partículas de lípidos pueden encapsular al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ARN autorreplicante que codifican uno o más polipéptidos.

En algunas modalidades, las formulaciones de LNP que comprenden una composición policatiónica pueden usarse para el suministro de las moléculas de ARN

autorreplicante descritas en la presente descripción in vivo y/o ex vitro. La descripción proporciona además formulaciones de LNP que comprenden un lípido catiónico.

Los términos "lípido catiónico" y "amino lípido" se usan indistintamente en la presente descripción para incluir aquellos lípidos y sales de estos que tienen una, dos, tres o más cadenas de ácidos grasos o alquilos grasos y un grupo principal de amino valorable por pH (p. ej., un grupo principal de dialquilamino o alquilamino). El lípido catiónico está típicamente protonado (es decir, cargado positivamente) a un pH por debajo del pKa del lípido catiónico y es sustancialmente neutro a un pH por encima del pKa. Los lípidos catiónicos también pueden denominarse lípidos catiónicos titulables. En algunas modalidades, los lípidos catiónicos comprenden: un grupo principal de amina terciaria protonable (p. ej., titulable por pH); cadenas de alquilo C18, en donde cada cadena de alquilo tiene independientemente dobles enlaces de 0 a 3 (p. ej., 0, 1, 2 o 3); y enlaces éter, éster o cetal entre el grupo principal y las cadenas de alquilo. Tales lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, DSDMA, DODMA, DLinDMA, DLenDMA, γ-DLenDMA, DLin-K-DMA, DLin-K-C2-DMA (también conocido como DLin-C2K-DMA, XTC2 y C2K), DLin-K-C3-DM A, DLin-K-C4-DMA, DLen-C2K-DMA, y-DLen-C2K-DMA, DLin-M-C2-DMA (también conocido como MC2), DLin-M-C3-DMA (también conocido como MC3) y (DLin-MP-DMA) (también conocido como 1-B1 1).

La descripción también proporciona una molécula de ARN autorreplicante encapsulada, en donde el lípido catiónico comprende una amina terciaria protonable. En algunas modalidades, el lípido catiónico es di((Z)-non-2-en-1-yl) 8,8'-((((2-(dimetilamino)etil)tio)carbonil)azanodiil)dioctanoato.

En algunas modalidades, los compuestos lipídicos catiónicos son relativamente no citotóxicos. Los compuestos lipídicos catiónicos pueden ser biocompatibles y biodegradables. El lípido catiónico puede tener un pKa en el rango de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,5, con mayor preferencia entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,0.

Los compuestos lipídicos catiónicos descritos en la presente descripción son particularmente atractivos para el suministro de fármacos por varias razones: contienen grupos amino para interactuar con ADN, ARN, otros polinucleótidos, y otros agentes cargados negativamente, para regular el pH, para causar endoosmólisis, para proteger la molécula de ARN autorreplicante para ser administrada, pueden sintetizarse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente; y/o responden al pH y pueden diseñarse con un pKa deseado.

Las formulaciones de nanopartículas lipídicas pueden mejorarse reemplazando el lípido catiónico con un lípido catiónico biodegradable que se conoce como nanopartícula lipídica de eliminación rápida (reLNP). Se ha demostrado que los lípidos catiónicos ionizables, tales como, pero no se limitan a, DLinDMA, DLin-KC2-DMA y DLin-MC3-DMA, se acumulan en el plasma y los tejidos con el tiempo y pueden ser una fuente potencial de toxicidad. El rápido metabolismo de los lípidos rápidamente eliminados puede mejorar la tolerabilidad y el índice terapéutico de las nanopartículas de lípidos en un orden de magnitud desde una dosis de 1 mg/kg a una dosis de 10 mg/kg en ratas. La inclusión de un enlace éster degradado enzimáticamente puede mejorar el perfil de degradación y metabolismo del componente catiónico, mientras se mantiene la actividad de la formulación de reLNP. El enlace éster puede ubicarse internamente dentro de la

cadena lipídica o puede ubicarse terminalmente en el extremo terminal de la cadena lipídica. El enlace éster interno puede reemplazar cualquier carbono en la cadena lipídica. Las partículas de lípidos pueden comprender un conjugado lipídico. El lípido conjugado es útil porque previene la agregación de partículas. Los lípidos conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, conjugados PEG-lípido, conjugados catiónico-polímero-lípido y mezclas de estos.

El PEG es un polímero lineal soluble en agua de unidades repetidas de etileno PEG con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; e incluyen los siguientes: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), succinato de monometoxipolietilenglicol (MePEG-S), succinimidil succinato de monometoxipolietilenglicol (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH2), tresilato de monometoxipolietilenglicol (MePEG-TRES), monometoxipolietilenglicol-imida-zolil-carbonilo (MePEG-IM), así como tales compuestos que contienen un grupo hidroxilo terminal en lugar de un grupo metoxi terminal (p. ej., HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO- PEG-NH2).

La entidad de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en la presente descripción puede comprender un peso molecular promedio que varía de 550 dalton a 10.000 dalton. Los ejemplos de PEG-lípidos incluyen, pero no se limitan a, PEG acoplado a dialquiloxipropilos (PEG-DAA), PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG), PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado a ceramidas, PEG conjugado con colesterol o un derivado de este, y mezclas de estos. En algunas modalidades, el lípido conjugado con PEG es un DMG-PEG-2000.

Las moléculas de ARN autorreplicante también pueden formularse en una partícula que comprende lípidos no catiónicos. Los lípidos no catiónicos adecuados incluyen, por ejemplo, lípidos neutros sin carga, bipolares o aniónicos capaces de producir un complejo estable. Los ejemplos no limitantes de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósido, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleyol-fosfatidilglicerol (POPG), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil) -ciclohexano-l-carboxilato (DOPE-mal), fosfatidiletanolamina fosfatidiletanolamina fosfatidiletanolamina fosfatidiletanolamina, fosfatidiletanolamina, fosfatidiletanolaminedipalmitoil-dimiristoil-diestearoil-monometil-dimetil-dielaidoil-estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, y mezclas de estos. También pueden usarse otros fosfolípidos de diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferentemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C10-C24, p. ej., lauroílo, miristoílo, palmitoílo, estearoílo u oleoílo.

Los ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroles tales como colesterol y derivados de estos. Los ejemplos no limitantes de derivados de colesterol incluyen análogos polares tales como 5a-colestanol, 5a-coprostanol,

colesteril- (2'-hidroxi)-etil éter, colesteril-(4'-hidroxi)-butil éter y 6-cetocolestanol; análogos no polares tales como 5a-colestano, colestenona, 5a-colestanona, 5a-colestanona y decanoato de colesterilo; y mezclas de estos. En modalidades preferidas, el derivado de colesterol es un análogo polar tal como colesteril-(4'-hidroxi)-butil éter. En algunas modalidades, el fosfolípido es DSPC. En algunas modalidades, el lípido no catiónico presente en las partículas de lípidos comprende o consiste en una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol o un derivado de estos. En algunas modalidades donde las partículas de lípidos contienen una mezcla de fosfolípidos y colesterol o un derivado de colesterol, la mezcla puede comprender hasta 40 % mol, 45 % mol, 50 % mol, 55 % mol o 60 % mol del lípido total presente en la partícula.

En algunas modalidades, las LNP pueden comprender 30-70 % de compuesto lipídico catiónico, 0-60 % de colesterol, 0-30 % de fosfolípidos, y 1-10 % de polietilenglicol (PEG).

En algunas modalidades, el lípido catiónico, lípido de iones híbridos, colesterol y lípido conjugado se combinan en una relación molar de 50:7:40:3, respectivamente en la nanopartícula lipídica.

En algunas modalidades, las formulaciones de LNP descritas en la presente descripción pueden comprender adicionalmente una molécula potenciadora de permeabilidad.

En algunas modalidades, las formulaciones de nanopartículas pueden ser una nanopartícula de carbohidrato que comprende un portador de carbohidrato y una molécula de ARN autorreplicante. Como ejemplo no limitante, el portador de carbohidrato puede incluir, pero no se limita a, un material de tipo glucógeno o

fitoglucógeno modificado con anhídrido, octenil succinato de ftoglucógeno, beta-dextrina de fitoglucógeno, y beta-dextrina de fitoglucógeno modificado con anhídrido.

Kits

La descripción también proporciona un kit que comprende una o más composiciones, de uno o más polinucleótidos, uno o más polipéptidos o uno o más vectores de la descripción. La descripción proporciona además un kit que comprende uno o más virus recombinantes de la descripción. Los kits pueden usarse para facilitar la realización de los métodos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el kit comprende además reactivos para facilitar la entrada de las vacunas de la descripción en una célula, tales como formulaciones a base de lípidos o materiales de empaquetado viral.

En algunas modalidades, el kit comprende uno o más vectores Ad26 que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno o más vectores MVA que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno o más vectores GAd20 que comprende cualquiera de los polinucleótidos de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno o más moléculas de ARN autorreplicante que comprenden cualquiera de los polinucleótidos de la descripción.

En algunas modalidades, el kit comprende un vector Ad26 de la descripción y un vector MVA de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende un vector GAd20 de la descripción y un vector MVA de la descripción. En algunas

modalidades, el kit comprende un vector Ad26 de la descripción y un vector Gad20 de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende una moléculas de ARN autorreplicante de la descripción y un vector Gad20 de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende una molécula de ARN autorreplicante de la descripción y un vector MVA de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende una molécula de ARN autorreplicante de la descripción y un vector Ad26 de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno o más polinucleótidos de la descripción. En algunas modalidades, el kit comprende uno o más polipéptidos de la descripción. En alguna modalidad, el kit comprende una o más células de la descripción.

Otras moléculas

Complejo péptido-HLA

La descripción también proporciona un complejo de proteínas que comprende el antígeno leucocitario humano (HLA) y un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO: 31, o un fragmento de esta.

En algunas modalidades, el fragmento es un fragmento inmunogénico de cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente descripción. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de entre aproximadamente 6 y 25 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 6 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 7 aminoácidos. En algunas modalidades, el

fragmento tiene una longitud de aproximadamente 8 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 9 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 10 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 11 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 12 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 13 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 14 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 15 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 16 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 17 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 18 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 19 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 20 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 21 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 22 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 23 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 24 aminoácidos. En algunas modalidades, el fragmento tiene una longitud de aproximadamente 25 aminoácidos.

En algunas modalidades, el HLA es HLA clase I o HLA clase II.

En algunas modalidades, el HLA es HLA-A*02:01, HLA-A*03:01, HLA-B*07:02 y HLA-C*07:02 o cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades, el complejo proteico se conjuga con un agente de detección o un agente citotóxico.

La descripción también proporciona una molécula proteinácea aislada que se une específicamente al polipéptido de la descripción o el complejo de HLA y el polipéptido.

Moléculas proteináceas

En algunas modalidades, la molécula proteinácea es un anticuerpo, un supercóntigo alternativo, un receptor antigénico quimérico (CAR) o un receptor de células T (TCR).

En algunas modalidades, la molécula proteinácea es un anticuerpo.

En algunas modalidades, la molécula proteinácea es un supercóntigo alternativo.

En algunas modalidades, la molécula proteinácea es un receptor antigénico quimérico (CAR, por sus siglas en inglés).

En algunas modalidades, la molécula proteinácea es un receptor de células T (TCR).

La unión de la molécula proteinácea al polipéptido o el complejo péptido-HLA de la descripción puede determinarse experimentalmente usando cualquier método adecuado. Tales métodos pueden usar la instrumentación de ProteOn XPR36, Biacore 3000 o KinExA, ELISA o ensayos de unión competitiva conocidos por los expertos en la técnica. La afinidad medida puede variar si se

mide bajo condiciones diferentes (p. ej., osmolaridad, pH). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión (p. ej., K_D, K_{on}, K_{off}) se realizan, típicamente, en condiciones estandarizadas y con un regulador estandarizado, tal como el regulador descrito en la presente descripción. El experto en la técnica podrá apreciar que el error interno de las mediciones de afinidad, por ejemplo, cuando se usa Biacore 3000 o ProteOn (medido como desviación estándar, SD), puede estar, típicamente, entre 5-33 % para las mediciones dentro de los límites típicos de detección. "No sustancial" se refiere a la unión que es 100 veces menor en comparación con la unión medida de la molécula proteinácea a los polipéptidos o HLA/péptido de la descripción.

Anticuerpos

Los anticuerpos que se unen a polipéptidos o complejos HLA/péptido pueden generarse mediante métodos conocidos. Por ejemplo, puede usarse el método de hibridoma de Kohler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975 para generar anticuerpos monoclonales. En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped, tal como un hámster, rata o mono, se inmuniza con uno o más polipéptidos o fragmentos de estos, seguido de la fusión de células del bazo de animales inmunizados con células de mieloma usando métodos estándar para formar células de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Para la producción de anticuerpos con propiedades deseadas, tales como especificidad de unión y afinidad, se seleccionan colonias que provienen de células solas e inmortalizadas de hibridoma.

Varios animales huésped pueden usarse para producir los anticuerpos. Por ejemplo, para generar anticuerpos que contienen el par VH/VL pueden usarse ratones Balb/c, ratas o pollos, y para generar anticuerpos de cadena pesada (VHH) solamente pueden usarse llamas y alpacas, empleando protocolos estándar de inmunización. Los anticuerpos desarrollados en animales no humanos pueden humanizarse mediante el uso de diversas tecnologías para generar secuencias más similares a las humanas.

Se conocen técnicas de humanización ilustrativas que incluyen la selección de marcos de aceptor humano e incluyen injerto de CDR (patente de los EE. UU. núm. 5.225.539), injerto de SDR (patente de los EE. UU. núm. 6.818.749) reconstrucción superficial (Padlan, (1991) *Mol* Immunol 28:489-499), reconstrucción superficial de residuos determinantes de especificidad (publicación de patente de los EE. UU. núm. 2010/0261620), adaptación de marcos humanos (patente de los EE. UU. núm. 8.748.356) y superhumanización (patente de los EE. UU. núm. 7.709.226). En estos métodos, las CDR de anticuerpos progenitores se transfieren sobre marcos humanos que pueden seleccionarse basados en su homología global con los marcos progenitores, basados en la similitud en la longitud de CDR, o la identidad de estructura canónica, o una combinación de estos.

Los anticuerpos humanizados pueden optimizarse aún más para mejorar su selectividad o afinidad con un antígeno deseado al incorporar residuos alterados de soporte de marcos para preservar la afinidad de unión (retromutaciones) mediante técnicas tales como las descritas en las publicaciones de patente internacional núms. WO1090/007861 y WO1992/22653, o al introducir

variación en cualquiera de las CDR, por ejemplo, para mejorar la afinidad del anticuerpo.

Los animales transgénicos, tales como ratones o ratas, que portan loci de inmunoglobulina humana (Ig) en sus genomas pueden usarse para generar anticuerpos humanos contra una proteína objetivo, y se describen, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 6.150.584, la publicación internacional de patente núm. WO99/45962, las publicaciones de patentes internacionales núms. WO2002/066630, WO2002/43478, WO2002/043478 y WO1990/04036. Los loci endógenos de inmunoglobulina en tales animales pueden desestabilizarse o delecionarse, y al menos un locus completo o parcial de inmunoglobulina humana puede insertarse en el genoma del animal mediante el uso de recombinación homóloga o no homóloga, mediante el uso de transcromosomas, o mediante el uso de minigenes. Empresas tales como Regeneron (http://_www_regeneron_com), Harbour Antibodies (http://_www_harbourantibodies_com), Open Monoclonal Technology, Inc. (OMT) (http://_www_omtinc_net), KyMab (http://_www_kymab_com), Trianni (http://_www.trianni_com) y Ablexis (http://_www_ablexis_com) pueden dedicarse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado mediante el uso de tecnologías, como se describió anteriormente.

Los anticuerpos humanos pueden seleccionarse de una genoteca de presentación en fagos, donde el fago se modifica genéticamente para expresar inmunoglobulinas humanas o porciones de estas tales como Fab, anticuerpos de cadena simple (scFv), o regiones variables de anticuerpos no emparejados o emparejados. Los anticuerpos de la descripción pueden aislarse, por ejemplo, a partir

de genotecas de presentación en fagos que expresan las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos como polipéptidos con la proteína de cubierta pIX de bacteriófagos. Las genotecas pueden seleccionarse para la unión del fago al antígeno deseado y los clones positivos obtenidos pueden caracterizarse aún más, los Fab pueden aislarse de los lisados de clones y expresarse como IgG de longitud completa. Tales métodos de presentación en fagos para aislar anticuerpos se describen en por ejemplo: patentes de los EE. UU. núms. 5.223.409, 5.403.484, 5.571.698, 5.427.908, 5.580.717, 5.969.108, 6.172.197, 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

La preparación de antígenos inmunogénicos y la producción de anticuerpos monoclonales pueden realizarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada, tal como la producción de proteínas recombinantes o la síntesis química de péptidos. Los antígenos inmunogénicos pueden administrarse a un animal en la forma de una proteína purificada, o mezclas de proteínas que incluyen células completas o extractos de células o tejidos, o el antígeno puede formarse *de novo* en el cuerpo del animal a partir de ácidos nucleicos que codifican dicho antígeno o una porción de este.

Supercóntigos alternativos

Los supercóntigos alternativos (también denominados miméticos de anticuerpo) que se unen específicamente a los polipéptidos o complejos HLA/péptido pueden generarse usando diversos supercóntigos conocidos en la técnica y descritos en la presente descripción. Los supercóntigos alternativos pueden ser monocuerpos, diseñados para incorporar el dominio tipo III de la fibronectina (Fn3) de fibronectina o

tenascina como supercóntigo de proteína (patente de los EE. UU. núm. 6.673.901; la patente de los EE. UU. núm. 6.348.584) o dominios FN3 sintéticos tales como tencon como se describe en la publicación de la patente internacional núm. 2010/0216708 y publicación de los EE. UU. núm. 2010/0255056. Los supercóntigos adicionales alternativos comprenden Adnectin™, un iMab, un Anticalin®, un EETI-II/AGRP, un dominio de Kunitz, un aptámero peptídico de tiorredoxina, un Affibody®, un DARPin, un affilin, una tetranectina, un fynomer, y un avimer. Los supercóntigos alternativos son marcos polipeptídicos de cadena única que contienen un núcleo altamente estructurado asociado con dominios variables de alta tolerancia conformacional que permiten inserciones, eliminaciones, u otras sustituciones dentro de los dominios variables. Las genotecas que introducen diversidad a uno o más dominios variables, y en algunos casos al núcleo estructural, pueden generarse usando protocolos conocidos y las genotecas resultantes pueden seleccionarse para la unión al neoantígeno de la descripción, y los aglutinantes identificados pueden caracterizarse además por su especificidad mediante el uso de métodos conocidos. El supercóntigo alternativo puede derivarse de la proteína A, en particular, el dominio Z de esta (affibodies), ImmE7 (proteínas de inmunidad), BPTI/APPI (dominios de Kunitz), proteína de unión a Ras AF-6 (dominios PDZ), caribdotoxina (toxina de escorpión), CTLA-4, mín.-23 (knottins), lipocalinas (anticalinas), neocarcinostatina, un dominio de fibronectina, un dominio de repetición de consenso de anquirina o tiorredoxina (Skerra, A., "Alternative Non-Antibody Scaffolds for Molecular Recognition," *Curr. Opin. Biotechnol*. 18:295-304 (2005); Hosse et al., "A New Generation of Protein Display Scaffolds for Molecular Recognition," *Protein Sci*. 15:14-27 (2006); Nicaise et al., "Affinity Transfer by CDR Grafting on a Nonimmunoglobulin Scaffold," *Protein Sci*. 13:1882-1891 (2004);

Nygren y Uhlen, "Scaffolds for Engineering Novel Binding Sites in Proteins," *Curr. Opin. Struc. Biol*. 7:463-469 (1997).

Receptores de antígeno quimérico (CAR)

Pueden generarse CAR que se unen a los polipéptidos o complejos de HLA/péptido. Los receptores antígenos quiméricos (CAR) son receptores modificados genéticamente. Estos receptores modificados fácilmente pueden insertarse y expresarse mediante células inmunes, que incluye células T de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Con un CAR, puede programarse un único receptor para reconocer un antígeno específico y, cuando se une a ese antígeno, activar la célula inmunitaria para atacar y destruir la célula que lleva ese antígeno. Cuando estos antígenos existen en las células tumorales, una célula inmunitaria que expresa el CAR puede atacar y destruir la célula tumoral.

El CAR comprende típicamente un dominio extracelular que se une al antígeno, un enlazador opcional, un dominio transmembrana y un dominio citosólico que comprende un dominio coestimulante y/o un dominio de señalización.

El dominio extracelular del CAR puede contener cualquier polipéptido que se una específicamente al antígeno deseado. El dominio extracelular puede comprender un scFv, una porción de un anticuerpo o una estructura alternativa. Los CAR también pueden modificarse para unirse a dos o más antígenos deseados que pueden disponerse en tándem y separarse por secuencias de enlazador. Por ejemplo, pueden organizarse uno o más anticuerpos de dominio, scFv, anticuerpos de llama VHH u otros fragmentos de anticuerpos solo VH en tándem mediante un enlazador para proporcionar biespecificidad o multiespecificidad al CAR.

El dominio transmembrana del CAR puede derivarse del dominio transmembrana de CD8, una cadena alfa, beta o zeta de un receptor de células T, CD28, CD3 épsilon, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CDI la, CD18), ICOS (CD278), 4-1 BB (CD137), 4-1 BBL, GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRFI), CD160, CD1 9, IL2R beta, IL2R gamma, IL7R a, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CDI Id, ITGAE, CD103, ITGAL, CDI la, LFA-1, ITGAM, CDI lb, ITGAX, CDI lc, ITGB1, CD29, ITGB2, CD1 8, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, NKG2D y/o NKG2C.

El dominio coestimulador intracelular de CAR puede derivarse de los dominios intracelulares de una o más moléculas coestimuladoras. Las moléculas coestimuladoras son moléculas de superficie celular bastante conocidas distintas de los receptores de antígenos o receptores de Fc que proporcionan una segunda señal requerida para la activación y función eficientes de los linfocitos T tras la unión al antígeno. Los dominios coestimuladores ilustrativos que pueden usarse en los CAR son dominios intracelulares de 4-1BB, CD2, CD7, CD27, CD28, CD30, CD40, CD54 (ICAM), CD83, CD134 (OX40), CD150 (SLAMF1), CD152 (CTLA4), CD223 (LAG3), CD270 (HVEM), CD278 (ICOS), DAP10, LAT, NKD2C SLP76, TRIM, y ZAP70.

El dominio de señalización intracelular del CAR puede derivarse de los dominios de señalización de, por ejemplo, CD3ζ, CD3ε, CD22, CD79a, CD66d o CD39. “Dominio de señalización intracelular”, se refiere a la parte del polipéptido

del CAR que participa en la transducción del mensaje de la unión efectiva del CAR a un antígeno objetivo en el interior de la célula efectora inmunitaria para desencadenar la función de la célula efectora, p. ej., activación, producción de citocinas, proliferación y actividad citotóxica, que incluye la liberación de factores citotóxicos a la célula objetivo unida al CAR, u otras respuestas celulares desencadenadas después de la unión del antígeno al dominio extracelular del CAR.

El enlazador opcional del CAR ubicado entre el dominio extracelular y el dominio transmembrana puede ser un polipéptido de aproximadamente 2 a 100 aminoácidos de longitud. El enlazador puede incluir o estar compuesto por residuos flexibles tales como glicina y serina, de tal manera que los dominios proteicos adyacentes están libres de moverse entre sí. Pueden usarse enlazadores más largos cuando sea deseable para asegurar que dos dominios adyacentes no interfieran estéricamente entre sí. Los enlazadores pueden ser escindibles o no escindibles. Los ejemplos de enlazadores escindibles incluyen enlazadores 2A (por ejemplo, T2A), enlazadores de tipo 2A o equivalentes funcionales de estos, y combinaciones de estos. El enlazador también puede derivar de una región bisagra o parte de la región bisagra de cualquier inmunoglobulina.

Los CAR ilustrativos que pueden usarse son, por ejemplo, CAR que contiene un dominio extracelular que se une a HLA en complejo con un fragmento de los polipéptidos de CALR/JAK2 de la descripción, dominio transmembrana de CD8 y dominio de señalización de CD3ζ. Otros CAR ilustrativos contienen CD8 o el dominio transmembrana de CD28, dominio coestimulante de CD28, 41BB o OX40 y dominio de señalización de CD3ζ.

Los CAR se generan mediante técnicas estándar de biología molecular. El dominio extracelular que se une al antígeno deseado puede derivarse de los anticuerpos o sus fragmentos de unión al antígeno generado mediante el uso de las tecnologías descritas en la presente descripción.

Receptor de células T (TCR)

Pueden generarse TCR que unen los complejos HLA/péptido de la descripción. Los TCR pueden identificarse basados en la unión del complejo HLA/péptido, seguido de la secuenciación del TCR. El TCR identificado puede identificarse a partir de

αβ células T. Los TCR identificados pueden modificarse además para mejorar su afinidad, estabilidad, solubilidad o lo similar. Por ejemplo, los TCR pueden someterse a estabilización de cisteína, expresarse como TCR solubles, como TCR monocatenarios, como fusión con etiquetas de epítopo de C-terminal o N-terminal, diseñarse para mejorar la estabilidad con mutaciones en el núcleo hidrófobo, tal como las posiciones 11, 13, 19, 21, 53, 76, 89, 91 o 94 de la α cadena, intercambiar los dominios con dominios variables y/o constantes de cadena α and β intercambiados como se describe en US7329731, US7569664, US9133264, US9624292, US2016/0130319 y US9884075.

Métodos para usar cualquiera de las composiciones de la presente descripción

En la presente se proporcionan métodos para tratar a un sujeto con las composiciones descritas en la presente descripción. Los métodos proporcionados en

la presente descripción comprenden administrar cualquiera de los polinucleótidos, polipéptidos, vectores y composiciones de la descripción. Los polinucleótidos, polipéptidos, vectores, composiciones y regímenes de administración de la descripción pueden usarse para tratar, prevenir o reducir el riesgo de una afección clínica.

En algunas modalidades, la afección clínica es un cáncer, una enfermedad mieloproliferativa, o una enfermedad cardiovascular.

En algunas modalidades, el cuadro clínico es un cáncer que se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer linfoide, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, mieloma de células plasmáticas, cáncer del tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de colon, cáncer del tracto urinario, cáncer del sistema nervioso central, neuroblastomas, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer testicular, y cáncer de tejido blando.

En algunas modalidades, el cuadro clínico es una enfermedad mieloproliferativa que se selecciona de mielofibrosis primaria (MPN), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria (PFM), mielofibrosis secundaria, leucemia mieloide aguda (AML), AML secundaria, leucemia mielógena crónica (CML), hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) y leucemia mielomonocítica crónica (CMML).

En algunas modalidades, la enfermedad cardiovascular se selecciona de un síndrome coronario agudo, una enfermedad cerebrovascular isquémica, una enfermedad cardíaca isquémica, una trombosis, una tromboembolia venosa, una

trombosis venosa profunda, una embolia pulmonar, una trombosis intraabdominal catastrófica, una enfermedad arterial periférica, una hipertensión, una insuficiencia cardíaca, una fibrilación auricular, una enfermedad cardíaca coronaria, una aterosclerosis o una hematopoyesis clonal.

En algunas modalidades, el sujeto es negativo al cromosoma Filadelfia. En algunas modalidades, el sujeto no tiene tratamiento previo. En algunas modalidades, el sujeto se ha convertido o se sospecha que se ha convertido en resistente o refractario a uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer. En algunas modalidades, el sujeto no es elegible para trasplante de células madre. En algunas modalidades, el sujeto se ha tratado con trasplante de células madre.

En algunas modalidades, un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de JAK2V617F y/o exón 9 de CALR mutante en un sujeto comprende administrar al sujeto que lo necesita cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, y en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición. En algunas modalidades, la afección clínica es un cáncer, una enfermedad mieloproliferativa, o una enfermedad cardiovascular.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto portador de la mutación JAK2V617F y/o del exón 9 de CALR comprende administrar al sujeto que lo necesita cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, y en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición.

En algunas modalidades, un método para tratar o prevenir una enfermedad mieloproliferativa en un sujeto comprende administrar al sujeto que lo necesita cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, y en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición. En algunas modalidades, la enfermedad mieloproliferativa se selecciona de mielofibrosis primaria (MPN), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria (PFM), mielofibrosis secundaria, leucemia mieloide aguda (AML), AML secundaria, leucemia mielógena crónica (CML), hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) y leucemia mielomonocítica crónica (CMML).

En algunas modalidades, un método para tratar el cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto que lo necesita cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, y en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición. En algunas modalidades, el cáncer se selecciona de un cáncer de pulmón, cáncer linfoide, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, mieloma de células plasmáticas, cáncer del tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de colon, cáncer del tracto urinario, cáncer del sistema nervioso central, neuroblastomas, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer testicular, y cáncer de tejido blando.

En algunas modalidades, un método para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende cualquiera de las composiciones descritas en la presente

descripción, y en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición. En algunas modalidades, la enfermedad cardiovascular se selecciona de un síndrome coronario agudo, una enfermedad cerebrovascular isquémica, una enfermedad cardíaca isquémica, una trombosis, una tromboembolia venosa, una trombosis venosa profunda, una embolia pulmonar, una trombosis intraabdominal catastrófica, una enfermedad arterial periférica, una hipertensión, una insuficiencia cardíaca, una fibrilación auricular, una enfermedad cardíaca coronaria, una aterosclerosis, y una hematopoyesis clonal.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos o un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos o un vector que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos, en donde las secuencias de epítopos se seleccionan de:

- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 (MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRR TRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- Epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 (EEAEDNCRRMMRTK) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 (KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;

- Epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos.

En cualquiera de los métodos de la presente descripción, la composición que se administra a un sujeto puede comprender un vector seleccionado de un adenovirus, un vector de alfavirus, un vector de poxvirus, un vector de virus asociado a adeno, un vector de retrovirus, una molécula de ARN autorreplicante, y una combinación de estos. En algunas modalidades, el vector se selecciona de un vector de Ad26, un vector de MVA, un vector de GAd20, una molécula de ARN autorreplicante, y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden una o más administraciones de las composiciones proporcionadas en la descripción. Por ejemplo, el método comprende una primera administración seguida de una segunda administración con un período de tiempo entre las dos administraciones.

En algunas modalidades, la primera administración y la segunda administración pueden comprender la misma o diferentes composiciones. Por ejemplo, la primera administración puede comprender una composición que comprende un vector seleccionado del vector de Ad26, vector de GAd20, vector de MVA o la molécula de ARN autorreplicante que codifica secuencias de epítopos representadas por la sec. núm.: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda administración puede comprender una composición que comprende un vector seleccionado del vector de Ad26, vector de GAd20, vector de MVA o la molécula de ARN autorreplicante que codifica secuencias de epítopos representadas por la sec. núm.: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera administración y la segunda administración se administran una vez durante la vida del sujeto. En algunas modalidades, la primera administración y la segunda administración se administran dos o más veces durante la vida del sujeto.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la primera administración y la segunda administración es aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 24 semanas, o aproximadamente 1 semana a aproximadamente 52 semanas.

En otras modalidades, el período de tiempo entre la primera administración y la segunda administración es aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas,

aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas aproximadamente 50 semanas aproximadamente 51 semanas, o aproximadamente 52 semanas.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la primera administración y la segunda administración es aproximadamente 2 semanas.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la primera administración y la segunda administración es aproximadamente 4 semanas.

En algunas modalidades, la primera administración y la segunda administración constituyen un ciclo, y el régimen de tratamiento puede incluir dos o más ciclos, cada ciclo con una separación de aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para describir mejor algunas de las modalidades descritas en la presente descripción. Se pretende que los

ejemplos ilustren, y no limiten, las modalidades descritas. En algunas modalidades, la primera administración y la segunda administración pueden comprender cualquier combinación de vectores proporcionados en la Tabla 1 o cualquier combinación de epítopos proporcionados en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 1. Composición de vector en la primera y segunda administración

Primera administración	**Segunda administración**
Ad26	MVA
Ad26	GAd20
Ad26	Molécula de ARN autorreplicante
Ad26	Ad26
MVA	Ad26
MVA	GAd20
MVA	Molécula de ARN autorreplicante
MVA	MVA
GAd20	Ad26
GAd20	MVA
GAd20	Molécula de ARN autorreplicante
GAd20	GAd20
Molécula de ARN autorreplicante	Ad26
Molécula de ARN autorreplicante	MVA
Molécula de ARN autorreplicante	GAd20
Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante

Tabla 2. Epítopos presentes en la composición de vector de la primera y segunda administración.

Cohorte de vacuna	Primera administración	SEQ ID NO:	Segunda administración	SEQ ID NO:
1	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6
2	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2 + epítopo 1 de JAK2	1, 2, 6, 5
3	CALR-JAK2-2x9 mer	12	CALR-JAK2-2x9 mer	12
4	CALR-JAK2-30 mer	13	CALR-JAK2-30 mer	13
5	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10
6	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31
7	LS_CALR-JAK2-30 mer	11	LS_CALR-JAK2-30 mer	11
8	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31
9	Epítopo 2 de JAK2	6	Epítopo 2 de JAK2	6
10	CALR-JAK2-2x9 mer	12	Epítopo 2 de JAK2	6
11	CALR-JAK2-30 mer	13	Epítopo 2 de JAK2	6
9	la patente núm. JAK2epitope2.AAY. JAK2epitope2	28	la patente núm. JAK2epitope2.AAY. JAK2epitope2	28
10	CALR-JAK2-2x9 mer	12	la patente núm. JAK2epitope2.AAY. JAK2epitope2	28
11	CALR-JAK2-30 mer	13	la patente núm. JAK2epitope2.AAY. JAK2epitope2	28

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el

vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de Ad26; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de Ad26.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el

vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

Tercera administración

En algunas modalidades, cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción puede comprender además una tercera administración. Por ejemplo, el método puede comprender una primera administración, una segunda administración, seguida de una tercera administración, con un período de tiempo entre cada administración.

En algunas modalidades, la primera administración, segunda administración, y tercera administración pueden comprender la misma o diferentes composiciones. Por ejemplo, la primera administración puede comprender una composición que comprende un vector seleccionado del vector de Ad26, vector de GAd20, vector de MVA o la molécula de ARN autorreplicante que codifica secuencias de epítopos representadas por la sec. núm.: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la segunda administración puede comprender una composición que comprende un vector seleccionado del vector de Ad26, vector de GAd20, vector de MVA o la molécula de ARN autorreplicante que codifica secuencias de epítopos representadas por la sec.

núm.: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 6. En algunas modalidades, la tercera administración puede comprender una composición que comprende un vector seleccionado del vector Ad26, vector GAd20, vector MVA o la molécula de ARN autorreplicante que codifica secuencias de epítopos representadas por la sec. núm.: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera administración, la segunda administración, y la tercera administración se administran una vez durante la vida del sujeto. En algunas modalidades, la primera, la segunda, y la tercera administración se administran dos o más veces durante la vida del sujeto.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la segunda administración y la tercera administración es aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 24 semanas, o aproximadamente 1 semana a aproximadamente 52 semanas.

En otras modalidades, el período de tiempo entre la segunda administración y la tercera administración es aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas,

aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente 30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas aproximadamente 50 semanas aproximadamente 51 semanas o aproximadamente 52 semanas.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la segunda administración y la tercera administración es aproximadamente 6 semanas.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la segunda administración y la tercera administración es de aproximadamente 8 semanas.

En algunas modalidades, la primera administración, segunda administración, y tercera administración juntas constituyen un ciclo, y el régimen de tratamiento puede incluir dos o más ciclos, cada ciclo con una separación de aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses,

aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para describir mejor algunas de las modalidades descritas en la presente descripción. La primera, segunda, y tercera administración usadas en los métodos descritos en la presente descripción pueden comprender cualquier combinación de los epítopos y composiciones proporcionadas en la Tabla 3 y Tabla 4 más abajo.

Tabla 3. Los epítopos presentes en la composición de vector de la primera, segunda, y tercera administración

Cohorte de vacuna	Primera administración	SEQ ID NO:	Segunda administración	Sec. con núms. de ident.:	Tercera administración	SEQ ID NO:
1	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6
2	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2	1, 2, 6	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2 + epítopo 1 de JAK2	1, 2, 6, 5	Epítopo 1 y 2 de CALR1 + epítopo 2 de JAK2 + epítopo 1 de JAK2	1, 2, 6, 5
3	CALR-JAK2-2x9 mer	12	CALR-JAK2-2x9 mer	12	CALR-JAK2-2x9 mer	12
4	CALR-JAK2-30 mer	13	CALR-JAK2-30 mer	13	CALR-JAK2-30 mer	13
5	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10
6	LS_CALR-JAK2-2x9 mer	10	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31

7	LS_CALR-JAK2-30 mer	11	LS_CALR-JAK2-30 mer	11	LS_CALR-JAK2-30 mer	11
8	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31	TCE_CALR-JAK2-2x9 mer	31
9	Epítopo 2 de JAK2	6	Epítopo 2 de JAK2	6	Epítopo 2 de JAK2	6

Tabla 4. Composición de vector en la primera, segunda y tercera administración

Primera administración	**Segunda administración**	**Tercera administración**
Ad26	Ad26	Ad26
Ad26	Ad26	MVA
Ad26	Ad26	GAd20
Ad26	Ad26	Molécula de ARN autorreplicante
Ad26	MVA	Ad26
Ad26	MVA	MVA
Ad26	MVA	GAd20
Ad26	MVA	Molécula de ARN autorreplicante
Ad26	GAd20	Ad26
Ad26	GAd20	MVA
Ad26	GAd20	GAd20
Ad26	GAd20	Molécula de ARN autorreplicante
Ad26	Molécula de ARN autorreplicante	Ad26
Ad26	Molécula de ARN autorreplicante	MVA
Ad26	Molécula de ARN autorreplicante	GAd20
Ad26	Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante
MVA	Ad26	Ad26

MVA	Ad26	MVA
MVA	Ad26	GAd20
MVA	Ad26	Molécula de ARN autorreplicante
MVA	MVA	Ad26
MVA	MVA	MVA
MVA	MVA	GAd20
MVA	MVA	Molécula de ARN autorreplicante
MVA	GAd20	Ad26
MVA	GAd20	MVA
MVA	GAd20	GAd20
MVA	GAd20	Molécula de ARN autorreplicante
MVA	Molécula de ARN autorreplicante	Ad26
MVA	Molécula de ARN autorreplicante	MVA
MVA	Molécula de ARN autorreplicante	GAd20
MVA	Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante
GAd20	Ad26	Ad26
GAd20	Ad26	MVA
GAd20	Ad26	GAd20
GAd20	Ad26	Molécula de ARN autorreplicante
GAd20	MVA	Ad26
GAd20	MVA	MVA
GAd20	MVA	GAd20
GAd20	MVA	Molécula de ARN autorreplicante
GAd20	GAd20	Ad26
GAd20	GAd20	MVA
GAd20	GAd20	GAd20

GAd20	GAd20	Molécula de ARN autorreplicante
GAd20	Molécula de ARN autorreplicante	Ad26
GAd20	Molécula de ARN autorreplicante	MVA
GAd20	Molécula de ARN autorreplicante	GAd20
GAd20	Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante
Molécula de ARN autorreplicante	Ad26	Ad26
Molécula de ARN autorreplicante	Ad26	MVA
Molécula de ARN autorreplicante	Ad26	GAd20
Molécula de ARN autorreplicante	Ad26	Molécula de ARN autorreplicante
Molécula de ARN autorreplicante	MVA	Ad26
Molécula de ARN autorreplicante	MVA	MVA
Molécula de ARN autorreplicante	MVA	GAd20
Molécula de ARN autorreplicante	MVA	Molécula de ARN autorreplicante
Molécula de ARN autorreplicante	GAd20	Ad26
Molécula de ARN autorreplicante	GAd20	MVA
Molécula de ARN autorreplicante	GAd20	GAd20
Molécula de ARN autorreplicante	GAd20	Molécula de ARN autorreplicante
Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante	Ad26
Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante	MVA

Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante	GAd20
Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante	Molécula de ARN autorreplicante

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante. y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el

vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante;

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es Ad26;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es Ad26; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es MVA.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o

retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es Ad26;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es MVA; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es MVA.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es GAd;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es GAd; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es MVA.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de

JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un ARN autorreplicante; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es MVA.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más

repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

Cuarta administración

En algunas modalidades, cualquiera de los métodos descritos en la presente descripción puede comprender además una cuarta administración. Por ejemplo, el método puede comprender una primera administración, una segunda administración, una tercera administración y una cuarta administración con un período de tiempo entre cada administración. En algunas modalidades, la primera administración, segunda administración, tercera administración, y cuarta administración pueden comprender la misma o diferentes composiciones.

Por ejemplo, la cuarta administración puede comprender una composición que comprende un vector seleccionado del vector Ad26, vector GAd20, vector MVA o la molécula de ARN autorreplicante que codifica secuencias de epítopos representadas por la sec. núm.: 1, la SEQ ID NO: 2, la SEQ ID NO: 4, la SEQ ID NO: 5, y la SEQ ID NO: 6.

En algunas modalidades, la primera administración, la segunda administración, la tercera administración, y la cuarta administración se administran

una vez durante la vida del sujeto. En algunas modalidades, la primera, segunda, tercera, y la cuarta administración se administran dos o más veces durante la vida del sujeto.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la tercera administración y la cuarta administración es aproximadamente 1 semana a aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 1 semana a aproximadamente 24 semanas, o aproximadamente 1 semana a aproximadamente 52 semanas.

En otras modalidades, el período de tiempo entre la tercera administración y la cuarta administración es aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, aproximadamente 17 semanas, aproximadamente 18 semanas, aproximadamente 19 semanas, aproximadamente 20 semanas, aproximadamente 21 semanas, aproximadamente 22 semanas, aproximadamente 23 semanas, aproximadamente 24 semanas, aproximadamente 25 semanas, aproximadamente 26 semanas, aproximadamente 27 semanas, aproximadamente 28 semanas, aproximadamente 29 semanas, aproximadamente

30 semanas, aproximadamente 31 semanas, aproximadamente 32 semanas, aproximadamente 33 semanas, aproximadamente 34 semanas, aproximadamente 35 semanas, aproximadamente 36 semanas, aproximadamente 37 semanas, aproximadamente 38 semanas, aproximadamente 39 semanas, aproximadamente 40 semanas, aproximadamente 41 semanas, aproximadamente 42 semanas, aproximadamente 43 semanas, aproximadamente 44 semanas, aproximadamente 45 semanas, aproximadamente 46 semanas, aproximadamente 47 semanas, aproximadamente 48 semanas, aproximadamente 49 semanas aproximadamente 50 semanas aproximadamente 51 semanas o aproximadamente 52 semanas.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la tercera administración y la cuarta administración es aproximadamente 4 semanas.

En algunas modalidades, el período de tiempo entre la tercera administración y la cuarta administración es aproximadamente 8 semanas.

En algunas modalidades, la primera administración, segunda administración, tercera administración, y la cuarta administración juntas constituyen un ciclo, y el régimen de tratamiento puede incluir dos o más ciclos, cada ciclo con una separación de aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses, aproximadamente 11 meses, o aproximadamente 12 meses.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante

JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el

vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es el vector de MVA; y

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades, un método para inducir una respuesta inmunitaria o un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto comprende un ciclo de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

Administración de mantenimiento

En algunas modalidades, el método comprende además administrar al sujeto una composición en intervalos regulares durante los ciclos de tratamiento, y puede continuar incluso después de que los ciclos de tratamiento hayan terminado. Por ejemplo, la composición puede administrarse a un sujeto cada mes durante el régimen de tratamiento, y puede continuar durante 6 meses adicionales. En algunas modalidades, la composición puede administrarse entre ciclos de tratamiento. En algunas modalidades, la composición puede ser cualquiera de las composiciones descritas en la presente descripción, tal como una composición que comprende un vector seleccionado de los vectores Ad26, vectores GAd20, vectores MVA, o una molécula de ARN autorreplicante que codifica las secuencias de epítopo

Dosis y vía de administración

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden vectores de adenovirus se administran en una dosis de aproximadamente $1x10^4$ IFU (unidades infecciosas) a aproximadamente $1x10^{12}$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^{11}$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^{10}$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a

aproximadamente $1x10^9$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^8$ IFU por dosis, o de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^6$ IFU por dosis.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden adenovirus recombinante se administran en una dosis de aproximadamente $1x10^6$ PV (partículas de virus) a aproximadamente $1x10^{14}$ PV por dosis, de aproximadamente $1x10^6$ PV a aproximadamente $1x10^{12}$ PV por dosis, de aproximadamente $1x10^6$ PV a aproximadamente $1x10^{10}$ PV por dosis, de aproximadamente $1x10^6$ PV a aproximadamente $1x10^8$ PV por dosis, o de aproximadamente $1x10^6$ PV a aproximadamente $1x10^7$ por dosis.

En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de Ad26 se administra a aproximadamente $1x10^{10}$ IFU por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de Ad26 se administra a aproximadamente $1x10^{11}$ IFU por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de Ad26 se administra a aproximadamente $1x10^{10}$ VP por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de Ad26 se administra a aproximadamente $1x10^{11}$ VP por dosis.

En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de GAd20 se administra a aproximadamente $1x10^8$ IFU por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de GAd20 se administra a aproximadamente $1x10^{10}$ IFU por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de GAd20 se administra a aproximadamente $1x10^{10}$ VP por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de GAd20 se administra a aproximadamente $1x10^{11}$ VP por dosis.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden poxvirus recombinante se administran en una dosis de aproximadamente $1x10^4$ IFU (unidades infecciosas) a aproximadamente $1x10^{12}$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^{11}$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^{10}$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^9$ IFU por dosis, de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^8$ IFU por dosis, o de aproximadamente $1x10^4$ IFU a aproximadamente $1x10^6$ IFU por dosis.

En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de MVA se administra desde aproximadamente $1x10^8$ IFU por dosis. En algunas modalidades, la composición que comprende el vector de MVA se administra desde aproximadamente $1x10^{10}$ IFU por dosis.

En algunas modalidades, las composiciones que comprenden una molécula de ARN autorreplicante se administra en una dosis de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 100 microgramo, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 90 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 80 microgramo, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 70 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 60 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 50 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 40 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 30 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 20 microgramos, de aproximadamente 1 microgramo a

aproximadamente 10 microgramos, o de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 5 microgramos de la molécula de ARN autorreplicante.

En algunas modalidades las composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse a un sujeto mediante una variedad de vías, tales como subcutánea, tópica, oral e intramuscular. La administración de las composiciones puede lograrse oral o parenteralmente. Los métodos de administración parenteral incluyen la administración tópica, intraarterial (directamente al tejido), intramuscular, subcutánea, intramedular, intratecal, intraventricular, intravenosa, intraperitoneal o intranasal. La presente descripción también tiene el objetivo de proporcionar formulaciones tópicas, orales, sistémicas y parenterales adecuadas para su uso en los métodos de profilaxis y tratamiento.

En algunas modalidades, la administración intramuscular de la composición de la vacuna puede lograrse usando una aguja. Una alternativa es el uso de un dispositivo de inyección sin aguja para administrar la composición (usando, p. ej., BiojectorTM) o un polvo liofilizado que contiene la composición de la vacuna. Para la inyección intravenosa, cutánea o subcutánea, o la inyección en el sitio de la molestia, la composición puede ser en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, libre de pirógenos y con un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son muy capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de lactato de Ringer. Se pueden incluir conservantes, estabilizantes, reguladores, antioxidantes y/u otros aditivos, según sea necesario. También puede usarse una formulación de liberación lenta.

Típicamente, la administración tendrá un objetivo profiláctico para generar una respuesta inmunitaria contra CALR mutante y/o JAK2 mutante antes del desarrollo de síntomas clínicos. Las composiciones de la descripción se administran a un sujeto, dando lugar a una respuesta inmunitaria en el sujeto. La cantidad de la composición puede ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria detectable se define como una "dosis inmunológicamente efectiva". Las composiciones de la descripción pueden inducir una respuesta inmunitaria humoral, así como una respuesta inmunitaria mediada por células. En una modalidad típica, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora.

La cantidad real administrada, y la velocidad y la secuencia temporal de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se trata. La prescripción de tratamiento, p. ej., decisiones sobre la dosificación, etc., se encuentra dentro de la responsabilidad de los profesionales generales y otros médicos y, típicamente, toma en cuenta el trastorno que se va a tratar, el estado del paciente individual, el sitio de suministro, el método de administración y otros factores conocidos por los profesionales.

En un régimen ilustrativo, la composición que comprende el vector de adenovirus se administra (p. ej., por vía intramuscular) en un volumen que varía entre aproximadamente 100 µl a aproximadamente 10 ml que contiene concentraciones de aproximadamente 10^4 a 10^{12} partículas de virus/ml. La composición de vector de adenovirus puede administrarse en un volumen que varía entre 0,25 y 1,0 ml, tal como en un volumen de 0,5 ml.

En un régimen ilustrativo, la composición que comprende el vector de MVA se administra (p. ej., intramuscularmente) en un volumen que varía entre

aproximadamente 100 µl y aproximadamente 10 ml de solución salina que contiene una dosis de aproximadamente lxl0^7 $TCID_{50}$ a lx10^9 $TCID_{50}$ (dosis infecciosa de cultivo tisular al 50 %) o un. inf. (unidad infecciosa). La composición de vector de MVA puede administrarse en un volumen que varía entre 0,25 y 1,0 ml.

Segundo agente terapéutico

En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente descripción comprenden además administrar un segundo agente terapéutico. En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un agente inmunoestimulante, un agente quimioterapéutico, un antibiótico, un inhibidor del punto de regulación, o una terapia celular.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico se selecciona de un anticuerpo de CTLA-4, un ligando de CTLA4, un inhibidor del eje PD-1, un inhibidor del eje PD-L1, un agonista de TLR, un agonista de CD40, un agonista de OX40, hidroxiurea, ruxolitinib, fedratinib, un agonista de 41BB, un agonista de CD28, un antagonista de STING, un antagonista de RIG-1, terapia TCR-T, terapia CAR-T, ligando de FLT3, sulfato de aluminio, inhibidor de BTK, inhibidor de JAK, anticuerpo de CD38, inhibidor de CDK, anticuerpo de CD33, anticuerpo de CD37, anticuerpo de CD25, inhibidor de GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-7, moléculas de redireccionamiento de CD3, pomalimib, IFNγ, IFNα, TNFα, anticuerpo de VEGF, anticuerpo de CD70, anticuerpo de CD27, anticuerpo de BCMA o anticuerpo de GPRC5D, y combinaciones de estos.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de punto de regulación que se selecciona de pilimumab, cetrelimab, pembrolizumab, nivolumab, sintilimab, cemiplimab, toripalimab, camrelizumab, tislelizumab, dostralimab, spartalizumab, prolgolimab, balstilimab, budigalimab, sasanlimab, avelumab, atezolizumab, durvalumab, envafolimab, o iodapolimab, o cualquier combinación de estos.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico es el inhibidor de JAK.

En algunas modalidades, el segundo agente terapéutico puede administrarse en combinación con una primera composición de la primera administración o una segunda composición de la segunda administración o una tercera composición de la tercera administración, o una cuarta composición de la cuarta administración.

En algunas modalidades, el anticuerpo anti-CTLA-4 se combina con cualquiera de la primera, o la segunda, o la tercera, o la cuarta administración de la composición de la descripción.

En algunas modalidades, el anti-PD-1 o el anticuerpo anti-PD-L1 se combina con cualquiera de la primera, o la segunda, o la tercera, o la cuarta administración de la composición de la descripción.

En algunas modalidades, los inhibidores de puntos de regulación se administran en una dosis de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/kg, aproximadamente 15 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 25 mg/kg, aproximadamente 20 a

aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 25 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 50 a aproximadamente 75 mg/kg, aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 75 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 100 a aproximadamente 125 mg/kg, aproximadamente 125 a aproximadamente 150 mg/kg, aproximadamente 150 a aproximadamente 175 mg/kg, aproximadamente 175 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 200 a aproximadamente 225 mg/kg, aproximadamente 225 a aproximadamente 250 mg/kg, o aproximadamente 250 a aproximadamente 300 mg/kg.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación del epítopo 2 de JAK2 V617F y evaluación de inmunogenicidad in silicio de epítopos JAK2 V617F

Se generó una secuencia de 17 mer de la proteína JAK2 con la mutación V617F como residuo central, y todos los 9 mer de aminoácidos contiguos que están contenidos en esta secuencia de 17 mer. Las predicciones in silicio de la afinidad de unión de estos 9 mer a los alelos HLA-A y HLA-B comunes se predijeron usando netMHCpan4.0. Las predicciones de unión se categorizaron en tres categorías de unión débil (afinidad prevista > 500 nM); unión moderada (afinidad prevista entre 50 nM A 500 nM) y unión fuerte (afinidad prevista < 50 nM) para alelos HLA-A de origen común. Se seleccionaron el epítopo 1 de JAK2 de 9 mer de la SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC) y un nuevo epítopo 2 de JAK2 de 9 mer de la SEQ ID NO: 6 (FCGDENILV) de este análisis para un seguimiento experimental adicional. El péptido de la SEQ ID NO: 6 no se ha descrito

previamente como un fragmento de JAK2 inmunogénico. La afinidad de unión prevista del epítopo 2 de JAK2 mostrado en la Tabla 5 es menor que la unión del epítopo 1 de JAK2.

Tabla 5. Afinidad del epítopo 2 de JAK2. Las categorías de unión son no aglutinantes = rango > 2,0; aglutinantes moderados = rango entre 0,5 a 2,0; aglutinantes fuertes = rango < 0,5.

Alelo	Afinidad de unión nM	Rango de unión
HLA-A01:01	22680	11
HLA-A02:01	2878	7
HLA-A03:01	42208	84
HLA-A24:02	41245	52
HLA-B07:02	40322	66
HLA-B08:01	35548	69
HLA-B15:01	38417	76
HLA-B27:05	40573	84
HLA-B40:01	39076	44

Ejemplo 2: La inmunogenicidad de los epítopos JAK2 mutantes en comparación con JAK2 de tipo silvestre en muestras de pacientes con la enfermedad

Las PBMC se aislaron de pacientes con trombocitemia esencial (ET) o de mielofibrosis primaria (PMF) con una mutación JAK617F confirmada. Los péptidos muJAK2 o JAK2 de tipo silvestre asociados a Clase-I Individual se administraron exógenamente en una concentración de 5 µg/ml a 250.000 PBMC en el día 0. Las células se cultivaron durante 10 días en presencia de 10 IU/ml de IL-2 humana y 10 ng/ml de IL-15 humana, y posteriormente se evaluaron para determinar la frecuencia de células T específicas del antígeno JAK2 de tipo mutante o silvestre

mediante el recuerdo del péptido y el análisis de citometría de flujo de tinción intracelular para la producción de IFNγ y TNFα de células T CD8+. Una respuesta específica del antígeno se consideró positiva si la frecuencia de células T CD8+ de IFNγ/TNFα + fue tres veces mayor en comparación con las células tratadas con células con DMSO solamente en el Día 0 y más de 0,1 %. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6

Enfermedad	**Número del donante**	**Antígenos virales de control Respuesta CEF**	**Epítopo 2 de JAK2 mutante**	**Epítopo 1 de JAK2 mutante**	**Epítopo 2 de JAK2 de tipo silvestre**	**Epítopo 1 de JAK2 de tipo silvestre**
PMF	120174174	Sí	Sí (30 %)	No	No	No
PMF	120250311	Sí	No	No	No	No
PMF	120800910	No	No	No	No	No
PMF	120800936	Sí	Sí (0,63 %)	Sí (0,62 %)	No	No
PMF	120817869	Sí	No	No	No	No
ET	120708928	Sí	No	No	No	No
ET	120815833	Sí	Sí (30,6 %)	No	No	Sí (1,3 %)
ET	120824685	Sí	No	No	No	No

SÍ indica un aumento de 3 veces en la frecuencia de células T CD8+ de IFNγ/TNFα + en comparación con las células estimuladas con DMSO solamente para cada donante. Los paréntesis indican la frecuencia real de células T CD8+ de IFNγ/TNFα +.

La Figura 1 muestra la inmunogenicidad del epítopo 1 de JAK2 y el epítopo 2 de JAK2 en las muestras de pacientes con enfermedad en comparación con las secuencias de tipo silvestre de las mismas regiones de epítopos. También se evaluaron las secuencias de péptidos de tipo silvestre correspondientes para los epítopos I y II de mutJAK2 y se demostró que tienen respuestas similares al control con DMSO.

Ejemplo 3: Diseño y generación de los polinucleótidos y polipéptidos de CALR.JAK2 para la expresión de Ad26 y MVA

Para seleccionar una composición de vacuna que resultó en una buena expresión de antígeno y activación de células T, se diseñó y evaluó una serie de polinucleótidos y polipéptidos de CALR.JAK2.

Las mutaciones CALR tipo 1 y tipo 2 se incluyeron en el polinucleótido. En base a los estudios *in silicio* de predicción de los epítopos de células T y unión a HLA, un péptido 54 mer (SEQ ID NO: 1) del CALR mutante tipo 1 y un péptido 14 mer truncado (SEQ ID NO: 2) de la proteína tipo 2 de CALR mutante se incluyeron en el polinucleótido. La porción CALR del polinucleótido codifica la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 3. Para asegurar un buen procesamiento intracelular de todas las proteínas, los péptidos individuales se conectaron mediante enlazadores AAY (ala-ala-tir) que promueven la escisión proteasomal.

También basado en los estudios *in silico* de predicción de los epítopos de células T y unión a HLA, se incluyeron dos péptidos de JAK2 distintos, un péptido 30 mer (SEQ ID NO: 4) o dos péptidos 9 mer (SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6), cada uno de los cuales contenía la mutación V617F. El péptido de la SEQ ID NO: 6 no se ha descrito antes como un fragmento de JAK2 inmunogénico.

Para asegurar un buen procesamiento intracelular de todas las proteínas, los péptidos individuales también se conectaron mediante enlazadores AAY (ala-ala-tir) que promueven la escisión proteasomal. La SEQ ID NO: 7 representa la secuencia de aminoácidos de los dos 9 mer de JACK2 separados por el enlazador AAY.

Se diseñaron dos constructos diferentes en los cuales las porciones de CALR fueron idénticas, pero la porción de JAK2 fue ya sea el péptido 30 mer o los dos péptidos 9 mer. Estos dos transgenes diferentes se diseñaron con ya sea ninguna secuencia líder (LS, por sus siglas en inglés), una LS HAVT20 (MACPGFLWALVISTCLEFSMA; SEQ ID NO: 8), o una señal de ubiquitina (Ubiq) (MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKE STLHLVLRLRGV; SEQ ID NO: 54) en el N-terminal. Los constructos se enumeran en la Tabla 3. La LS HAVT20 deberá dirigir el transgén hacia el ER, mientras que la secuencia de ubiquitina dirige la proteosoma. Esto podría resultar en diferentes niveles de expresión del TG entre los constructos. Además, se generó un constructo que codifica solamente la secuencia de dos proteínas de CALR mutante, el cual se usó como un control para la expresión de la proteína de CALR. La secuencia de proteína y polinucléotido de los transgenes se muestran en la Tabla 7. Las secuencias de polinucleótidos que se muestran se optimizaron para la expresión de adenovirus.

Tabla 7. Constructos para la expresión de adenovirus

Nombre del constructo	Secuencias de CALR mutante	Secuencias de mutante JAK2
LS_CALR	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	Ninguno
LS_CALR_JAK2-2x9mer	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	2x9 mer
LS_CALR_JAK2-30mer	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	30mer
CALR_JAK2-2x9mer	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	2x9 mer
CALR_JAK2-30mer	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	30mer
Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	2x9 mer
Ubiq_CALR_JAK2-30mer	Mutante de CALR tipo 1, mutante de CALR tipo 2 truncado	30mer
LS: secuencia líder; Ubiq: ubiquitina		

Tabla 8. Polipéptido de CALR.JAK2 con la sec. de ident. y las sec. con núms. de ident.

nombre del constructo	Proteína SEQ ID NO:	Polinucleótido de la SEQ ID NO:
LS_CALR	9	16
LS_CALR_JAK2-2x9mer	10	17
LS_CALR_JAK2-30mer	11	18
CALR_JAK2-2x9mer	12	19
CALR_JAK2-30mer	13	20
Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	14	21

Ubiq_CALR_JAK2-30mer	15	22

Los constructos de CALR.JAK2 se clonaron en el plásmido lanzadera pUC57 usando los métodos estándar para la expresión de adenovirus. El casete de expresión consistió en un promotor de citomegalovirus (CMV) que contuvo un operador de tetraciclina (TetO), para permitir su uso en combinación con la línea celular PER.C6 TetR, una secuencia de Kozak, el polinucleótido de CALR.JAK2 y la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40) flanqueado por secuencias específicas de Ad26 fuera del casete de expresión. Estas secuencias flanqueantes específicas de Ad26 se homologaron a la secuencia del plásmido de la cadena principal de Ad26 para asegurar la generación del plásmido mediante recombinación homóloga. La secuencia se optimizó en genes humanos para mejorar la expresión transgénica.

Para probar la expresión de CALR.JAK2 mediante estos diferentes constructos, se transfectaron células HEK293 con los plásmidos de ADN respectivos y se examinó la expresión en los lisadoscelulares mediante Western blot 72 horas después de la transfección. Además, la actividad del proteasoma se inhibió añadiendo el inhibidor de proteasoma MG132 4 horas antes de recolectar las muestras para examinar el efecto sobre la expresión del transgén. Todos los constructos expresaron los epítopos de CALR.JAK2 y se observó la expresión más alta para los constructos con HAVT20 LS. La inhibición de proteasoma mejoró modestamente la expresión del transgén por los constructos con una señal de ubiquitina, pero esta diferencia no pudo cuantificarse mediante Western blot. Basado en los datos de expresión de CALR.JAK2, se seleccionaron los dos

constructos con secuencia líder (LS) HATV20 para la producción de adenovirus, es decir, Ad26.LS_CALR_JAK2-30 mer (Ad26HEME001) y Ad26.LS_CALR_JAK2-2x9 mer (Ad26HEME002). Además, se produjo Ad26-LS-CALR (AD26HEME003) para servir como un posible control. La secuencia de polinucleótidos de Ad26HEME001 que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) que contiene operador de tetraciclina (TetO), una secuencia de Kozak, CALR,JAK2 y la señal de poliadenilación de virus de simio 40 (SV40) se muestra en la SEQ ID NO: 23. La secuencia de polinucleótidos de Ad26HEME002 que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) que contiene operador de tetraciclina (TetO), una secuencia de Kozak, CALR.JAK2 y la señal de poliadenilación de virus de simio 40 (SV40) se muestra en la SEQ ID NO: 24.

Para seleccionar la línea celular para la producción de Ad26HEME001 y Ad26HEME002, se midió la capacidad de rescate del virus mediante la transfección del ADN del genoma viral en PER.C6® en comparación con las células PER.C6 TetR. El efecto citopático (CPE) y la formación de placa (que muestran juntos la capacidad de rescate) fueron comparables entre los constructos Ad26HEME001 y Ad26HEME002 (Tabla 9). En resumen, ambos constructos mostraron CPE completo dentro de 8 días en PER.C6 TetR, pero no en las células PER.C6®. Ad26HEME001 y Ad26HEME002 mostraron aproximadamente 13 y aproximadamente 11 placas, respectivamente, en células PER.C6® y > 100 placas en células PER.C6 TetR para transfecciones cofáciles en el Día 8. Esto indicó que la capacidad de rescate se inhibió en las células PER.C6®. Los vectores adenovirales que son difíciles de rescatar tienen características de productividad limitadas y tienen un alto riesgo de deleciones y mutaciones en el casete de expresión

transgénica. Basado en estos resultados, se seleccionó PER.C6 TetR como línea celular para la producción de virus de Ad26HEME001 y Ad26HEME002. También se produjo Ad26HEME003 en células PER.C6 TetR.

Tabla 9.

	CPE completo PER.C6® / PER.C6 TetR	Núm. de placas PER.C6® / PER.C6 TetR
Ad26HEME001	Sin CPE / < 8 días	13 / >100
Ad26HEME002	Sin CPE / < 8 días	11 / >100

Ejemplo 4: Generación de Ad26HEME001 y Ad26HEME002

Se generaron lotes de investigación a partir de células transfectadas con los plásmidos pAd26HEME001 (pAd26.LS_CALR_JAK2-30 mer), pAd26HEME002 (pAd26.LS_CALR_JAK2-2x9 mer), y pAd26HEME003 (pAd26.LS_CALR) de un solo genoma.

El ADN del plásmido pUC57 se usó para clonar el casete de expresión TG de la Región 1 (El) temprana de Ad26 en la cadena principal pAd26 para generar los plásmidos pAd26HEME001, pAd26HEME002 y pAd26HEME003. La región E1 en la cadena principal de pAd26 se eliminó para hacer que el vector sea incompetente para la replicación en células no complementarias como las células humanas. Además, se eliminó (ΔE3) una parte de la región de Región 3 (E3) temprana de Ad26 para crear espacio suficiente en el genoma viral para la inserción de antígenos externos, y el marco de lectura abierto (orf) 6 de la Región 4 (E4) temprana de Ad26 se intercambió por el homólogo de adenovirus Tipo 5 (Ad5) para permitir la producción de vectores Ad26 incompetentes para la replicación en líneas celulares

que complementan Ad5-E1 como células HEK293, PER.C6®, y HER96. La cadena principal de pAd26 se linealizó usando un sitio de restricción único (*Asi*SI) en la región en la que se introdujo después el casete TG. Ambos extremos de este plásmido linealizado contenían secuencias superpuestas homólogas a las secuencias específicas de Ad26 presentes en el exterior del casete de expresión del transgén E1. Esto permitió la generación de plásmidos clonando el casete del transgén en la cadena principal de pAd26 usando técnicas de recombinación homóloga. Se verificaron las secuencias de plásmido completas.

Para generar los vectores Ad26HEME001, Ad26HEME002 y Ad26HEME003, los plásmidos se transfectaron en células PER.C6 TetR. El virus se amplificó en células PER.C6 TetR, se purificó y se probó la integridad e identidad del genoma de adenovirus y la expresión correcta del TG.

Generación y caracterización de lotes

Se generaron y caracterizaron lotes de investigación de un Ad26HEME001, dos Ad26HEME002 y un Ad26HEME003 para evaluar la infectividad, la expresión transgénica, la estabilidad genética del lote y la productividad relativa en células TetR en suspensión PER.C6 (sPER.C6). Todos los lotes de investigación se generaron en células TetR PER.C6 adherentes. La calidad del lote se caracterizó por la expresión del antígeno codificado en condiciones de no replicación, el número de partículas víricas (PV) y unidades infecciosas (UI).

Todos los lotes de investigación producidos mostraron expresión del antígeno codificado como se muestra por Western blot y todos los lotes tenían relaciones PV/IU bajas. El lote de investigación de Ad26HEME001 mostró una relación VP/UI de 29. Los dos lotes de investigación de Ad26HEME002 mostraron

una relación PV/UI de 5, y Ad26HEME003 mostró una relación PV/UI de 8. Tanto la estabilidad genética como la productividad son importantes para la viabilidad de ampliar la producción de vectores adenovirales a material de ensayo clínico (CTM) o a escala comercial. El riesgo de inestabilidad genética definido por cambios en el genoma del vector y el crecimiento de una población con propiedades no deseadas durante la propagación en la línea celular de producción puede evaluarse mediante la propagación de varias poblaciones de virus a pequeña escala. Para todos los lotes de investigación, la estabilidad genética se evaluó en el material del lote final, mediante la reacción en cadena de la polimerasa de identidad (ID PCR) para la región del transgén, la región del gen E3 y la región del gen E4. Además, se secuenció el producto de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región transgénica. Se encontró que todos los lotes de investigación eran genéticamente estables.

Se evaluó la productividad (definida por títulos de PV/ml) en experimentos a pequeña escala comparando el vector candidato a vacuna con los respectivos controles de referencia, de los cuales se conoce el rendimiento en el biorreactor intensificado de proceso (PIN) de 10 litros. En resumen, se transdujeron células sPER.C6 TetR con 70, 300 y 900 PV/célula de material de lote de investigación purificado y dos controles de referencia de Ad26. Ad26HEME001, Ad26HEME002 y Ad26HEME003 mostraron una productividad comparable a la del control estándar a 70, 300 y 900 VP/celda, lo que indica que todos los tres vectores son buenos productores (controles mostraron resultados esperados) con ~10^{11} VP/ml producidos después de 2-3 días en cultivo.

La secuencia de polinucleótidos del vector de Ad26HEME002 que incluye los diversos elementos se muestra en la SEQ ID NO: 24 y las secuencias de aminoácidos codificadas por estas se muestran en la SEQ ID NO: 10.

Ejemplo 5: Generación del constructo de MVA.CALR.JAK2 y GAd20.CALR.JAK2

La secuencia de aminoácidos para el transgén CALR.JAK2 se convirtió en secuencia de nucleótidos basado en el uso de codones humanos. Se evitaron motivos de terminación para el vector de MVA (TTTTTnT). Después, se añadieron el sitio de restricción BamH1 y una secuencia de KOZAK corriente arriba de la secuencia de nucleótidos. Se añadieron dos codones de TERMINACIÓN seguidos por el sitio de restricción Asc1 corriente abajo de la secuencia de nucleótidos. Un polinucleótido de potenciador de células T (TCE) que codifica un pequeño fragmento peptídico con una longitud de 28aa de la cadena invariante del pez mandarín (; SEQ ID NO: 29) se colocó en el N-terminal del transgén. Los datos preclínicos mostraron que esta secuencia aumenta la respuesta inmunológica del vector viral. La síntesis del transgén se realizó usando métodos conocidos.

El transgén MVA clonado bajo el control del promotor temprano/tardío de vaccinia P7.5 (SEQ ID NO: 32) se insertó mediante recombinación homóloga en el locus deleción III de MVA (regiones FankIII-1 y -2) y las partículas de virus recombinante se produjeron usando métodos conocidos.

El transgén GAd20 se subclonó en un plásmido lanzadera entre el promotor CMV con dos repeticiones TetO y un polyA BGH a través de sitios de restricción EcoRI-Not1. El casete de expresión resultante se transfirió al genoma

GAd20 por recombinación homóloga en cepas *de E. coli* adecuadas, se transformó con el fragmento de ADN CMV-transgén-BGH y con un constructo que porta el genoma GAd20. La recombinación involucró a CMV y BGH como brazos de homología, que ya estaban presentes en el constructo de GAd20 en lugar de la deleción de E1 (sitio de inserción del transgén). Después, se rescataron los vectores GAd20 recombinantes por transfección de las células M9 que expresan TetR y complementan E1, y se amplificaron por reinfección posterior de células M9 frescas.

Los vectores MVA y GAd20 que expresan el polipéptido TCE_CALR_JAK2-2x9 mer (SEQ ID NO: 31) (HCalJ-9.9) se generaron mediante métodos conocidos.

Ejemplo 6: Los vectores de Ad26.CALR.JAK2 expresan, procesan y presentan el antígeno a las células T autólogas

El propósito de este estudio fue probar la capacidad de las células que presentan antígenos humanos (APC) para procesar y presentar los neoantígenos de la vacuna y generar respuestas de células T.

Se aislaron viales congelados de células T de $CD1c^+$ DC autólogas y $CD4^+/CD8^+$ autólogas a través de selección negativa de perlas magnéticas. Las $CD1c^+$ DC se infectaron con una multiplicidad de infección (MOI) de 50.000 PV durante la noche con Ad26HEME002 o Ad5HEME002 (vector Ad5 diseñado para expresar el transgén LS_CALR_JAK2-2x9 mer). De 18 a 24 horas después de la infección, se mezclaron células T autólogas de donantes idénticos con $CD1c^+$ DC en una relación 10:1. Se añadió IL-15 humana a 10 ng/ml al cultivo el Día 0 y se realizaron cambios de medio medio con 2× IL-15 e IL-2 (10 IU/ml) cada 2 a 3 días hasta el Día 11. El Día

11, los péptidos correspondientes a la proteína CALRmut, JAK2V617F o Adeno Hexon (control positivo) se añadieron al cultivo de células DC / T durante la noche junto con inhibidores del transporte de proteínas. Los cultivos resultantes se tiñeron para marcadores de células T (CD4, CD8, CD3) y marcadores de células T activadas (IFN-γ, TNF-α) y se analizaron por citometría de flujo. El aumento de la tinción de IFN-γ y TNF-α después de la estimulación durante la noche de péptidos en el Día 11 indicó la expansión de células T específicas del antígeno de CALR mutante y/o JAK2V617F específicamente debido a la expresión del transgén dirigida por Ad26/Ad5-HEME002. Se consideró como una respuesta positiva un aumento de 3 veces en las células T CD8 doble positivas para IFN-γ y TNF-α sobre el vector vacío Ad26/Ad5. Los criterios de exclusión fueron (i) respuestas de Adeno Hexon por debajo del 0,5 % de células T doble positivas para IFN-γ y TNF-α, o (ii) < 1 % de células T doble positivas para IFN-γ y TNF-α de antígeno viral (constructo de adeno CEF); en cuyo caso el experimento se consideró subóptimo y la respuesta negativa fue probablemente una falla técnica del donante o de la configuración experimental.

Se examinaron un total de 24 células donantes sanas únicas. La Figura 2 muestra un resultado representativo del análisis en un donante para respuestas de células T específicas de CALR mutante. En el experimento, las células se activaron en células vivas/CD3+/ CD8+ y se evaluó la tinción con IFN-γ y TNF-α. Se observaron ambas respuestas CD8 (clase I) y CD4 (clase II) después de la infección. Los experimentos se realizaron a través de 3 análisis independientes y la frecuencia de respuesta fue similar en todos los experimentos, aproximadamente 35 % independientemente del lugar donde se usará Ad26 o Ad5. La Figura 3 muestra que ambos epítopos de JAK2 incluidos en la vacuna (SEQ ID NO: 5 (VLNYGVCFC); epítopo

1 en la Figura 3 y la SEQ ID NO: 6; FCGDENILV epítopo 2 en la Figura 3) son inmunogénicos. La Figura 4 muestra un resultado representativo del análisis de un donante para respuestas de células T específicas del JAK2 mutante. Los datos demostraron que los neoepítopos mutantes JAK2 se procesaron de la secuencia transgénica de la vacuna indicando que estos epítopos pueden ser presentados por las células cancerosas. Los tipos de HLA de todos los donantes evaluados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10.

Donante	A1 de HLA	B1 de HLA	C1 de HLA	A2 de HLA	B2 de HLA	C2 de HLA
2480	03:01	15:03	2:10	23:01	44:02	05:01
013B	01:01	07:02	07:01	03:01	08:01	07:02
4384	24:02	35:01	04:01	30:01	42:01	07:01
118	02:01	14:02	01:01	68:02:00	27:05	8:02
676	1:01	08:01	3:04	32:01:00	15:01	7:01
274	03:01					
3942	02:02	08:01	03:04	03:01		07:02
240	03:01	15:03	02:10	23:01	44:02:00	5:01
644	03:01	07:02	06:02	66:01:00	13:02	7:02
359	1:01	07:02	07:01	03:01	08:01	07:01
538	02:01	27:05	1:02	03:01	38:01:00	12:03

Ejemplo 7: Los vectores de Ad26.CALR.JAK2 expresan respuestas celulares inducidas en ratones

El propósito del estudio fue probar si las respuestas de células T inducidas por Ad26HEME001 o A26HEME002 que contienen Ad26 eran más altas que las inducidas por el vector Ad26 vacío usando el ensayo de inmunospot enlazado a

enzima IFN-γ (ELISpot) y seleccionar la cepa de ratón para estudios de inmunogenicidad adicionales.

Las cepas de ratón C57BL/6 y Balb/c se probaron para este estudio de inmunogenicidad, ya que el análisis de predicción de epítopos mostró que estaban presentes epítopos de células T de CD8 potenciales en estas cepas de ratones. Se inyectó a los ratones una dosis de 10^{10} PV/ratón de Ad26HEME001 o Ad26HEME002, o un Ad26 que no codifica un transgén (Ad26.Empty). Se usaron grupos de péptidos superpuestos de 15 mer que abarcan el inserto Ad26HEME001 o Ad26HEME002 para evaluar la respuesta inmunitaria celular 14 días después de una vacunación de inducción (ELISpot de IFN-γ). Los grupos experimentales se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11.

Grupo	Núm. de animal	Descripción de los grupos	Cepa de ratón
1a	4	Dosis de Ad26.Empty de 10^{10} PV	C57BL/6
1b	4	Dosis de Ad26.Empty de 10^{10} PV	Balb/c
2	8	Dosis de Ad26HEME001 de 10^{10} PV	C57BL/6
3	8	Dosis de Ad26HEME002 de 10^{10} PV	C57BL/6
4	8	Dosis de Ad26HEME001 de 10^{10} PV	Balb/c
5	8	Dosis de Ad26HEME002 de 10^{10} PV	Balb/c

Se provocó una respuesta de células T específica de inserto 14 días después de la inducción, en ratones C57BL/6 y Balb/c según lo medido por ELISpot de IFN-γ, y hubo una respuesta inmunitaria significativamente mayor inducida en animales inmunizados con Ad26HEME001 (Figura 5) o Ad26HEME002 (Figura 6) sobre el inducido por animales inmunizados con Ad26.Empty. No se detectó respuesta inmunitaria celular contra el péptido LS (datos no mostrados). No hubo diferencia

significativa entre la respuesta inmunitaria inducida por los dos vectores al mirar a través de la cepa de ratón. Similarmente, no hubo una diferencia significativa entre la respuesta inmunitaria hacia el grupo de péptidos HEME001 inducida por Balb/c y C57BL/6 al observar los candidatos a vacuna. Hubo una diferencia significativa entre la respuesta inmunitaria hacia el grupo de péptidos HEME002 inducida por Balb/c y C57BL/6 al observar los candidatos a vacuna.

Ejemplo 8: Los vectores de Ad26.CALR.JAK2 y MVA.CALR.JAK2 inducen respuestas celulares en ratones

El propósito de estos estudios fue determinar si un vector de vaccinia modificado de Ankara (MVA) que codifica HCalJ-9.9 (es decir, MVA-HCalJ-9.9, MVAHEME002) podría estimular la respuesta inmunitaria inducida por una inmunización de inducción con Ad26HEME002 en ratones Balb/c. La cepa de ratón Balb/c se seleccionó en base a los datos descritos en el Ejemplo 7 donde se observó menos variación con la cepa de ratón Balb/c en comparación con la cepa de ratón C57BL/6.

En el primer estudio, Ad26HEME002 se dosificó a 10^{10} PV y MVA-HCalJ-9.9 se dosificó a 10^{7} IU. En la Semana 0, los ratones se inmunizaron mediante una inyección por vía IM con Ad26HEME002; la mitad de los animales no recibió una inmunización de refuerzo (Grupo 2) y la mitad de los animales recibió refuerzo en la Semana 3 con MVA-HCalJ-9.9 (Grupo 3). Otro grupo de ratones fue inmunizado (inducción) con MVA-HCalJ-9.9 en la Semana 3 (Grupo 1). Los ratones de control fueron inducidos en la Semana 0 con Ad26.Empty (Grupo 4). En la semana 4, se sacrificaron todos los animales y se estimularon los esplenocitos con

grupos de péptidos 15 mer superpuestos que abarcan el inserto Ad26HEME002, o un grupo de péptidos que cubre la secuencia CALR en el inserto, o 9 mer que cubren las dos secuencias de JAK2 9 mer. La inducción de células productoras de IFN-γ se midió mediante ELISpot de IFN-γ. La Tabla 12 muestra los distintos grupos experimentales.

Tabla 12.

Grupo	Núm. de animal	Descripción de los grupos
1 (núm. 5)	5	MVA-HCalJ-9.9 dosis de 10^7 IU
2 (núm. 7)	10	Dosis de Ad26HEME002 de 10^{10} PV
3 (núm. 8)	10	Ad26HEME002 dosis de 10^{10} PV/MVA-HCalJ-9.9 dosis de 10^7 IU
4 (núm. 9)	3	Dosis de Ad26.Empty de 10^{10} PV

Todos los animales inmunizados con Ad26HEME002 solo o en combinación con el refuerzo MVA-HCalJ-9.9 desarrollaron células productoras de IFN-γ después de la estimulación con un grupo peptídico compuesto de péptidos 15 mer superpuestos por 11 aminoácidos y que cubren toda la HEME002 (LS_CALR.JAK2.2x9 mer) (Figura 7) o un grupo peptídico de mutCALR que consiste en péptidos 15 mer que se superponen por 11 aminoácidos y que cubren solo la porción de mutCALR de HEME002 (Figura 8). En contraste, no se detectó inducción de células productoras de citocinas tras la estimulación con los dos péptidos de JAK2 9 mer (datos no mostrados). Es importante destacar que, un refuerzo con MVA-HCalJ-9.9 después de la inmunización inducida con Ad26HEME002 (Grupo 3) indujo una respuesta significativamente mayor que los animales solamente inducidos en la semana 0 con Ad26HEME002 (Grupo 2) (grupo de péptido HEME002: p=0,038; Grupo de péptidos de mutación de CALR: p=0,00025;

ANOVA). En conclusión, los datos de ELISpot mostraron que el MVA fue capaz de estimular la respuesta inmunitaria celular específica del inserto inducida por una inmunización inducida con Ad26HEME002.

En el segundo estudio, se administró una dosis de Ad26HEME002 a 10^9 PV o 10^{10} PV y se administró una dosis de MVA-HCalJ-9.9 a 10^7 IU. En la Semana 0, los ratones se inmunizaron mediante inyección IM con Ad26HEME002 seguido de refuerzo con MVA-HCalJ-9.9 en la Semana 3. En la semana 4, se sacrificaron todos los animales y se estimularon los esplenocitos con grupos de péptidos 15 mer superpuestos que abarcan el inserto Ad26HEME002, o un grupo de péptidos que cubre la secuencia CALR en el inserto, o 9 mer que cubren las dos secuencias de JAK2 9 mer. La inducción de células productoras de IFN-γ se midió mediante ELISpot de IFN-γ. Inducción de Ad26HEME002 a 1×10^{10} PV seguido por refuerzo de MVA-HCalJ-9.9 a 1×10^7 unidades formadoras de placa (pfu) resultó en un aumento estadísticamente significativo en IFN-γ en comparación con el vector Ad26.Empty a 1×10^{10} PV solo (aumentado 3,2 veces, p=0,0042). Por el contrario, no se observó ningún cambio significativo en IFN-γ con una dosis más baja de inducción de Ad26HEME002 a 1×10^9 PV seguido de refuerzo de MVA-HCalJ-9.9 a 1×10^7 pfu (p=0,090). Se observó un aumento de esplenocitos productores de IFN-γ con $1x10^{10}$ PV Ad26HEME002 en comparación con la dosificación de $1x10^9$ PV. La Figura 9 muestra los resultados del experimento.

Ejemplo 9: Inmunogenicidad de Ad26HEME002 y MVA-HCalJ 9.9 en primates no humanos (NHP)

El objetivo principal del estudio fue determinar si la vacunación con Ad26HEME002 y MVA-HCalJ-9.9 induce respuestas de células T específicas de CALR y/o JAK2 que fueron más altas en magnitud y duración que la vacunación con Ad26HEME002 solo en NHP. El objetivo secundario fue evaluar si un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, es decir, YERVOY® (ipilimumab) ([Ipi]) en combinación con Ad26HEME002 y MVA-HCalJ-9.9 es capaz de mejorar las respuestas inmunitarias. Además, un objetivo exploratorio fue evaluar si los anticuerpos anti-CTLA-4 en combinación con la dosificación de dos regímenes homólogos de Ad26HEME002 podían mejorar las respuestas de células T específicas del inserto en comparación con la dosificación de un régimen de Ad26HEME002.

Los macacos cangrejeros se inmunizaron por vía IM solo con Ad26HEME002 y/o MVA-HCalJ-9.9 o en combinación con Ipi (10 mg/kg por vía intravenosa [IV]) de acuerdo con el cronograma mostrado en la Tabla 13. Brevemente, los NHP se inmunizaron con Ad26HEME002 ($5x10^{10}$ PV, vía IM) solo (Grupo 1 y Grupo 2) o en combinación con 10 mg/kg de Ipi por vía IV (Grupo 3 y Grupo 4). Los animales se reforzaron en la semana 4 y 8 con MVA-HCalJ-9.9 solo (10^8 IU, vía IM, Grupo 2) o MVA-HCalJ-9.9 en combinación con Ipi 10 mg/kg IV (Grupo 3), o los animales se reforzaron con Ad26HEME002 en combinación con Ipi en la semana 4 seguido de una dosificación en la semana 14 con MVA-HCalJ-9.9 en combinación con Ipi 10 mg/kg IV (Grupo 4), o los animales no recibieron ningún refuerzo (Grupo 1). Se extrajo sangre de los animales en varios puntos de tiempo y se aislaron las PBMC y el suero para ensayos inmunológicos. La inducción de respuestas inmunitarias a CALRmut o JAK2 se evaluó en PBMC en varios puntos de

tiempo durante el estudio por EliSpot de IFN-γ usando grupos de péptidos que abarcan la secuencia de inserción CALRmut o JAK2 2×9 mer, la secuencia líder o la inserción completa (HEME002; CALR_JAK2-2x9 mer).

Tabla 13.

		Inmunización				
Grupo	Núm. de animal	(Semana 0)	(Semana 4)	(Semana 8)	(Semana 14)	Ipi Mg/kg por vía IV
1	5	Ad26HEME002 ($5x10^{10}$ PV)	NA*	NA*	NA*	NA*
2	7	Ad26HEME002 ($5x10^{10}$ PV)	MVA-HCalJ-9.9 (10^8 IU)	MVA-HCalJ-9.9 (10^8 IU)	NA*	NA*
3	7a	Ad26HEME002 ($5x10^{10}$ PV)	MVA-HCalJ-9.9 (10^8 IU)	MVA-HCalJ-9.9 (10^8 IU)	NA*	10
4	5	Ad26HEME002 ($5x10^{10}$ PV)	Ad26HEME002 ($5x10^{10}$ PV)	NA*	MVA-HCalJ-9.9 (10^8 IU)	10

Ipi, ipilimumab; nr, número; PV, partículas de virus; IU, unidades infecciosas; IV: por vía intravenosa; PBMC, células mononucleares de sangre periférica;

Se observaron respuestas de fondo no específicas altas en algunos de los animales en varios puntos de tiempo a lo largo del estudio, lo que podría oscurecer la interpretación de respuestas particularmente bajas. Todos los animales se incluyeron en el conjunto de datos.

No hubo respuesta inmunitaria detectable a los grupos JAK2 o a los grupos de péptidos de secuencia líder en ninguno de los puntos de tiempo medidos (datos no mostrados). La magnitud y tasa de respuesta medida a los grupos de péptidos CALR y CALR_JAK2-2x9 mer (HEME002) fueron muy similares y por lo tanto solo se muestra

el conjunto de datos CALR_JAK2-2x9 mer (HEME002). La Figura 10 muestra la cinética de inducción de IFN-γ para producir células T específicas de HEME002 humanas a través de los cuatro grupos. Una sola inmunización con Ad26HEME002 no provocó células productoras de IFN-γ detectables en el grupo de péptidos HEME002 en ninguno de los animales (Figura 10). Por el contrario, se detectaron células productoras de IFN-γ específicas de HEME002 bajas pero detectables en 5 de 12 animales inmunizados con Ad26HEME002 en combinación con Ipi (Grupo 3 y Grupo 4 combinados) en la Semana 2 (Figura 12) y 4 (datos no mostrados) y esta respuesta inmunitaria fue significativamente superior a la detectada en animales dosificados con Ad26HEME002 solo ($p < 0,001$).

Se observó una respuesta inmunitaria a CALR_JAK2-2x9 mer (HEME002) a partir de la Semana 6 en animales que recibieron dosis de Ad26HEME002 y MVA-HCalJ-9.9. Solo hubo un cambio menor en la tasa de respondedores (3-4 de 7 animales) si los animales habían recibido una dosis (Figura 13) o dos dosis (Figura 14) de MVA-HCalJ-9.9. De los animales que respondieron, la magnitud media de la respuesta inmunitaria a HEME002 varió de 129 a 453 SFU/10^6 células (Figuras 13-15). La Figura 11 muestra la respuesta inmunitaria en -2 semanas del estudio (es decir, 2 semanas antes de la primera dosis). La Figura 12 muestra la respuesta inmunitaria en 2 semanas. La Figura 13 muestra la respuesta inmunitaria en la semana 6. La Figura 14 muestra la respuesta inmunitaria en la semana 10. La Figura 15 muestra la respuesta inmunitaria en la semana 16. Los animales a los que se les administró MVA-HCalJ-9.9 en combinación con Ipi en la Semana 4 y en la Semana 8 (Grupo 3) tuvieron un aumento en la magnitud de la respuesta inmunitaria específica de HEME002 en comparación con después de la inmunización con Ad26HEME002

(respuesta media promedio de los animales que respondieron: 93 SFU/10^6 células en la Semana 2, 1.945 SFU/10^6 células en la Semana 6 y 983 SFU/10^6 células en la Semana 10), mientras que no hubo aumento en la tasa general de respuesta comparando antes y después de la dosificación de MVA.

Hubo un aumento en la magnitud de las células productoras de IFN-γ después de dos dosis de Ad26HEME002 en combinación con Ipi en comparación con una dosis única de Ad26HEME002 en combinación con Ipi (Grupo 4): respuesta promedio a HEME002 de los animales que respondieron de 93 SFU/10^6 células en la Semana 2 (después de la primera dosis) y 580 SFU/10^6 células en la Semana 6 (después de la segunda dosis). En la Semana 14, el Grupo 4 recibió una dosis de MVA-HCalJ-9.9 en combinación con Ipi, lo que resultó en un aumento de 4,6 veces en la respuesta media promedio de los animales que respondieron (400 SFU/10^6 células en la Semana 12 y 1.827 SFU/10^6 células en la Semana 16; Tobit en la puntuación de cambio $p < 0,001$), mientras que no se observó ningún cambio en la tasa de respuesta. De los animales que respondieron, solo se observó una contracción menor de la respuesta inmunitaria, con una respuesta promedio de 1.698 SFU/10^6 células para HEME002 en la Semana 20 (6 semanas después de la dosificación con MVA-HCalJ-9.9 + Ipi) (Grupo 4).

Un análisis del área bajo la curva (AUC; Tobit con corrección de Bonferroni) para la respuesta inmunitaria HEME002 se realizó para las siguientes ventanas de tiempo: (i) Semana 2 a Semana 20, (ii) Semana 2 a Semana 12, y (iii) Semana 16 a Semana 20. Debido a la alta variación y la gran cantidad de valores censurados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el AUC para el Grupo 1 y el Grupo 2, o AUC para el Grupo 2 y el Grupo 3 (Figura 10). Por el contrario,

hubo una diferencia significativa en el AUC para la respuesta HEME002 al comparar el Grupo 3 y el Grupo 4 para la ventana de tiempo de la Semana 16 a 20 (p = 0,029). El animal núm. 3002 (muestra núm. 14) se sacrificó el Día 43. El animal núm. 4003 (muestra núm. 22) en la Semana 16 mostró pocillos que fueron demasiado numerosos para contar, y esta muestra se ajustó a 2000 SFU/10^6 células y también se usó para el análisis estadístico.

Los estudios no clínicos demuestran que los vectores Ad26 y MVA producidos que expresan CALRmut y la proteína de fusión JAK2 2x9 mer fueron capaces de dar lugar a la activación de células T *in vitro* e inducir una respuesta inmunitaria celular en ratones y NHP.

Ejemplo 10: Estudio, dosificación, y programación del constructo de MutCALR/MutJAK2

El objetivo principal del estudio fue contrastar la administración subcutánea (SC) en comparación con la administración por vía IV del anticuerpo anti CTLA4 en combinación con una vacuna Ad/Ad/MVA. El objetivo también fue evaluar la dosis múltiple de anticuerpo anti-CTLA4 en comparación con la dosis única en combinación con una vacuna Ad/Ad/MVA. El objetivo secundario fue evaluar si la combinación del anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, es decir, YERVOY® (ipilimumab) ([Ipi]) con un anticuerpo anti PD-1 (Nivolumab) es capaz de mejorar aún más una respuesta específica de las células T.

El anticuerpo anti-CLTA4 se administró por vía SC al mismo tiempo que la vacunación Ad26 localizada en la inyección de Ad26. Alternativamente, el anticuerpo anti-CTLA4 se infundió por vía IV con el tiempo inmediatamente

después de la administración de Ad26. La administración por vía SC del anticuerpo anti-CTLA4 se comparó con la administración por vía IV de 3 mg/kg por animal. En el análisis de la semana 2, 16 animales recibieron anti CTLA4 por vía IV (3 mg/kg) y 31 animales recibieron anti CTLA4 (3 mg/kg) por vía SC. Se observó un número similar de animales que respondieron 7/16 (44 %) y 13/31 (42 %) en las cohortes de anti CTLA4 administrado por vía IV y por vía SC, respectivamente. Además, la magnitud promedio de respuesta no fue significativamente diferente según lo determinado por el análisis Tobit LRT, con corrección de Bonferroni, $p<0,05$ (Figura 16. Tabla 14).

TABLA 14.

Grupo	Inducción/Refuerzo	Refuerzo'	Agente IO			
	Día 0 y Día 28	Día 84	Día 0	Día 28	Día 84	Inicio el Día 29 Cada 28 días
1	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk iv	aCTLA4 3mpk iv	aCTLA4 3mpk iv	-
2	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk iv			-
3	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	-
4	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc			-
5	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	aCTLA4 3mpk sc	aPD1 10mpk IV
6	Ad26 / Ad26	MVA	aCTLA4 3mpk sc			aPD1 10mpk IV
IV: por vía intravenosa; sc, subcutánea.						

La inclusión de anticuerpo anti αPD-1 (Nivolumab 10 mg/kg IV) a partir de la semana 4 a Ad/Ad/MVA + ipilimumab mejora la magnitud de la respuesta específica

de células T de mutCALR (Figura 17). La respuesta de péptidos de mutCALR se calculó basándose en la respuesta específica de mutCALR – fondo. El análisis de ELISpot preliminar de la Semana 6 también indica que dosis múltiples con anticuerpo anti αCTLA4 y régimen de dosificación Ad/Ad/MVA son superiores a una dosis única (Figura 17).

Ejemplo 11: Generación del constructo de CALR_JAK2-2x9 de ARN autorreplicante

El polinucleótido LS_CALR.JAK2-2x9 mer se clonó en un ARN autorreplicante.

La cepa TC-83 de la secuencia del genoma del virus de la encefalitis equina de Venezuela (VEEV) sirvió como secuencia base usada para construir el replicón de la invención. Esta secuencia se modificó al colocar el bucle corriente abajo (DLP) del virus Sindbis corriente arriba de la proteína no estructural 1 (nsP1) con los dos unidos por un elemento de salto de ribosomas 2A de teschovirus-1 porcino. Los primeros 193 nucleótidos de nsP1 se duplicaron corriente abajo de la 5' UTR y corriente arriba de DLP excepto por el codón de inicio, que se mutó a TAG. Esto aseguró todas las estructuras reguladoras y secundarias necesarias para la replicación, pero evitó la traducción de esta secuencia de nsp1 parcial. Los genes estructurales se eliminaron y los sitios de restricción EcoR V y Asc I se colocaron corriente abajo del promotor subgenómico como un sitio de clonación múltiple (MCS) para facilitar la inserción de cualquier gen de interés (Figura 19). El LS_CALR_JAK2-2x9 mer se insertó en el sitio de clonación. El transgén se sintetizó como un fragmento de ADNbc mediante IDT con 40 bp de homología con el MCS en

sus extremos 5’ y 3’ y se clonó en el vector de ARN autorreplicante derivado del VEEV digerido con EcoRV y AscI usando la mezcla maestra de ensamblaje de ADN de NEB HiFi (núm. de cat. E2621S).

La secuencia de polinucleótidos del plásmido de ARN autorreplicante completo se muestra en la SEQ ID NO: 33. La secuencia de polinucleótidos del terminador T7 se muestra en la SEQ ID NO: 34. La secuencia de polinucleótidos del promotor AmpR se muestra en la SEQ ID NO: 35. La secuencia de polinucleótidos del promotor mínimo 26S se muestra en la SEQ ID NO: 36. La secuencia de polinucleótidos del promotor T7 se muestra en la SEQ ID NO: 37. La secuencia de polinucleótidos del sitio Poli A se muestra en la SEQ ID NO: 38. La secuencia de polinucleótidos de la secuencia de replicación alfa 5’ del nsP1 se muestra la SEQ ID NO: 39. La secuencia de polinucleótidos de la sec. DLP se muestra en la SEQ ID NO: 40. La secuencia de polinucleótidos de P2A se muestra en la SEQ ID NO: 41 La secuencia de polinucleótidos de Bom se muestra en la SEQ ID NO: 42. La secuencia de polinucleótidos del DLP nsp ORF se muestra en la SEQ ID NO: 43. La secuencia de polinucleótidos de nsP2 se muestra en la SEQ ID NO: 44 La secuencia de polinucleótidos del nsP4 se muestra en la SEQ ID NO: 45. La secuencia de polinucleótidos de nsP3 se muestra en la SEQ ID NO: 46 La secuencia de polinucleótidos del nsP1 se muestra en la SEQ ID NO: 47 La secuencia de polinucleótidos de KanR se muestra en la SEQ ID NO: 48. La secuencia de polinucleótidos de Rop se muestra en la SEQ ID NO: 49. La secuencia de polinucleótido de la 5’UTR se muestra en la SEQ ID NO: 50. La secuencia de polinucleótido de la 3’UTR se muestra en la SEQ ID NO: 51.

Ejemplo 12: La plataforma de ARN replicón ARNrep.CALR/JAK2 induce respuestas celulares en ratones

El propósito de estos estudios fue determinar si una molécula de ARN autorreplicante que codifica CALR_JAK2-2x9 mer podría inducir respuestas inmunitarias en ratones Balb/c. La cepa de ratón Balb/c se seleccionó en base a los datos descritos en el Ejemplo 7 donde se observó menos variación con la cepa de ratón Balb/c en comparación con la cepa de ratón C57BL/6.

En el primero estudio, un ARN autorreplicante que codifica LS_CALR_JAK2-2x9 mer (ARNrep.CALR/JAK2) se dosificó en 3, 10 y 30 μ g. En la semana 0, los ratones Balb/c se inmunizaron por inyección IM con ARNrep.CALR/JAK2 en las dosis indicadas(3, 10 and 30 μ g) y se inyectó un grupo de control con solución salina. En la semana 2, se sacrificaron todos los animales y se estimularon los esplenocitos con grupos de péptidos superpuestos 15 mer (SEQ ID NO: 3) que cubren la secuencia CALR en el inserto, o 9 mer que cubren las dos secuencias de JAK2 9 mer (SEQ ID NO: 7). La inducción de células productoras de IFN-γ se midió mediante ELISpot de IFN-γ. Se determinaron las respuestas de las células T polifuncionales CD8 y CD4 al medir la producción de IFN-γ, TNFα e IL-2 mediante citometría de flujo. La Tabla 15 muestra los distintos grupos experimentales.

Tabla 15.

Grupo	Núm. de animal	Descripción de los grupos
1	5	Solución salina
2	5	3 μg de ARNrep.CALR/JAK2

3	5	10 µg de ARNrep.CALR/JAK2
4	5	30 µg de ARNrep.CALR/JAK2

Todos los animales inmunizados con ARNrep.CALR/JAK2 desarrollaron células productoras de IFNγ después de la estimulación con péptidos que cubren la secuencia de CALRmut (Figura 21A), en contraste sin la inducción de células productoras de citocinas se detectó tras la estimulación con los dos péptidos JAK2 9 mer (SEQ ID NO: 5 y 6) (datos no mostrados). La citometría de flujo intracelular mostró que la respuesta anti-CALR es impulsada por CD4 y es polifuncional a todas las dosis evaluadas (Figura 21B).

Las moléculas de ARN autorreplicantes en el primer estudio se inyectaron sin marca en los animales. Para el segundo estudio se formuló la molécula de ARN autorreplicante en una nanopartícula lipídica (LNP) y se realizó un estudio similar descrito en la Tabla 16. Similarmente al primer estudio, los animales inmunizados con ARNrep.CALR/JAK2 desarrollaron células productoras de IFNγ después de la estimulación con péptidos que cubren la secuencia de CALRmut (Figura 22A), en contraste sin la inducción de células productoras de citocinas se detectó tras la estimulación con los dos péptidos JAK2 9 mer (SEQ ID NO: 5 y 6) (datos no mostrados). La citometría de flujo intracelular mostró que la respuesta anti-CALR es impulsada por CD4 y es polifuncional a todas las dosis evaluadas tanto en versiones no formuladas como formuladas con LNP (Figura 22B).

Tabla 16.

Grupo	Núm. de animal	Descripción de los grupos
1	5	Solución salina
2	5	0,2 µg de LNP formulada de ARNrep.CALR/JAK2
3	5	2 µg de LNP formulada de ARNrep.CALR/JAK2
4	5	20 µg de LNP formulada de ARNrep.CALR/JAK2
5	5	20 µg de ARNrep.CALR/JAK2 no formulado

En el tercer estudio se probó ARNrep.CALR/JAK2 en combinación con otras dos plataformas de vacuna, Ad26 y MVA para determinar si los regímenes de inducción/refuerzo heterólogos aumentan la función de células T anti-CALR. Todas las plataformas codificaron el constructo CALR_JAK2-2x9 mer. En la semana 0, los ratones Balb/c se inyectaron con solución salina, Ad26HEME002 (10^{10} PFU) o ARNrep/CALR.JAK2 (20 µg). En la semana 4 los ratones se inyectaron con Ad26HEME002, MVA-HCalJ-9.9 (10^{7} PFU) o ARNrep.CALR/JAK2 y los bazos se analizaron una semana después del refuerzo (ver el diseño experimental más abajo, Tabla 17). Se añadió un grupo de control para unir datos históricos usando Ad26/MVA con un intervalo de inducción/refuerzo de 3 semanas y análisis de bazo 2 semanas después del refuerzo. Los bazos se analizaron mediante ELISpot e ICS como se describió anteriormente usando péptidos de CALR superpuestos.

Tabla 17.

Grupo	Núm. de animal	Descripción de los grupos
1	5	Solución salina
2	8	Solo inducción de ARNrep.

3	8	Solo inducción de Ad26
4	8	ARNrep./ARNrep.
5	8	Ad26/Ad26
6	8	ARNrep/Ad26
7	8	Ad26/ARNrep
8	8	ARNrep/MVA
9	8	Ad26/MVA
10	6	Intervalo de 3 semanas de Ad26/MVA

La adición del refuerzo de Ad26 o MVA a la inducción de ARN autorreplicante resulta en refuerzos estadísticamente significativos de acuerdo con ELISpot de IFNγ ($p<0,001$, aumento de 5,1 y 6,5 veces respectivamente). La adición del ARN autorreplicante como agente de refuerzo después de la inducción con Ad26 dio como resultado un aumento de 1,7 veces sobre la inducción con Ad26 solo (no es estadísticamente significativo) (Figura 23A). La tinción de citocina intracelular muestra que tras la inducción del ARN autorreplicante, la adición de Ad26 y/o MVA como un refuerzo resulta en aumentos estadísticamente significativos en células T polifuncionales IFNγ+ TNFα+ IL-2+ Cd4 ($p<0,001$, aumento de 4,9 y 3,6 veces respectivamente). Reforzar con el ARN autorreplicante después de la inducción con Ad26 conduce a un aumento de 2 veces en las células T positivas de triple citocina polifuncionales sobre la inducción con A26 solo (no es estadísticamente significativo) (Figura 23B).

Ejemplo 13. Inmunogenicidad de ARNrep.CALR/JAK2 y MVA-HCalJ-9.9 en primates no humanos (NHP)

El objetivo principal del estudio fue determinar si la vacunación con ARNrep.CALR/JAK2 y MVA-HCalJ-9.9 induce respuestas de células T específicas del antígeno que tienen mayor magnitud y duración que la vacunación con ARNrep.CALR/JAK2 solo en NHP. El objetivo secundario fue evaluar si un anticuerpo monoclonal anti-CTLA-4, es decir, YERVOY® (ipilimumab) ([Ipi]) en combinación con ARNrep.CALR/JAK2 y MVA-HCalJ-9.9 puede mejorar la respuesta inmunitaria inducidas por vacuna. Además, un objetivo exploratorio es evaluar si los anticuerpos monoclonales anti PD-1 OPDIVO® (nivolumab) en combinación con el régimen de vacunación y el anticuerpo anti-CTLA-4 son comparables o aumentan las respuestas de células T específicas del inserto en comparación con los animales dosificados sin anti PD-1. Los macacos cynomolgus se inmunizan por vía IM con ARNrep.CALR/JAK2, y/o MVA-HCalJ-9.9 solo o en combinación con Ipi (3 mg/kg por vía subcutánea [SC]) o en combinación con Nivolumab (10 mg/kg por vía intravenosa [IV] de acuerdo con el cronograma mostrado en la Tabla 18. Brevemente, los NHP se inmunizarán con ARNrep.CALR/JAK2 y MVA-HCalJ-9.9 en combinación con Ipi a 3 mg/kg SC (Grupo 2) o en combinación con Ipi a 3 mg/kg SC y Nivolumab IV a 10 mg/kg por vía IV (Grupo 4). Se extrae sangre de los animales en varios puntos de tiempo y se aíslan las PBMC y el suero para ensayos inmunológicos. La inducción de respuestas inmunitarias específicas de los antígenos de CALR se evalúa en PBMC en diversos puntos temporales durante el estudio mediante ELISpot de IFNγ usando grupos peptídicos que comprenden péptidos superpuestos de 15 mer que corresponden a la totalidad de la secuencia de inserto de CALR.

Se espera que la vacuna ARNrep.CALR/JAK2 produzca una respuesta de células T específica del antígeno que se puede aumentar aún más cuando se

administra como un régimen en combinación con MVA-HCalJ-9.9. El uso de anticuerpos monoclonales de bloqueo del punto de regulación anticuerpos anti-CTLA-4 y/o anti PD-1 en combinación con ARNrep.CALR/JAK2 y MVA-HCalJJ-9.9 conllevará a una respuesta de células T específica del antígeno de mayor magnitud, calidad y más duraderas.

Tabla 18.

Grupo	Día 0/28	Día 70	mAb anti-CTLA-4	mAb anti-PD-1
1	ARNrep./ARNrep.	MVA	-	-
2	ARNrep./ARNrep.	MVA	0, 28, 70	-
3	ARNrep./ARNrep.	MVA	0, 28, 70	29, 57, 84, 113

Ejemplo 14. Inmunogenicidad de GAd.CALR.JAK2 y presentación continua de ARNrep.CALR/JAK2 en primates no humanos (NHP)

El objetivo principal de este estudio es confirmar que la vacunación con GAd20.CALR.JAK2 induce respuestas de células T específicas del antígeno en combinación con el anticuerpo anti CTL-4 y el MVA o el ARNp. El estudio también fue diseñado para determinar si la vacunación con ARNrep.CALR/JAK2 aumenta las células T cuando se combina con GAD20 o GAD20/MVA y si se puede usar el ARNrep en lugar de MVA. El objetivo de este estudio también es evaluar si GAD20/MVA/ARNrep en combinación con el anticuerpo anti CTLA4 puede inducir respuestas de células T específicas del antígeno mayores que GAD20/MVA/ARNrep solo. Se espera que la adición de un vector ARNrep.CALR/JAK2 a una vacuna

GAd20/MVA como una combinación triple impulse mayores y más duraderas respuestas de células T específicas del antígeno en pacientes con cáncer.

El segundo objetivo de este estudio es evaluar la capacidad del régimen de dosis múltiples de ARNrep.CALR.JAK2 para eliminar la necesidad del anticuerpo anti CTL-4, completamente o después de la administración de MVA. Además, el estudio se construye para determinar si el ARNrep se puede administrar varias veces (mensualmente) para aumentar continuamente o mantener las respuestas de las células T específicas del antígeno. Los niveles más altos y más duraderos de células T dirigidas a anti mutCALR/mutJAK2 generadas requerirán la presentación de neoantígeno continuo mediante un vector no susceptible a la neutralización mediada por Ab que resulta en la eliminación de clones malignos y el beneficio clínico para los pacientes con NMP Una ventaja potencial de una vacuna basada en ARN autorreplicante es la ausencia de inmunidad específica del vector que se desarrolla. La ausencia de respuesta inmunitaria específica del vector puede permitir la administración repetida del ARN autorreplicante sin disminución de la presentación del antígeno debido a una incapacidad de la vacuna basada en ARN autorreplicante para generar anticuerpos neutralizantes específicos del vector. Los regímenes de dosis múltiples se prueban para evaluar si ARNrep.CALR/JAK2 puede mantener una respuesta de células T específica del antígeno mediante la administración en un programa de dosificación intramuscular mensual.

Para este estudio, los macacos cynomolgus se inmunizan de acuerdo con el cronograma mostrado en la Tabla 19. Se extrae sangre de los animales en varios puntos de tiempo y se aíslan las PBMC y el suero para ensayos inmunológicos. La inducción de respuestas inmunitarias específicas de los

antígenos de CALR se evalúa en PBMC en diversos puntos temporales durante el estudio mediante ELISpot de IFNγ usando grupos peptídicos que comprenden péptidos superpuestos de 15 mer que corresponden a la totalidad de la secuencia de inserto de CALR

La administración de ARNrep.CALR/JAK2 después de la inmunización de GAd20/MVA permitirá el refuerzo continuo para prolongar la respuesta de células T específicas del antígeno independientemente o en combinación con la administración de CPI. Se espera que los regímenes basados en ARN de autoreplicación ARNrep.CALR/JAK2 de dosis múltiples produzcan una mayor magnitud de respuestas de células T con una duración más larga.

Tabla 19.

Grupo	Descripción de los grupos
1	GAd20/MVA/ARNrep
2	GAd20/MVA/ARNrep/ARNrep
3	GAd20/ARNrep/ARNrep/ARNrep
4	GAd20/GAd20/MVA + anticuerpo anti CTLA4 3 mg/kg por vía IV
5	GAD20/GAD20 /MVA/ARNrep/ARNrep + 3 mg/kg de anticuerpo anti CTLA4 por vía IV
6	GAD20/GAD20/ARNrep/ARNrep/ARNrep/ARNrep + 3 mg/kg de anticuerpo anti CTLA4 por vía IV
4	GAD20/GAD20/ARNrep/ARNrep/ARNrep/ARNrep

MODALIDADES

El siguiente listado de modalidades pretende complementar, más que sustituir o reemplazar, las descripciones anteriores.

Modalidad 1. Un polipéptido que comprende al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;

EEAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;

KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG (SEQ ID NO: 4) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;

VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;

FCGDENILV (SEQ ID NO: 6) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos.

Modalidad 2. El polipéptido de la modalidad 1, en donde el polipéptido comprende las secuencias de epítopos:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;

EEAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;

VLNYGVCFC (SEQ ID NO: 5) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5; y

FCGDENILV (SEQ ID NO: 6) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 3. El polipéptido de la modalidad 1, en donde el polipéptido comprende las secuencias de epítopos:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;

EEAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2; y

KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG (SEQ ID NO: 4) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4.

Modalidad 4. El polipéptido de la modalidad 1, en donde el polipéptido comprende las secuencias de epítopos:

MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE (SEQ ID NO: 1) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1; y

EEAEDNCRRMMRTK (SEQ ID NO: 2) o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2.

Modalidad 5. El polipéptido de una cualquiera de las modalidades 1-4, que comprende además una secuencia líder en el N-terminal seleccionada de:

MACPGFLWALVISTCLEFSMA (SEQ ID NO: 8);

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDY NIQKESTLHLVLRLRGV (SEQ ID NO: 54); y

MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV (SEQ ID NO: 29).

Modalidad 6. El polipéptido de cualquiera de las modalidades 1-5, en donde las secuencias de epítopos se conectan una con otra mediante una secuencia enlazadora.

Modalidad 7. El polipéptido de la modalidad 6, en donde la secuencia enlazadora se selecciona de AAY, RR, DPP, HHAA (SEQ ID NO: 56), HHA, HHL, RKSYL (SEQ ID NO: 57), RKSY (SEQ ID NO: 58), SSL, o REKR (SEQ ID NO: 59).

Modalidad 8. El polipéptido de la modalidad 6, en donde la secuencia enlazadora comprende un sitio de escisión de proteasa.

Modalidad 9. El polipéptido de la modalidad 1, en donde el polipéptido se selecciona de:

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14;

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15; y

una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

Modalidad 10. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de una cualquiera de las modalidades 1-9.

Modalidad 11. El polinucleótido de la modalidad 10, en donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 16 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 17 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 18 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 19 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 20 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 21 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 21.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 22 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 22.

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 26 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 26. y

una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 27 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 27.

Modalidad 12. Un vector que comprende un polinucleótido de la modalidad 10 o la modalidad 11.

Modalidad 13. El vector de la modalidad 12, en donde el vector se selecciona de un vector de adenovirus, un vector de alfavirus, un vector de poxvirus, un vector de virus asociado a adeno, un vector de retrovirus, una molécula de ARN autorreplicante, y una combinación de estos.

Modalidad 14. El vector de la modalidad 13, en donde el vector de adenovirus se selecciona de hAd5, hAd7, hAd11, hAd26, hAd34, hAd35, hAd48, hAd49, hAd50, GAd20, Gad19, GAd21, GAd25, GAd26, GAd27, GAd28, GAd29, GAd30, GAd31, ChAd3, ChAd4, ChAd5, ChAd6, ChAd7, ChAd8, ChAd9, ChAd10, ChAd11, ChAd16, ChAdI7, ChAd19, ChAd20, ChAd22, ChAd24, ChAd26, ChAd30, ChAd31, ChAd37, ChAd38, ChAd44, ChAd55, ChAd63, ChAd73, ChAd82, ChAd83, ChAd146, ChAd147, PanAd1, PanAd2, y PanAd3.

Modalidad 15. El vector de la modalidad 13, en donde el vector de poxvirus se selecciona del vector del virus de la viruela, el vector del virus vaccinia, el vector del virus de la viruela bovina, el vector del virus de la viruela del mono, el vector del virus vaccinia (W) de Copenhague, el vector del virus vaccinia atenuado de Nueva York (NYVAC), y el vector de vaccinia modificado de Ankara (MVA).

Modalidad 16. El vector de la modalidad 12, en donde el vector es el vector de adenovirus que comprende un polinucleótido que codifica uno cualquiera de los polipéptidos de una de las modalidades 1-9.

Modalidad 17. El vector de la modalidad 12, en donde el vector es la molécula de ARN autorreplicante que comprende un polinucleótido que codifica uno cualquiera de los polipéptidos de una cualquiera de las modalidades 1-9.

Modalidad 18. El vector de la modalidad 12, en donde el vector es Ad26 que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 10 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10.

Modalidad 19. El vector de la modalidad 12, en donde el vector es un vector MVA que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

Modalidad 20. El vector de la modalidad 12, en donde el vector es GAd20 que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 31 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 31.

Modalidad 21. El vector de la modalidad 12, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la SEQ ID NO: 12 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12.

Modalidad 22. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de una cualquiera de las modalidades 1-9.

Modalidad 23. Una composición farmacéutica que comprende un polinucleótido de una cualquiera de las modalidades 10 y 11.

Modalidad 24. Una composición farmacéutica que comprende un vector de una cualquiera de las modalidades 12-21.

Modalidad 25. La composición farmacéutica de la modalidad 24, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, un vector de MVA, un vector de GAd20, una molécula de ARN autorreplicante, y combinaciones de estos.

Modalidad 26. Un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 22-25.

Modalidad 27. Un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto portador de JAK2V617F y/o mutación del exón 9 de CALR que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 22-25.

Modalidad 28. Un método para tratar o prevenir una enfermedad mieloproliferativa en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 22-25.

Modalidad 29. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 22-25.

Modalidad 30. Un método para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición farmacéutica de una cualquiera de las modalidades 22-25.

Modalidad 31. Un método para tratar, prevenir, reducir un riesgo de aparición o retrasar la aparición de una afección clínica caracterizada por una expresión de mutante JAK2V617F y/o exón 9 de CALR en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende un vector que

comprende un polinucleótido que codifica al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos, y en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición.

Modalidad 32. Un método para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto portador de JAK2V617F y/o mutación del exón 9 de CALR que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;

- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos, y

en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición.

Modalidad 33. Un método para tratar o prevenir una enfermedad mieloproliferativa en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos, y

en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición.

Modalidad 34. El método de la modalidad 33, en donde la enfermedad mieloproliferativa se selecciona de mielofibrosis primaria (MPN), policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (ET), mielofibrosis primaria (PFM), mielofibrosis secundaria, leucemia mieloide aguda (AML), AML secundaria, leucemia mielógena crónica (CML), hematopoyesis clonal de potencial indeterminado (CHIP) y leucemia mielomonocítica crónica (CMML).

Modalidad 35. Un método para tratar el cáncer en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos, y

en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición.

Modalidad 36. El método de la modalidad 35, en donde el cáncer se selecciona de cáncer de pulmón, cáncer linfoide, leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mielógena crónica, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin,

mieloma de células plasmáticas, cáncer del tracto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de piel, cáncer de tiroides, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de colon, cáncer del tracto urinario, cáncer del sistema nervioso central, neuroblastomas, cáncer de riñón, cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer testicular, y cáncer de tejido blando.

Modalidad 37. Un método para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto que comprende administrar al sujeto que lo necesita una composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica al menos dos o más secuencias de epítopos seleccionadas del grupo que consiste en:

- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1;
- el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 4 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 4;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5 o al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5;
- el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6 o que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; y combinaciones de estos, y

en donde la administración comprende una o más administraciones de la composición.

Modalidad 38. El método de la modalidad 37, en donde la enfermedad cardiovascular se selecciona de un síndrome coronario agudo, una enfermedad cerebrovascular isquémica, una enfermedad cardíaca isquémica, una trombosis,

una tromboembolia venosa, una trombosis venosa profunda, una embolia pulmonar, una trombosis intraabdominal catastrófica, una enfermedad arterial periférica, una hipertensión, una insuficiencia cardíaca, una fibrilación auricular, una enfermedad cardíaca coronaria, una aterosclerosis, y una hematopoyesis clonal.

Modalidad 39. El método de una cualquiera de las modalidades 31-38, en donde el vector se selecciona de un vector de adenovirus, un vector de alfavirus, un vector de poxvirus, un vector de virus asociado a adeno, un vector de retrovirus, una molécula de ARN autorreplicante, y una combinación de estos.

Modalidad 40. El método de una cualquiera de las modalidades 31-39, en donde el vector se selecciona del vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, una molécula de ARN autorreplicante, y combinaciones de estos.

Modalidad 41. El método de una cualquiera de las modalidades 31-39, en donde el vector es un vector de Ad26 que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 42. El método de una cualquiera de las modalidades 31-39, en donde el vector es un vector de GAd20 que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 43. El método de una cualquiera de las modalidades 31-39, en donde el vector es un vector de MVA que comprende un polinucleótido que codifica un

polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 44. El método de una cualquiera de las modalidades 31-39, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido que comprende secuencias de epítopos del epítopo de calreticulina (CALR) de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de cinasa Janus 2 (JAK2) de la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 45. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 46. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante. y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 47. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA.

Modalidad 48. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de

JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA.

Modalidad 49. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA; y

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 50. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 51. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de

JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 52. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una quinta administración que comprende una quinta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una sexta administración que comprende una sexta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 53. El método de una cualquiera de las modalidades 31-52, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico seleccionado de un anticuerpo CTLA-4, un anticuerpo PD-1, un anticuerpo PD-L1, un agonista de TLR, una agonista de CD40, un agonista de OX40, hidroxiurea, ruxolitinib, fedratinib, un agonista de 41BB, un agonista de CD28, ligando FLT3, sulfato de aluminio, un inhibidor de BTK, un inhibidor de JAK, un anticuerpo CD38, un inhibidor de CDK, un anticuerpo CD33, un anticuerpo CD37, un anticuerpo CD25, un inhibidor de GM-CSF, IL-2, IL-15, IL-7, IFNγ, IFNα, TNFα, un anticuerpo VEGF, un anticuerpo CD70, un anticuerpo CD27, un anticuerpo BCMA, un anticuerpo GPRC5D, y combinaciones de estos.

Modalidad 54. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de MVA; y

en donde el ciclo de tratamiento comprende además administrar un inhibidor del punto de control seleccionado de un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo PD-1, y un anticuerpo PD-L1, en combinación con la primera, segunda, y/o tercera composición.

Modalidad 55. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es el vector de MVA;

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una quinta administración que comprende una quinta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una sexta administración que comprende una sexta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de

JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

en donde el ciclo de tratamiento comprende además administrar un inhibidor del punto de control seleccionado de un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo PD-1, y un anticuerpo PD-L1, en combinación con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, y/o sexta composición.

Modalidad 56. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un autorreplicante;

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una quinta administración que comprende una quinta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una sexta administración que comprende una sexta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

en donde el ciclo de tratamiento comprende además administrar un inhibidor del punto de control seleccionado de un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo PD-1, y un anticuerpo PD-L1, en combinación con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, y/o sexta composición.

Modalidad 57. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2

de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es el vector de MVA;

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una quinta administración que comprende una quinta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una sexta administración que comprende una sexta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de

CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

en donde el ciclo de tratamiento comprende además administrar un inhibidor del punto de control seleccionado de un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo PD-1, y un anticuerpo PD-L1, en combinación con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, y/o sexta composición.

Modalidad 58. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20; y

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un vector de GAd20;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es un autorreplicante;

una cuarta administración que comprende una cuarta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante;

una quinta administración que comprende una quinta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

una sexta administración que comprende una sexta composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 1, el epítopo de CALR de la SEQ ID NO: 2, el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 5, y el epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector es una molécula de ARN autorreplicante; y

en donde el ciclo de tratamiento comprende además administrar un inhibidor del punto de control seleccionado de un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo PD-1, y un anticuerpo PD-L1, en combinación con la primera, segunda, tercera, cuarta, quinta, y/o sexta composición.

Modalidad 58. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el

vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante.

Modalidad 59. El método de una cualquiera de las modalidades 31-44, que comprende uno o más ciclos de tratamiento, en donde cada ciclo comprende:

una primera administración que comprende una primera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante;

una segunda administración que comprende una segunda composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante;

una tercera administración que comprende una tercera composición que comprende un vector que comprende un polinucleótido que codifica 2 o más repeticiones en tándem del epítopo de JAK2 de la SEQ ID NO: 6, en donde el vector se selecciona de un vector de Ad26, vector de MVA, vector de GAd20, o una molécula de ARN autorreplicante; y

en donde el ciclo de tratamiento comprende además administrar un inhibidor del punto de control seleccionado de un anticuerpo anti CTLA-4, un anticuerpo PD-1, y un anticuerpo PD-L1, en combinación con la primera, segunda, y/o tercera composición.

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:	Epítopo	Secuencia
1	Epítopo I de CALR	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE
2	Epítopo II de CALR	EEAEDNCRRMMRTK
3	Epítopo I de CALR-AAY-epítopo II de CALR	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTK
4	Epítopo de JAK2 30 mer	KLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
5	Epítopo 1 de JAK2	VLNYGVCFC
6	Epítopo 2 de JAK2	FCGDENILV
7	2X9mer JAK2	VLNYGVCFCAAYFCGDENILV
8	Secuencia líder de HAVt20 (LS)	MACPGFLWALVISTCLEFSMA
9	LS_CALR (HEME003)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTK
10	LS_CALR_JAK2-2x9 mer (HEME002)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
11	LS_CALR_JAK2-30mer (HEME001)	MACPGFLWALVISTCLEFSMAMKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAE

		DNCRRMMRTKAAYKLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
12	CALR_JAK2-2x9mer	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
13	CALR_JAK2-30mer	MKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTE*AAY*EEAEDNCRRMMRTKAAYKLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
14	Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGVRKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDENILV
15	Ubiq_CALR_JAK2-30mer	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGVRKDKQDEEQRTRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEAAYEEAEDNCRRMMRTKAAYKLSHKHLVLNYGVCFCGDENILVQEFVKFG
16	LS_CALR	ATGGCATGCCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAGTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAG
17	LS_CALR_JAK2-2x9mer	ATGGCATGCCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAGTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACGTGCTGAATTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCCTATTTTTGTGGCGATGAGAACATCCTGGTG
18	LS_CALR_JAK2-30mer	ATGGCATGCCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTGGAGTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACAAGCTGAGCCACAAGCACCTGGTGCTGAACTATGGCGTGTGCTTCTGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGCAGGAGTTCGTGAAGTTTGGC

19	CALR_JAK2-2x9 mer para Ad26	ATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGA ATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAA CAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCC TAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACA GAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCGC ATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACGTGCTGAATTATGGCG TGTGCTTCTGTGCCGCCTATTTTTGTGGCGATGAGAACATC CTGGTG
20	CALR_JAK2-30mer	ATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGCAGCGGACCCGGAGA ATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAGGCGCATGCGGAGAA CAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGATGTCTCCAGCAAGGCC TAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACA GAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAGGACAACTGCAGGCGC ATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACAAGCTGAGCCACAAGC ACCTGGTGCTGAACTATGGCGTGTGCTTCTGTGGCGATGA GAATATCCTGGTGCAGGAGTTCGTGAAGTTTGGC
21	Ubiq_CALR_JAK2-2x9mer	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACAGGCAAGACCATCAC ACTGGAGGTGGAGCCCTCCGACACCATCGAGAACGTGAAG GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCCTGATCAGC AGCGGCTGATCTTTGCCGGCAAGCAGCTGGAGGACGGCAG AACCCTGTCTGATTACAATATCCAGAAGGAGAGCACACTGC ACCTGGTGCTGCGGCTGAGAGGCGTGAGGAAGGACAAGC AGGATGAGGAGCAGCGCACCCGGAGAATGATGCGGACAA AGATGAGAATGAGGCGCATGCGGAGAACCAGGCGCAAGAT GCGGAGAAAGATGAGCCCAGCAAGGCCACGCACCTCCTGC AGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCCTATG AGGAGGCCGAGGACAACTGCAGGCGCATGATGCGGACAA AGGCCGCCTACGTGCTGAATTATGGCGTGTGCTTCTGTGCC GCCTATTTTTGTGGCGATGAGAACATCCTGGTG
22	Ubiq_CALR_JAK2-30mer	ATGCAGATCTTCGTGAAGACCCTGACAGGCAAGACCATCAC ACTGGAGGTGGAGCCCTCCGACACCATCGAGAACGTGAAG GCCAAGATCCAGGACAAGGAGGGCATCCCCCCTGATCAGC AGCGGCTGATCTTTGCCGGCAAGCAGCTGGAGGACGGCAG AACCCTGTCTGATTACAATATCCAGAAGGAGAGCACACTGC ACCTGGTGCTGCGGCTGAGAGGCGTGAGGAAGGACAAGC AGGATGAGGAGCAGCGCACCCGGAGAATGATGCGGACAA AGATGAGAATGAGGCGCATGCGGAGAACCAGGCGCAAGAT GCGGAGAAAGATGAGCCCAGCAAGGCCACGCACCTCCTGC AGGGAGGCATGTCTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCCTATG AGGAGGCCGAGGACAACTGCAGGCGCATGATGCGGACAA AGGCCGCCTACAAGCTGTCTCACAAGCACCTGGTGCTGAA CTATGGCGTGTGCTTCTGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGC AGGAGTTCGTGAAGTTTGGCTGATAA
23	Secuencia de polinucleótidos del transgén	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGC ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCC ATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATT

	Ad26HEME001 que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) que contiene el operador de tetraciclina (TetO), una secuencia de Kozak y el transgén y la señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40)	ACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA CCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACA TGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTAT TAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGG CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGA TCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAG TGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTT GACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCG GCCGGGAACGGTGCATTGGATCTAGAGCCACCATGGCATG CCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTG GAGTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGC AGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAG GCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGAT GTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGT CTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAG GACAACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACA AGCTGAGCCACAAGCACCTGGTGCTGAACTATGGCGTGTG CTTCTGTGGCGATGAGAATATCCTGGTGCAGGAGTTCGTGA AGTTTGGCTGATAAGGTACCATCCGAACTTGTTTATTGCAG CTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCA CAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGT CCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCT
24	Secuencia de polinucleótidos del transgén Ad26HEME002 que contiene el promotor de citomegalovirus (CMV) que contiene el operador de tetraciclina (TetO), una secuencia de Kozak y el transgén y la	TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGC ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCC ATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATT ACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTA ATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA CCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTC AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGT CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACA TGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTAT TAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTAC ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTC CAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGG

	señal de poliadenilación del virus de simio 40 (SV40)	CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTC CGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGA TCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTTAG TGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTT GACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCG GCCGGGAACGGTGCATTGGATCTAGAGCCACCATGGCATG CCCAGGCTTCCTGTGGGCCCTGGTCATCAGCACCTGTCTG GAGTTTTCCATGGCCATGAAGGACAAGCAGGATGAGGAGC AGCGGACCCGGAGAATGATGAGGACAAAGATGCGCATGAG GCGCATGCGGAGAACAAGGCGCAAGATGCGGAGAAAGAT GTCTCCAGCAAGGCCTAGAACCAGCTGCAGGGAGGCATGT CTGCAGGGATGGACAGAGGCAGCATACGAGGAGGCAGAG GACAACTGCAGGCGCATGATGAGGACCAAGGCCGCCTACG TGCTGAATTATGGCGTGTGCTTCTGTGCCGCCTATTTTTGT GGCGATGAGAACATCCTGGTGTGATAAGGTACCATCCGAA CTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAG CATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCT AGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC T
25	HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK 2-2x9 mer) ADN de inserto completo para la expresión en MVA y Gad20	GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTT TCACCCATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAA GTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAG AATCATAAAGAACAGTGACGGATCCCGCGACTTCGCCGCC ATGGGCCAGAAGGAACAGATTCATACGCTTCAGAAAAATTC TGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGGCAG TAATGAAGGACAAACAAGACGAAGAACAACGAACTAGGCG GATGATGAGGACTAAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACG GACGCGACGCAAGATGCGCCGGAAAATGTCTCCCGCCCGG CCAAGGACGTCTTGTCGGGAAGCCTGTTTGCAGGGCTGGA CCGAAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAAGACAATTGTCGGCG AATGATGAGAACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACTATGGAG TGTGCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATT CTGGTGTAGTAAAGGCGCGCC
26	HCalJ-9.9 (TCE_CALR_JAK 2-2x9 mer) solo transgén con secuencia líder para la expresión en MVA y Gad20	ATGGGCCAGAAGGAACAGATTCATACGCTTCAGAAAAATTC TGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGGCAG TAATGAAGGACAAACAAGACGAAGAACAACGAACTAGGCG GATGATGAGGACTAAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACG GACGCGACGCAAGATGCGCCGGAAAATGTCTCCCGCCCGG CCAAGGACGTCTTGTCGGGAAGCCTGTTTGCAGGGCTGGA CCGAAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAAGACAATTGTCGGCG AATGATGAGAACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACTATGGAG TGTGCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATT CTGGTG
27	Transgén CALR_JAK2-2x9	ATGAAGGACAAACAAGACGAAGAACAACGAACTAGGCGGA TGATGAGGACTAAGATGAGGATGCGGAGGATGAGACGGAC

	mer solo sin ADN de secuencia líder para la expresión en MVA y Gad20	GCGACGCAAGATGCGCCGGAAAATGTCTCCCGCCCGGCCA AGGACGTCTTGTCGGGAAGCCTGTTTGCAGGGCTGGACCG AAGCAGCTTACGAAGAAGCAGAAGACAATTGTCGGCGAAT GATGAGAACGAAGGCTGCTTACGTGCTTAACTATGGAGTGT GCTTCTGCGCTGCCTATTTCTGCGGAGATGAGAACATTCTG GTG
28	Epítopo 2 de JAK2-AAY-epítopo 2 de JAK2	FCGDENILVAAYFCGDENILV
29	TCE	MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAV;
30	Polinucleótido de TCE	ATGGGCCAGAAGGAACAGATTCATACGCTTCAGAAAAATTC TGAACGAATGTCAAAGCAATTGACACGAAGTTCTCAGGCAG TA
31	TCE_CALR_JAK2-2x9mer	MGQKEQIHTLQKNSERMSKQLTRSSQAVMKDKQDEEQRTR RMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQG WTEAAYEEAEDNCRRMMRTKAAYVLNYGVCFCAAYFCGDEN ILV
32	Promotor P7.5	GATCACTAATTCCAAACCCACCCGCTTTTTATAGTAAGTTTT TCACCCATAAATAATAAATACAATAATTAATTTCTCGTAAAA GTAGAAAATATATTCTAATTTATTGCACGGTAAGGAAGTAG AATCATAAAGAACAGTGACGGATC
33	Secuencia de polinucleótidos del plásmido de ARN autorreplicante completo	TAATACGACTCACTATAGATAGGCGGCGCATGAGAGAAGC CCAGACCAATTACCTACCCAAATAGGAGAAAGTTCACGTTG ACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCG GAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACT GATAATGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGC TTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACG ATCCTTGACATTGGAATAGTCAGCATAGTACATTTCATCTGA CTAATACTACAACACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAA CATGCTCGGCCGCCGCCCCTTCCCGGCCCCCACTGCCATG TGGAGGCCGCGGAGAAGGAGGCAGGCGGCCCCGGGAAGC GGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTGGAGACG TGGAGGAGAACCCTGGACCTGAGAAAGTTCACGTTGACAT CGAGGAAGACAGCCCATTCCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGC TTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAGCCAAGCAGGTCACTGATAA TGACCATGCTAATGCCAGAGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAA AACTGATCGAAACGGAGGTGGACCCATCCGACACGATCCT TGACATTGGAAGTGCGCCCGCCCGCAGAATGTATTCTAAGC ACAAGTATCATTGTATCTGTCCGATGAGATGTGCGGAAGAT CCGGACAGATTGTATAAGTATGCAACTAAGCTGAAGAAAAA CTGTAAGGAAATAACTGATAAGGAATTGGACAAGAAAATGA AGGAGCTCGCCGCCGTCATGAGCGACCCTGACCTGGAAAC TGAGACTATGTGCCTCCACGACGACGAGTCGTGTCGCTAC GAAGGGCAAGTCGCTGTTTACCAGGATGTATACGCGGTTG

		ACGGACCGACAAGTCTCTATCACCAAGCCAATAAGGGAGTT AGAGTCGCCTACTGGATAGGCTTTGACACCACCCCTTTTAT GTTTAAGAACTTGGCTGGAGCATATCCATCATACTCTACCA ACTGGGCCGACGAAACCGTGTTAACGGCTCGTAACATAGG CCTATGCAGCTCTGACGTTATGGAGCGGTCACGTAGAGGG ATGTCCATTCTTAGAAAGAAGTATTTGAAACCATCCAACAAT GTTCTATTCTCTGTTGGCTCGACCATCTACCACGAGAAGAG GGACTTACTGAGGAGCTGGCACCTGCCGTCTGTATTTCACT TACGTGGCAAGCAAAATTACACATGTCGGTGTGAGACTATA GTTAGTTGCGACGGGTACGTCGTTAAAAGAATAGCTATCAG TCCAGGCCTGTATGGGAAGCCTTCAGGCTATGCTGCTACGA TGCACCGCGAGGGATTCTTGTGCTGCAAAGTGACAGACAC ATTGAACGGGGAGAGGGTCTCTTTTCCCGTGTGCACGTATG TGCCAGCTACATTGTGTGACCAAATGACTGGCATACTGGCA ACAGATGTCAGTGCGGACGACGCGCAAAAACTGCTGGTTG GGCTCAACCAGCGTATAGTCGTCAACGGTCGCACCCAGAG AAACACCAATACCATGAAAAATTACCTTTTGCCCGTAGTGG CCCAGGCATTTGCTAGGTGGGCAAAGGAATATAAGGAAGA TCAAGAAGATGAAAGGCCACTAGGACTACGAGATAGACAG TTAGTCATGGGGTGTTGTTGGGCTTTTAGAAGGCACAAGAT AACATCTATTTATAAGCGCCCGGATACCCAAACCATCATCA AAGTGAACAGCGATTTCCACTCATTCGTGCTGCCCAGGATA GGCAGTAACACATTGGAGATCGGGCTGAGAACAAGAATCA GGAAAATGTTAGAGGAGCACAAGGAGCCGTCACCTCTCAT TACCGCCGAGGACGTACAAGAAGCTAAGTGCGCAGCCGAT GAGGCTAAGGAGGTGCGTGAAGCCGAGGAGTTGCGCGCA GCTCTACCACCTTTGGCAGCTGATGTTGAGGAGCCCACTCT GGAAGCCGATGTCGACTTGATGTTACAAGAGGCTGGGGCC GGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCA GCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCT TTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCA TCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCT GGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTA AAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGA CTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACG AACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACA CATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAC TGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGAC ATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTG GGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCA TGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCT CCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAG GATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAA AAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAG AAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGT CAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCA AACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCT TGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAG

		ACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGC GGTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCAC GAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCG TTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTA CGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAG ATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGA CGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGT TGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCT GCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTC GGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCT GAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCA TCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAAC ACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAG AGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACAT CTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAG GCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGA AGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACT GTGGATTATTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGAT AGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATC TGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCA TTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATG TACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCA GGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGT CTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGC GCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCT TTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCT TCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGT CGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGG TTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGG ATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATA TTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAG CAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAA GAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCA GCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCAT CATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTAT GCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTT GTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCC TTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTC CAGACTCCACGAAGCCGGATGTGCACCCTCATATCATGTGG TGCGAGGGGATATTGCCACGGCCACCGAAGGAGTGATTAT AAATGCTGCTAACAGCAAAGGACAACCTGGCGGAGGGGTG TGCGGAGCGCTGTATAAGAAATTCCCGGAAAGCTTCGATTT ACAGCCGATCGAAGTAGGAAAAGCGCGACTGGTCAAAGGT GCAGCTAAACATATCATTCATGCCGTAGGACCAAACTTCAA CAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTGACAAACAGTTGGCAGAG GCTTATGAGTCCATCGCTAAGATTGTCAACGATAACAATTA CAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTTGTCCACCGGCATCTTTT CCGGGAACAAAGATCGACTAACCCAATCATTGAACCATTTG

		CTGACAGCTTTAGACACCACTGATGCAGATGTAGCCATATA CTGCAGGGACAAGAAATGGGAAATGACTCTCAAGGAAGCA GTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGAGGAGATATGCATATCCG ACGACTCTTCAGTGACAGAACCTGATGCAGAGCTGGTGAG GGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGCTGGAAGGAAGGGCTAC AGCACAAGCGATGGCAAAACTTTCTCATATTTGGAAGGGAC CAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGGATATAGCAGAAATTAATG CCATGTGGCCCGTTGCAACGGAGGCCAATGAGCAGGTATG CATGTATATCCTCGGAGAAAGCATGAGCAGTATTAGGTCGA AATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAAGCCTCCACACCACCTAG CACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCATGCCATGACTCCAGAAA GAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCACGTCCAGAACAAATTACT GTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCGAAGTATAGAATCACTGG TGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCAGCCTATATTGTTCTCAC CGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCCAAGGAAGTATCTCGTG GAAACACCACCGGTAGACGAGACTCCGGAGCCATCGGCAG AGAACCAATCCACAGAGGGGACACCTGAACAACCACCACTT ATAACCGAGGATGAGACCAGGACTAGAACGCCTGAGCCGA TCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGGATAGCATAAGTTTGCTG TCAGATGGCCCGACCCACCAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAG ACATTCACGGGCCGCCCTCTGTATCTAGCTCATCCTGGTCC ATTCCTCATGCATCCGACTTTGATGTGGACAGTTTATCCATA CTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGCGTGACCAGCGGGGCAA CGTCAGCCGAGACTAACTCTTACTTCGCAAAGAGTATGGAG TTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGCGCCTCGAACAGTATTCA GGAACCCTCCACATCCCGCTCCGCGCACAAGAACACCGTC ACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTCGAGAACCAGCCTAGTTT CCACCCCGCCAGGCGTGAATAGGGTGATCACTAGAGAGGA GCTCGAGGCGCTTACCCCGTCACGCACTCCTAGCAGGTCG GTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTCCAACCCGCCAGGCGTAA ATAGGGTGATTACAAGAGAGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGC ACAACAACAATGACGGTTTGATGCGGGTGCATACATCTTTT CCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACAAAAATCAGTA AGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTGGAGAGGACCG AATTGGAGATTTCGTATGCCCCGCGCCTCGACCAAGAAAAA GAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTAAATCCCACACC TGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAAGGTGGAGAAC ATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGCAAGGCCTAGG GCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGAGTGCTACCGA ACCCTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAGTGTGAACCGT GCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAAGCCTGTAACG CCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGCTTCTTACTGT ATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACATGGTTGACGG AGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTTGCCCTGCAA AGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTATTTGGAACCC ACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCAGAACACGCT CCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGAAATTGCAATG TCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGATTCGGCGGC

		CTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGTGTAATAATG AATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATCAGGCTTACT GAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATTAAAAGGACC AAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATAATTTGAATAT GTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTAATGGACTTAA AGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAAAACATACTGA AGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGCTGCCGATCCG CTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACCGAGAGCTGG TTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAACATTCATACA CTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACGCTATTATAGC CGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTGGAAACTGACA TCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACGCCATGGCTCT GACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGTGTGGACGCA GAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCGGCGAAATTTC ATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTAAATTCGGAGC CATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTGTTTGTGAACA CAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGTGTTGAGAGAA CGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTCATTGGAGATGA CAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAAATTAATGGCAG ACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAAGTCAAGATTATA GATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTTATTTCTGTGGAG GGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGCACAGCGTGCCGT GTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTAAGCTTGGCAAACC TCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGATGACAGGAGAAGG GCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGGAACCGAGTGGGTA TTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAGAATCAAGGTATGAA ACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATGGCCATGACTACTCT AGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTACCTGAGAGGGGCCC CTATAACTCTCTACGGCTAACCTGAATGGACTACGACATAG TCTAGTCCGCCAAGATATCGGCGCGCCGTTTAAACGGCCG GCCTTAATTAAGTAACGATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGC TTACATAGAACTCGCGGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAATT TTTATTTTATTTTTCTTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTT AATATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTTCAGCGTAAC TGGACTGGCCACAGTTAGGCGGCCGCGCATGTTCATCATC AGTAACCCGTATCGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTA TCATTACCTCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACGGAGGCA TCAGTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCG CTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCA ACGAGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATC GCTTCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCG CGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCA GCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCC GGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTT GGCGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGC GATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGA GCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC

		CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTC GCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCT GCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGG TTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT GAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGC CGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACG AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAA GCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACC GGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCT TTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGG TCGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTT CAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGA GTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCA GCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCG GTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCC AGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTTGCAAG CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATC CTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAA AACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAG GATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAA ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTA TTAGAAAAATTCATCCAGCAGACGATAAAACGCAATACGCT GGCTATCCGGTGCCGCAATGCCATACAGCACCAGAAAACG ATCCGCCCATTCGCCGCCCAGTTCTTCCGCAATATCACGGG TGGCCAGCGCAATATCCTGATAACGATCCGCCACGCCCAG ACGGCCGCAATCAATAAAGCCGCTAAAACGGCCATTTTCCA CCATAATGTTCGGCAGGCACGCATCACCATGGGTCACCACC AGATCTTCGCCATCCGGCATGCTCGCTTTCAGACGCGCAAA CAGCTCTGCCGGTGCCAGGCCCTGATGTTCTTCATCCAGAT CATCCTGATCCACCAGGCCCGCTTCCATACGGGTACGCGC ACGTTCAATACGATGTTTCGCCTGATGATCAAACGGACAGG TCGCCGGGTCCAGGGTATGCAGACGACGCATGGCATCCGC CATAATGCTCACTTTTTCTGCCGGCGCCAGATGGCTAGACA GCAGATCCTGACCCGGCACTTCGCCCAGCAGCAGCCAATC ACGGCCCGCTTCGGTCACCACATCCAGCACCGCCGCACAC GGAACACCGGTGGTGGCCAGCCAGCTCAGACGCGCCGCTT CATCCTGCAGCTCGTTCAGCGCACCGCTCAGATCGGTTTTC ACAAACAGCACCGGACGACCCTGCGCGCTCAGACGAAACA CCGCCGCATCAGAGCAGCCAATGGTCTGCTGCGCCCAATC ATAGCCAAACAGACGTTCCACCCACGCTGCCGGGCTACCC GCATGCAGGCCATCCTGTTCAATCATACTCTTCCTTTTTCAA TATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGA TACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTT CCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGA

		AACCATTATTATCATGACATTAAGCATCCGCCTTTCGTTTTA TTTGACCATGTTGGTATG
34	Terminador T7	AACCCCTCTCTAAACGGAGGGGTTTTTTT
35	Promotor AmpR	CGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAAT ATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCA ATAATATTGAAAAAGGAAGAGT
36	Promotor 26S	CTCTCTACGGCTAACCTGAATGGA
37	Promotor T7	TAATACGACTCACTATAG
38	Sitio de poli A	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
39	Secuencia de replicación alfa 5'de nsP1	TAGGAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATT CCTCAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTA GAAGCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAG AGCGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGG TGGACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGA
40	DLP	ATAGTCAGCATAGTACATTTCATCTGACTAATACTACAACAC CACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCC GCCCCTTCCCGGCCCCCACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAG AAGGAGGCAGGCGGCCCCG
41	P2A	GGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCTGAAGCAGGCTG GAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCT
42	Bon	CGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTAT ACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGA GTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAA GGAGAAAATACCGCATCAGG
43	DLP nsp ORF	ATGAATAGAGGATTCTTTAACATGCTCGGCCGCCGCCCCTT CCCGGCCCCCACTGCCATGTGGAGGCCGCGGAGAAGGAG GCAGGCGGCCCCGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTG CTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTG AGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCTC AGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAAG CCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAGC GTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTGG ACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCGCC CGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTCC GATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTAT GCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAA GGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATG AGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACG ACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTA CCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATC ACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGG CTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAG CATATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTG

		TTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTAT GGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAG TATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCG ACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGC ACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTAC ACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGT CGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGC CTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTG TGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCT CTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGAC CAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACG ACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGT CGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAA ATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTGG GCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCAC TAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTG GGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCC CGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCAC TCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGAT CGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCAC AAGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAG AAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGA AGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCT GATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGA TGTTACAAGAGGCTGGGGCCGGCTCAGTGGAGACACCTCG TGGCTTGATAAAGGTTACCAGCTACGATGGCGAGGACAAG ATCGGCTCTTACGCTGTGCTTTCTCCGCAGGCTGTACTCAA GAGTGAAAAATTATCTTGCATCCACCCTCTCGCTGAACAAG TCATAGTGATAACACACTCTGGCCGAAAAGGGCGTTATGCC GTGGAACCATACCATGGTAAAGTAGTGGTGCCAGAGGGAC ATGCAATACCCGTCCAGGACTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGT GCCACCATTGTGTACAACGAACGTGAGTTCGTAAACAGGTA CCTGCACCATATTGCCACACATGGAGGAGCGCTGAACACT GATGAAGAATATTACAAAACTGTCAAGCCCAGCGAGCACGA CGGCGAATACCTGTACGACATCGACAGGAAACAGTGCGTC AAGAAAGAACTAGTCACTGGGCTAGGGCTCACAGGCGAGC TGGTGGATCCTCCCTTCCATGAATTCGCCTACGAGAGTCTG AGAACACGACCAGCCGCTCCTTACCAAGTACCAACCATAGG GGTGTATGGCGTGCCAGGATCAGGCAAGTCTGGCATCATT AAAAGCGCAGTCACCAAAAAAGATCTAGTGGTGAGCGCCA AGAAAGAAAACTGTGCAGAAATTATAAGGGACGTCAAGAAA ATGAAAGGGCTGGACGTCAATGCCAGAACTGTGGACTCAG TGCTCTTGAATGGATGCAAACACCCCGTAGAGACCCTGTAT ATTGACGAAGCTTTTGCTTGTCATGCAGGTACTCTCAGAGC GCTCATAGCCATTATAAGACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCG GGGATCCCAAACAGTGCGGTTTTTTTAACATGATGTGCCTG AAAGTGCATTTTAACCACGAGATTTGCACACAAGTCTTCCA CAAAAGCATCTCTCGCCGTTGCACTAAATCTGTGACTTCGG

		TCGTCTCAACCTTGTTTTACGACAAAAAAATGAGAACGACG AATCCGAAAGAGACTAAGATTGTGATTGACACTACCGGCAG TACCAAACCTAAGCAGGACGATCTCATTCTCACTTGTTTCAG AGGGTGGGTGAAGCAGTTGCAAATAGATTACAAAGGCAAC GAAATAATGACGGCAGCTGCCTCTCAAGGGCTGACCCGTA AAGGTGTGTATGCCGTTCGGTACAAGGTGAATGAAAATCCT CTGTACGCACCCACCTCTGAACATGTGAACGTCCTACTGAC CCGCACGGAGGACCGCATCGTGTGGAAAACACTAGCCGGC GACCCATGGATAAAAACACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAA TTTCACTGCCACGATAGAGGAGTGGCAAGCAGAGCATGAT GCCATCATGAGGCACATCTTGGAGAGACCGGACCCTACCG ACGTCTTCCAGAATAAGGCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGC TTTAGTGCCGGTGCTGAAGACCGCTGGCATAGACATGACC ACTGAACAATGGAACACTGTGGATTATTTTGAAACGGACAA AGCTCACTCAGCAGAGATAGTATTGAACCAACTATGCGTGA GGTTCTTTGGACTCGATCTGGACTCCGGTCTATTTTCTGCA CCCACTGTTCCGTTATCCATTAGGAATAATCACTGGGATAA CTCCCCGTCGCCTAACATGTACGGGCTGAATAAAGAAGTG GTCCGTCAGCTCTCTCGCAGGTACCCACAACTGCCTCGGG CAGTTGCCACTGGAAGAGTCTATGACATGAACACTGGTACA CTGCGCAATTATGATCCGCGCATAAACCTAGTACCTGTAAA CAGAAGACTGCCTCATGCTTTAGTCCTCCACCATAATGAAC ACCCACAGAGTGACTTTTCTTCATTCGTCAGCAAATTGAAG GGCAGAACTGTCCTGGTGGTCGGGGAAAAGTTGTCCGTCC CAGGCAAAATGGTTGACTGGTTGTCAGACCGGCCTGAGGC TACCTTCAGAGCTCGGCTGGATTTAGGCATCCCAGGTGATG TGCCCAAATATGACATAATATTTGTTAATGTGAGGACCCCAT ATAAATACCATCACTATCAGCAGTGTGAAGACCATGCCATT AAGCTTAGCATGTTGACCAAGAAAGCTTGTCTGCATCTGAA TCCCGGCGGAACCTGTGTCAGCATAGGTTATGGTTACGCTG ACAGGGCCAGCGAAAGCATCATTGGTGCTATAGCGCGGCA GTTCAAGTTTTCCCGGGTATGCAAACCGAAATCCTCACTTG AAGAGACGGAAGTTCTGTTTGTATTCATTGGGTACGATCGC AAGGCCCGTACGCACAATCCTTACAAGCTTTCATCAACCTT GACCAACATTTATACAGGTTCCAGACTCCACGAAGCCGGAT GTGCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCAC GGCCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAA GGACAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAG AAATTCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGG AAAAGCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTC ATGCCGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAA GGTGACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTA AGATTGTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCA CTGTTGTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACT AACCCAATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCA CTGATGCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATG GGAAATGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCA GTGGAGGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAG

		AACCTGATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTC TTTGGCTGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAA ACTTTCTCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGC CAAGGATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAA CGGAGGCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGA AAGCATGAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAG TCGGAAGCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTG CATCCATGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAG CCTCACGTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCAT TGCCGAAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGC TCCCAGCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATT CATCCAAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACG AGACTCCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGG GACACCTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCA GGACTAGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGA AGAGGATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACCCAC CAGGTGCTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCT CTGTATCTAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACT TTGATGTGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGA GCTAGCGTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACT CTTACTTCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTG CCTGCGCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGC TCCGCGCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCC TGCTCGAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGA ATAGGGTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCC GTCACGCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTG GTCTCCAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAG AGGAGTTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGA
44	nsP2	GGCTCAGTGGAGACACCTCGTGGCTTGATAAAGGTTACCA GCTACGATGGCGAGGACAAGATCGGCTCTTACGCTGTGCT TTCTCCGCAGGCTGTACTCAAGAGTGAAAAATTATCTTGCA TCCACCCTCTCGCTGAACAAGTCATAGTGATAACACACTCT GGCCGAAAAGGGCGTTATGCCGTGGAACCATACCATGGTA AAGTAGTGGTGCCAGAGGGACATGCAATACCCGTCCAGGA CTTTCAAGCTCTGAGTGAAAGTGCCACCATTGTGTACAACG AACGTGAGTTCGTAAACAGGTACCTGCACCATATTGCCACA CATGGAGGAGCGCTGAACACTGATGAAGAATATTACAAAAC TGTCAAGCCCAGCGAGCACGACGGCGAATACCTGTACGAC ATCGACAGGAAACAGTGCGTCAAGAAAGAACTAGTCACTG GGCTAGGGCTCACAGGCGAGCTGGTGGATCCTCCCTTCCA TGAATTCGCCTACGAGAGTCTGAGAACACGACCAGCCGCT CCTTACCAAGTACCAACCATAGGGGTGTATGGCGTGCCAG GATCAGGCAAGTCTGGCATCATTAAAAGCGCAGTCACCAAA AAAGATCTAGTGGTGAGCGCCAAGAAAGAAAACTGTGCAG AAATTATAAGGGACGTCAAGAAAATGAAAGGGCTGGACGT CAATGCCAGAACTGTGGACTCAGTGCTCTTGAATGGATGCA AACACCCCGTAGAGACCCTGTATATTGACGAAGCTTTTGCT

		TGTCATGCAGGTACTCTCAGAGCGCTCATAGCCATTATAAG ACCTAAAAAGGCAGTGCTCTGCGGGGATCCCAAACAGTGC GGTTTTTTTAACATGATGTGCCTGAAAGTGCATTTTAACCAC GAGATTTGCACACAAGTCTTCCACAAAAGCATCTCTCGCCG TTGCACTAAATCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTTTTA CGACAAAAAAATGAGAACGACGAATCCGAAAGAGACTAAG ATTGTGATTGACACTACCGGCAGTACCAAACCTAAGCAGGA CGATCTCATTCTCACTTGTTTCAGAGGGTGGGTGAAGCAGT TGCAAATAGATTACAAAGGCAACGAAATAATGACGGCAGCT GCCTCTCAAGGGCTGACCCGTAAAGGTGTGTATGCCGTTC GGTACAAGGTGAATGAAAATCCTCTGTACGCACCCACCTCT GAACATGTGAACGTCCTACTGACCCGCACGGAGGACCGCA TCGTGTGGAAAACACTAGCCGGCGACCCATGGATAAAAAC ACTGACTGCCAAGTACCCTGGGAATTTCACTGCCACGATAG AGGAGTGGCAAGCAGAGCATGATGCCATCATGAGGCACAT CTTGGAGAGACCGGACCCTACCGACGTCTTCCAGAATAAG GCAAACGTGTGTTGGGCCAAGGCTTTAGTGCCGGTGCTGA AGACCGCTGGCATAGACATGACCACTGAACAATGGAACACT GTGGATTATTTTGAAACGGACAAAGCTCACTCAGCAGAGAT AGTATTGAACCAACTATGCGTGAGGTTCTTTGGACTCGATC TGGACTCCGGTCTATTTTCTGCACCCACTGTTCCGTTATCCA TTAGGAATAATCACTGGGATAACTCCCCGTCGCCTAACATG TACGGGCTGAATAAAGAAGTGGTCCGTCAGCTCTCTCGCA GGTACCCACAACTGCCTCGGGCAGTTGCCACTGGAAGAGT CTATGACATGAACACTGGTACACTGCGCAATTATGATCCGC GCATAAACCTAGTACCTGTAAACAGAAGACTGCCTCATGCT TTAGTCCTCCACCATAATGAACACCCACAGAGTGACTTTTCT TCATTCGTCAGCAAATTGAAGGGCAGAACTGTCCTGGTGGT CGGGGAAAAGTTGTCCGTCCCAGGCAAAATGGTTGACTGG TTGTCAGACCGGCCTGAGGCTACCTTCAGAGCTCGGCTGG ATTTAGGCATCCCAGGTGATGTGCCCAAATATGACATAATA TTTGTTAATGTGAGGACCCCATATAAATACCATCACTATCAG CAGTGTGAAGACCATGCCATTAAGCTTAGCATGTTGACCAA GAAAGCTTGTCTGCATCTGAATCCCGGCGGAACCTGTGTCA GCATAGGTTATGGTTACGCTGACAGGGCCAGCGAAAGCAT CATTGGTGCTATAGCGCGGCAGTTCAAGTTTTCCCGGGTAT GCAAACCGAAATCCTCACTTGAAGAGACGGAAGTTCTGTTT GTATTCATTGGGTACGATCGCAAGGCCCGTACGCACAATCC TTACAAGCTTTCATCAACCTTGACCAACATTTATACAGGTTC CAGACTCCACGAAGCCGGATGT
45	nsP4	TACATCTTTTCCTCCGACACCGGTCAAGGGCATTTACAACA AAAATCAGTAAGGCAAACGGTGCTATCCGAAGTGGTGTTG GAGAGGACCGAATTGGAGATTTCGTATGCCCCGCGCCTCG ACCAAGAAAAAGAAGAATTACTACGCAAGAAATTACAGTTA AATCCCACACCTGCTAACAGAAGCAGATACCAGTCCAGGAA GGTGGAGAACATGAAAGCCATAACAGCTAGACGTATTCTGC AAGGCCTAGGGCATTATTTGAAGGCAGAAGGAAAAGTGGA

		GTGCTACCGAACCCTGCATCCTGTTCCTTTGTATTCATCTAG TGTGAACCGTGCCTTTTCAAGCCCCAAGGTCGCAGTGGAA GCCTGTAACGCCATGTTGAAAGAGAACTTTCCGACTGTGGC TTCTTACTGTATTATTCCAGAGTACGATGCCTATTTGGACAT GGTTGACGGAGCTTCATGCTGCTTAGACACTGCCAGTTTTT GCCCTGCAAAGCTGCGCAGCTTTCCAAAGAAACACTCCTAT TTGGAACCCACAATACGATCGGCAGTGCCTTCAGCGATCCA GAACACGCTCCAGAACGTCCTGGCAGCTGCCACAAAAAGA AATTGCAATGTCACGCAAATGAGAGAATTGCCCGTATTGGA TTCGGCGGCCTTTAATGTGGAATGCTTCAAGAAATATGCGT GTAATAATGAATATTGGGAAACGTTTAAAGAAAACCCCATC AGGCTTACTGAAGAAAACGTGGTAAATTACATTACCAAATT AAAAGGACCAAAAGCTGCTGCTCTTTTTGCGAAGACACATA ATTTGAATATGTTGCAGGACATACCAATGGACAGGTTTGTA ATGGACTTAAAGAGAGACGTGAAAGTGACTCCAGGAACAA AACATACTGAAGAACGGCCCAAGGTACAGGTGATCCAGGC TGCCGATCCGCTAGCAACAGCGTATCTGTGCGGAATCCACC GAGAGCTGGTTAGGAGATTAAATGCGGTCCTGCTTCCGAA CATTCATACACTGTTTGATATGTCGGCTGAAGACTTTGACG CTATTATAGCCGAGCACTTCCAGCCTGGGGATTGTGTTCTG GAAACTGACATCGCGTCGTTTGATAAAAGTGAGGACGACG CCATGGCTCTGACCGCGTTAATGATTCTGGAAGACTTAGGT GTGGACGCAGAGCTGTTGACGCTGATTGAGGCGGCTTTCG GCGAAATTTCATCAATACATTTGCCCACTAAAACTAAATTTA AATTCGGAGCCATGATGAAATCTGGAATGTTCCTCACACTG TTTGTGAACACAGTCATTAACATTGTAATCGCAAGCAGAGT GTTGAGAGAACGGCTAACCGGATCACCATGTGCAGCATTC ATTGGAGATGACAATATCGTGAAAGGAGTCAAATCGGACAA ATTAATGGCAGACAGGTGCGCCACCTGGTTGAATATGGAA GTCAAGATTATAGATGCTGTGGTGGGCGAGAAAGCGCCTT ATTTCTGTGGAGGGTTTATTTTGTGTGACTCCGTGACCGGC ACAGCGTGCCGTGTGGCAGACCCCCTAAAAAGGCTGTTTA AGCTTGGCAAACCTCTGGCAGCAGACGATGAACATGATGA TGACAGGAGAAGGGCATTGCATGAAGAGTCAACACGCTGG AACCGAGTGGGTATTCTTTCAGAGCTGTGCAAGGCAGTAG AATCAAGGTATGAAACCGTAGGAACTTCCATCATAGTTATG GCCATGACTACTCTAGCTAGCAGTGTTAAATCATTCAGCTA CCTGAGAGGGGCCCCTATAACTCTCTACGGC
46	nsP3	GCACCCTCATATCATGTGGTGCGAGGGGATATTGCCACGG CCACCGAAGGAGTGATTATAAATGCTGCTAACAGCAAAGGA CAACCTGGCGGAGGGGTGTGCGGAGCGCTGTATAAGAAAT TCCCGGAAAGCTTCGATTTACAGCCGATCGAAGTAGGAAAA GCGCGACTGGTCAAAGGTGCAGCTAAACATATCATTCATGC CGTAGGACCAAACTTCAACAAAGTTTCGGAGGTTGAAGGTG ACAAACAGTTGGCAGAGGCTTATGAGTCCATCGCTAAGATT GTCAACGATAACAATTACAAGTCAGTAGCGATTCCACTGTT GTCCACCGGCATCTTTTCCGGGAACAAAGATCGACTAACCC

		AATCATTGAACCATTTGCTGACAGCTTTAGACACCACTGAT GCAGATGTAGCCATATACTGCAGGGACAAGAAATGGGAAA TGACTCTCAAGGAAGCAGTGGCTAGGAGAGAAGCAGTGGA GGAGATATGCATATCCGACGACTCTTCAGTGACAGAACCTG ATGCAGAGCTGGTGAGGGTGCATCCGAAGAGTTCTTTGGC TGGAAGGAAGGGCTACAGCACAAGCGATGGCAAAACTTTC TCATATTTGGAAGGGACCAAGTTTCACCAGGCGGCCAAGG ATATAGCAGAAATTAATGCCATGTGGCCCGTTGCAACGGAG GCCAATGAGCAGGTATGCATGTATATCCTCGGAGAAAGCAT GAGCAGTATTAGGTCGAAATGCCCCGTCGAAGAGTCGGAA GCCTCCACACCACCTAGCACGCTGCCTTGCTTGTGCATCCA TGCCATGACTCCAGAAAGAGTACAGCGCCTAAAAGCCTCAC GTCCAGAACAAATTACTGTGTGCTCATCCTTTCCATTGCCG AAGTATAGAATCACTGGTGTGCAGAAGATCCAATGCTCCCA GCCTATATTGTTCTCACCGAAAGTGCCTGCGTATATTCATCC AAGGAAGTATCTCGTGGAAACACCACCGGTAGACGAGACT CCGGAGCCATCGGCAGAGAACCAATCCACAGAGGGGACAC CTGAACAACCACCACTTATAACCGAGGATGAGACCAGGACT AGAACGCCTGAGCCGATCATCATCGAAGAGGAAGAAGAGG ATAGCATAAGTTTGCTGTCAGATGGCCCGACCCACCAGGTG CTGCAAGTCGAGGCAGACATTCACGGGCCGCCCTCTGTAT CTAGCTCATCCTGGTCCATTCCTCATGCATCCGACTTTGATG TGGACAGTTTATCCATACTTGACACCCTGGAGGGAGCTAGC GTGACCAGCGGGGCAACGTCAGCCGAGACTAACTCTTACT TCGCAAAGAGTATGGAGTTTCTGGCGCGACCGGTGCCTGC GCCTCGAACAGTATTCAGGAACCCTCCACATCCCGCTCCGC GCACAAGAACACCGTCACTTGCACCCAGCAGGGCCTGCTC GAGAACCAGCCTAGTTTCCACCCCGCCAGGCGTGAATAGG GTGATCACTAGAGAGGAGCTCGAGGCGCTTACCCCGTCAC GCACTCCTAGCAGGTCGGTCTCGAGAACCAGCCTGGTCTC CAACCCGCCAGGCGTAAATAGGGTGATTACAAGAGAGGAG TTTGAGGCGTTCGTAGCACAACAACAATGACGGTTTGATGC GGGTGCA
47	nsP1	GAGAAAGTTCACGTTGACATCGAGGAAGACAGCCCATTCCT CAGAGCTTTGCAGCGGAGCTTCCCGCAGTTTGAGGTAGAA GCCAAGCAGGTCACTGATAATGACCATGCTAATGCCAGAG CGTTTTCGCATCTGGCTTCAAAACTGATCGAAACGGAGGTG GACCCATCCGACACGATCCTTGACATTGGAAGTGCGCCCG CCCGCAGAATGTATTCTAAGCACAAGTATCATTGTATCTGTC CGATGAGATGTGCGGAAGATCCGGACAGATTGTATAAGTAT GCAACTAAGCTGAAGAAAAACTGTAAGGAAATAACTGATAA GGAATTGGACAAGAAAATGAAGGAGCTCGCCGCCGTCATG AGCGACCCTGACCTGGAAACTGAGACTATGTGCCTCCACG ACGACGAGTCGTGTCGCTACGAAGGGCAAGTCGCTGTTTA CCAGGATGTATACGCGGTTGACGGACCGACAAGTCTCTATC ACCAAGCCAATAAGGGAGTTAGAGTCGCCTACTGGATAGG CTTTGACACCACCCCTTTTATGTTTAAGAACTTGGCTGGAG

		CATATCCATCATACTCTACCAACTGGGCCGACGAAACCGTG TTAACGGCTCGTAACATAGGCCTATGCAGCTCTGACGTTAT GGAGCGGTCACGTAGAGGGATGTCCATTCTTAGAAAGAAG TATTTGAAACCATCCAACAATGTTCTATTCTCTGTTGGCTCG ACCATCTACCACGAGAAGAGGGACTTACTGAGGAGCTGGC ACCTGCCGTCTGTATTTCACTTACGTGGCAAGCAAAATTAC ACATGTCGGTGTGAGACTATAGTTAGTTGCGACGGGTACGT CGTTAAAAGAATAGCTATCAGTCCAGGCCTGTATGGGAAGC CTTCAGGCTATGCTGCTACGATGCACCGCGAGGGATTCTTG TGCTGCAAAGTGACAGACACATTGAACGGGGAGAGGGTCT CTTTTCCCGTGTGCACGTATGTGCCAGCTACATTGTGTGAC CAAATGACTGGCATACTGGCAACAGATGTCAGTGCGGACG ACGCGCAAAAACTGCTGGTTGGGCTCAACCAGCGTATAGT CGTCAACGGTCGCACCCAGAGAAACACCAATACCATGAAAA ATTACCTTTTGCCCGTAGTGGCCCAGGCATTTGCTAGGTGG GCAAAGGAATATAAGGAAGATCAAGAAGATGAAAGGCCAC TAGGACTACGAGATAGACAGTTAGTCATGGGGTGTTGTTG GGCTTTTAGAAGGCACAAGATAACATCTATTTATAAGCGCC CGGATACCCAAACCATCATCAAAGTGAACAGCGATTTCCAC TCATTCGTGCTGCCCAGGATAGGCAGTAACACATTGGAGAT CGGGCTGAGAACAAGAATCAGGAAAATGTTAGAGGAGCAC AAGGAGCCGTCACCTCTCATTACCGCCGAGGACGTACAAG AAGCTAAGTGCGCAGCCGATGAGGCTAAGGAGGTGCGTGA AGCCGAGGAGTTGCGCGCAGCTCTACCACCTTTGGCAGCT GATGTTGAGGAGCCCACTCTGGAAGCCGATGTCGACTTGA TGTTACAAGAGGCTGGGGCC
48	KanR	ATGATTGAACAGGATGGCCTGCATGCGGGTAGCCCGGCAG CGTGGGTGGAACGTCTGTTTGGCTATGATTGGGCGCAGCA GACCATTGGCTGCTCTGATGCGGCGGTGTTTCGTCTGAGC GCGCAGGGTCGTCCGGTGCTGTTTGTGAAAACCGATCTGA GCGGTGCGCTGAACGAGCTGCAGGATGAAGCGGCGCGTC TGAGCTGGCTGGCCACCACCGGTGTTCCGTGTGCGGCGGT GCTGGATGTGGTGACCGAAGCGGGCCGTGATTGGCTGCTG CTGGGCGAAGTGCCGGGTCAGGATCTGCTGTCTAGCCATC TGGCGCCGGCAGAAAAAGTGAGCATTATGGCGGATGCCAT GCGTCGTCTGCATACCCTGGACCCGGCGACCTGTCCGTTT GATCATCAGGCGAAACATCGTATTGAACGTGCGCGTACCC GTATGGAAGCGGGCCTGGTGGATCAGGATGATCTGGATGA AGAACATCAGGGCCTGGCACCGGCAGAGCTGTTTGCGCGT CTGAAAGCGAGCATGCCGGATGGCGAAGATCTGGTGGTGA CCCATGGTGATGCGTGCCTGCCGAACATTATGGTGGAAAAT GGCCGTTTTAGCGGCTTTATTGATTGCGGCCGTCTGGGCGT GGCGGATCGTTATCAGGATATTGCGCTGGCCACCCGTGAT ATTGCGGAAGAACTGGGCGGCGAATGGGCGGATCGTTTTC TGGTGCTGTATGGCATTGCGGCACCGGATAGCCAGCGTAT TGCGTTTTATCGTCTGCTGGATGAATTTTTCTAATAA

49	Rop	GTGACCAAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCCCGCTT TATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACG AGCTGGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCT TCACGACCACGCTGATGAGCTTTACCGCAGCTGCCTCGCG CGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGA
50	5’ UTR	ATAGGCGGCGCATGAGAGAAGCCCAGACCAATTACCTACC CAAA
51	3’ UTR	ATACAGCAGCAATTGGCAAGCTGCTTACATAGAACTCGC GGCGATTGGCATGCCGCTTTAAAATTTTTATTTTATTTTTC TTTTCTTTTCCGAATCGGATTTTGTTTTTAATATTTC
52	Promotor CVM con sitios TetO	CCATTGCATACGTTGTATCCATATCATAATATGTACATTTA TATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGA TTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAT TAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACT TACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC CCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTA ACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAG TATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGT ATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCT TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGT CATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATC AATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCA AGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGG CACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACT CCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCCCTATCAGTGAT AGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCT CGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCA CGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCC AGCCTCCGCGGCCGGGAACGGTGCATTGGAACGCGGAT TCCCCGTGCCAAGAGTGA
53	Poli A de BGH	CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTC CCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC TGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGT CTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGG GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCA GGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCC
54	Sec. líder de ubiquitina	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQRLI FAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRLRGV

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JANSSEN BIOTECH, INC.

<120> VACUNAS BASADAS EN CALR Y JAK2 MUTANTES Y SUS USOS

<130> JBI6177USNP1-103693-2008

<140> 17/097,458
<141> 2020-11-13

<150> 62/936,841
<151> 2019-11-18

<150> 62/936,846
<151> 2019-11-18

<160> 59

<170> PatentIn, versión 3.5

<210> 1
<211> 54
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 1
Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu
50

<210> 2
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido

sintético

<400> 2
Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys
1 5 10

<210> 3
<211> 71
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 3
Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys
50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys
65 70

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 4
Lys Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys
1 5 10 15

Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly
20 25 30

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido
sintético

<400> 5
Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido
sintético

<400> 6
Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
1 5

<210> 7
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido
sintético

<400> 7
Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp
1 5 10 15

Glu Asn Île Leu Val
20

<210> 8
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido

sintético

<400> 8
Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala
20

<210> 9
<211> 92
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 9
Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr
20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr
35 40 45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser
50 55 60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys
85 90

<210> 10
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 10
Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr
20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr
35 40 45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser
50 55 60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val
85 90 95

Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu
100 105 110

Asn Île Leu Val
115

<210> 11
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 11
Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
1 5 10 15

Glu Phe Ser Met Ala Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr
20 25 30

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr
35 40 45

Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser
    50   55   60

Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu
65   70   75   80

Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys
                85   90   95

Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly
            100   105   110

Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly
        115   120   125

<210> 12
<211> 95
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido
      sintético

<400> 12
Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
1   5   10   15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
            20   25   30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
        35   40   45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys
    50   55   60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val
65   70   75   80

Cys Phe Cys Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
                85   90   95

<210> 13
<211> 104
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 13
Met Lys Asp Lys Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg
1 5 10 15

Thr Lys Met Arg Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg
20 25 30

Arg Lys Met Ser Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys
35 40 45

Leu Gln Gly Trp Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys
50 55 60

Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys Leu Ser His Lys His
65 70 75 80

Leu Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu
85 90 95

Val Gln Glu Phe Val Lys Phe Gly
100

<210> 14
<211> 171
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14
Met Gln Ile Phe Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu
1 5 10 15

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp

20 25 30

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

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

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg Lys Asp Lys
65 70 75 80

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg
85 90 95

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser
100 105 110

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp
115 120 125

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met
130 135 140

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala
145 150 155 160

Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
165 170

<210> 15
<211> 180
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

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

Val Glu Pro Ser Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp

20 25 30

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

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

Ser Thr Leu His Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Val Arg Lys Asp Lys
65 70 75 80

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg
85 90 95

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser
100 105 110

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp
115 120 125

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met
130 135 140

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Lys Leu Ser His Lys His Leu Val Leu Asn
145 150 155 160

Tyr Gly Val Cys Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Gln Glu Phe
165 170 175

Val Lys Phe Gly
180

<210> 16
<211> 276
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 16
atggcatgcc caggcttcct gtgggccctg gtcatcagca cctgtctgga gttttccatg 60

gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120

cgcatgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180

cctagaacca gctgcaggga ggcatgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240

gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaag 276

<210> 17
<211> 348
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 17
atggcatgcc caggcttcct gtgggccctg gtcatcagca cctgtctgga gttttccatg 60

gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120

cgcatgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180

cctagaacca gctgcaggga ggcatgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240

gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaaggccg cctacgtgct gaattatggc 300

gtgtgcttct gtgccgccta tttttgtggc gatgagaaca tcctggtg 348

<210> 18
<211> 375
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 18
atggcatgcc caggcttcct gtgggccctg gtcatcagca cctgtctgga gttttccatg 60

gccatgaagg acaagcagga tgaggagcag cggacccgga gaatgatgag gacaaagatg 120

cgcatgaggc gcatgcggag aacaaggcgc aagatgcgga gaaagatgtc tccagcaagg 180

cctagaacca gctgcaggga ggcatgtctg cagggatgga cagaggcagc atacgaggag 240

gcagaggaca actgcaggcg catgatgagg accaaggccg cctacaagct gagccacaag 300

cacctggtgc tgaactatgg cgtgtgcttc tgtggcgatg agaatatcct ggtgcaggag 360

ttcgtgaagt ttggc 375

<210> 19
<211> 285
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 19
atgaaggaca agcaggatga ggagcagcgg acccggagaa tgatgaggac aaagatgcgc 60

atgaggcgca tgcggagaac aaggcgcaag atgcggagaa agatgtctcc agcaaggcct 120

agaaccagct gcagggaggc atgtctgcag ggatggacag aggcagcata cgaggaggca 180

gaggacaact gcaggcgcat gatgaggacc aaggccgcct acgtgctgaa ttatggcgtg 240

tgcttctgtg ccgcctattt ttgtggcgat gagaacatcc tggtg 285

<210> 20
<211> 312
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 20
atgaaggaca agcaggatga ggagcagcgg acccggagaa tgatgaggac aaagatgcgc 60

atgaggcgca tgcggagaac aaggcgcaag atgcggagaa agatgtctcc agcaaggcct 120

agaaccagct gcagggaggc atgtctgcag ggatggacag aggcagcata cgaggaggca 180

gaggacaact gcaggcgcat gatgaggacc aaggccgcct acaagctgag ccacaagcac 240

ctggtgctga actatggcgt gtgcttctgt ggcgatgaga atatcctggt gcaggagttc 300

gtgaagtttg gc 312

<210> 21
<211> 513
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 21
atgcagatct tcgtgaagac cctgacaggc aagaccatca cactggaggt ggagccctcc 60

gacaccatcg agaacgtgaa ggccaagatc caggacaagg agggcatccc ccctgatcag 120

cagcggctga tctttgccgg caagcagctg gaggacggca gaaccctgtc tgattacaat 180

atccagaagg agagcacact gcacctggtg ctgcggctga gaggcgtgag gaaggacaag 240

caggatgagg agcagcgcac ccggagaatg atgcggacaa agatgagaat gaggcgcatg 300

cggagaacca ggcgcaagat gcggagaaag atgagcccag caaggccacg cacctcctgc 360

agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcctatg aggaggccga ggacaactgc 420

aggcgcatga tgcggacaaa ggccgcctac gtgctgaatt atggcgtgtg cttctgtgcc 480

gcctattttt gtggcgatga gaacatcctg gtg 513

<210> 22
<211> 546
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 22
atgcagatct tcgtgaagac cctgacaggc aagaccatca cactggaggt ggagccctcc 60

gacaccatcg agaacgtgaa ggccaagatc caggacaagg agggcatccc ccctgatcag 120

cagcggctga tctttgccgg caagcagctg gaggacggca gaaccctgtc tgattacaat 180

atccagaagg agagcacact gcacctggtg ctgcggctga gaggcgtgag gaaggacaag 240

caggatgagg agcagcgcac ccggagaatg atgcggacaa agatgagaat gaggcgcatg 300

cggagaacca ggcgcaagat gcggagaaag atgagcccag caaggccacg cacctcctgc 360

agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcctatg aggaggccga ggacaactgc 420

aggcgcatga tgcggacaaa ggccgcctac aagctgtctc acaagcacct ggtgctgaac 480

tatggcgtgt gcttctgtgg cgatgagaat atcctggtgc aggagttcgt gaagtttggc 540

tgataa 546

<210> 23
<211> 1417
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 23
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aacattaccg ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat 540

caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600

caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660

cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720

tctccctatc agtgatagag atctccctat cagtgataga gatcgtcgac gagctcgttt 780

agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 840

ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggatctagag ccaccatggc 900

atgcccaggc ttcctgtggg ccctggtcat cagcacctgt ctggagtttt ccatggccat 960

gaaggacaag caggatgagg agcagcggac ccggagaatg atgaggacaa agatgcgcat 1020

gaggcgcatg cggagaacaa ggcgcaagat gcggagaaag atgtctccag caaggcctag 1080

aaccagctgc agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcatacg aggaggcaga 1140

ggacaactgc aggcgcatga tgaggaccaa ggccgcctac aagctgagcc acaagcacct 1200

ggtgctgaac tatggcgtgt gcttctgtgg cgatgagaat atcctggtgc aggagttcgt 1260

gaagtttggc tgataaggta ccatccgaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa 1320

taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca ttctagttgt 1380

ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat catgtct 1417

<210> 24
<211> 1390
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 24
tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta 60

ttggccattg catacgttgt atccatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc 120

aacattaccg ccatgttgac attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg 180

gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc 240

gcctggctga ccgcccaacg acccccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat 300

agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc 360

ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg acgtcaatga 420

cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttatgggact ttcctacttg 480

gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacat 540

caatgggcgt ggatagcggt ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600

caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactc 660

cgccccattg acgcaaatgg gcggtaggcg tgtacggtgg gaggtctata taagcagagc 720

tctccctatc agtgatagag atctccctat cagtgataga gatcgtcgac gagctcgttt 780

agtgaaccgt cagatcgcct ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca 840

ccgggaccga tccagcctcc gcggccggga acggtgcatt ggatctagag ccaccatggc 900

atgcccaggc ttcctgtggg ccctggtcat cagcacctgt ctggagtttt ccatggccat 960

gaaggacaag caggatgagg agcagcggac ccggagaatg atgaggacaa agatgcgcat 1020

gaggcgcatg cggagaacaa ggcgcaagat gcggagaaag atgtctccag caaggcctag 1080

aaccagctgc agggaggcat gtctgcaggg atggacagag gcagcatacg aggaggcaga 1140

ggacaactgc aggcgcatga tgaggaccaa ggccgcctac gtgctgaatt atggcgtgtg 1200

cttctgtgcc gcctattttt gtggcgatga gaacatcctg gtgtgataag gtaccatccg 1260

aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 1320

aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 1380

tatcatgtct 1390

<210> 25
<211> 549
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 25
gatcactaat tccaaaccca cccgcttttt atagtaagtt tttcacccat aaataataaa 60

tacaataatt aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acggtaagga 120

agtagaatca taaagaacag tgacggatcc cgcgacttcg ccgccatggg ccagaaggaa 180

cagattcata cgcttcagaa aaattctgaa cgaatgtcaa agcaattgac acgaagttct 240

caggcagtaa tgaaggacaa acaagacgaa gaacaacgaa ctaggcggat gatgaggact 300

aagatgagga tgcggaggat gagacggacg cgacgcaaga tgcgccggaa aatgtctccc 360

gcccggccaa ggacgtcttg tcgggaagcc tgtttgcagg gctggaccga agcagcttac 420

gaagaagcag aagacaattg tcggcgaatg atgagaacga aggctgctta cgtgcttaac 480

tatggagtgt gcttctgcgc tgcctatttc tgcggagatg agaacattct ggtgtagtaa 540

aggcgcgcc 549

<210> 26
<211> 369
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 26
atgggccaga aggaacagat tcatacgctt cagaaaaatt ctgaacgaat gtcaaagcaa 60

ttgacacgaa gttctcaggc agtaatgaag gacaaacaag acgaagaaca acgaactagg 120

cggatgatga ggactaagat gaggatgcgg aggatgagac ggacgcgacg caagatgcgc 180

cggaaaatgt ctcccgcccg gccaaggacg tcttgtcggg aagcctgttt gcagggctgg 240

accgaagcag cttacgaaga agcagaagac aattgtcggc gaatgatgag aacgaaggct 300

gcttacgtgc ttaactatgg agtgtgcttc tgcgctgcct atttctgcgg agatgagaac 360

attctggtg 369

<210> 27
<211> 285
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucléotido sintético

<400> 27
atgaaggaca aacaagacga agaacaacga actaggcgga tgatgaggac taagatgagg 60

atgcggagga tgagacggac gcgacgcaag atgcgccgga aaatgtctcc cgcccggcca 120

aggacgtctt gtcgggaagc ctgtttgcag ggctggaccg aagcagctta cgaagaagca 180

gaagacaatt gtcggcgaat gatgagaacg aaggctgctt acgtgcttaa ctatggagtg 240

tgcttctgcg ctgcctattt ctgcggagat gagaacattc tggtg 285

<210> 28
<211> 21
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 28
Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val Ala Ala Tyr Phe Cys Gly Asp
1 5 10 15

Glu Asn Île Leu Val
20

<210> 29
<211> 28
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido
sintético

<400> 29
Met Gly Gln Lys Glu Gln Ile His Thr Leu Gln Lys Asn Ser Glu Arg
1 5 10 15

Met Ser Lys Gln Leu Thr Arg Ser Ser Gln Ala Val
20 25

<210> 30
<211> 84
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
sintético

<400> 30
atgggccaga aggaacagat tcatacgctt cagaaaaatt ctgaacgaat gtcaaagcaa 60

ttgacacgaa gttctcaggc agta 84

<210> 31
<211> 123
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido
sintético

<400> 31
Met Gly Gln Lys Glu Gln Ile His Thr Leu Gln Lys Asn Ser Glu Arg
1 5 10 15

Met Ser Lys Gln Leu Thr Arg Ser Ser Gln Ala Val Met Lys Asp Lys
20 25 30

Gln Asp Glu Glu Gln Arg Thr Arg Arg Met Met Arg Thr Lys Met Arg
35 40 45

Met Arg Arg Met Arg Arg Thr Arg Arg Lys Met Arg Arg Lys Met Ser
50 55 60

Pro Ala Arg Pro Arg Thr Ser Cys Arg Glu Ala Cys Leu Gln Gly Trp
65 70 75 80

Thr Glu Ala Ala Tyr Glu Glu Ala Glu Asp Asn Cys Arg Arg Met Met
85 90 95

Arg Thr Lys Ala Ala Tyr Val Leu Asn Tyr Gly Val Cys Phe Cys Ala
100 105 110

Ala Tyr Phe Cys Gly Asp Glu Asn Ile Leu Val
115 120

<210> 32
<211> 149
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 32
gatcactaat tccaaaccca cccgcttttt atagtaagtt tttcacccat aaataataaa 60

tacaataatt aatttctcgt aaaagtagaa aatatattct aatttattgc acggtaagga 120

agtagaatca taaagaacag tgacggatc 149

<210> 33
<211> 10712
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 33
taatacgact cactatagat aggcggcgca tgagagaagc ccagaccaat tacctaccca 60

aataggagaa agttcacgtt gacatcgagg aagacagccc attcctcaga gctttgcagc 120

ggagcttccc gcagtttgag gtagaagcca agcaggtcac tgataatgac catgctaatg 180

ccagagcgtt ttcgcatctg gcttcaaaac tgatcgaaac ggaggtggac ccatccgaca 240

cgatccttga cattggaata gtcagcatag tacatttcat ctgactaata ctacaacacc 300

accaccatga atagaggatt ctttaacatg ctcggccgcc gccccttccc ggcccccact 360

gccatgtgga ggccgcggag aaggaggcag gcggccccgg gaagcggagc tactaacttc 420

agcctgctga agcaggctgg agacgtggag gagaaccctg gacctgagaa agttcacgtt 480

gacatcgagg aagacagccc attcctcaga gctttgcagc ggagcttccc gcagtttgag 540

gtagaagcca agcaggtcac tgataatgac catgctaatg ccagagcgtt ttcgcatctg 600

gcttcaaaac tgatcgaaac ggaggtggac ccatccgaca cgatccttga cattggaagt 660

gcgcccgccc gcagaatgta ttctaagcac aagtatcatt gtatctgtcc gatgagatgt 720

gcggaagatc cggacagatt gtataagtat gcaactaagc tgaagaaaaa ctgtaaggaa 780

ataactgata aggaattgga caagaaaatg aaggagctcg ccgccgtcat gagcgaccct 840

gacctggaaa ctgagactat gtgcctccac gacgacgagt cgtgtcgcta cgaagggcaa 900

gtcgctgttt accaggatgt atacgcggtt gacggaccga caagtctcta tcaccaagcc 960

aataagggag ttagagtcgc ctactggata ggctttgaca ccaccccttt tatgtttaag 1020

aacttggctg gagcatatcc atcatactct accaactggg ccgacgaaac cgtgttaacg 1080

gctcgtaaca taggcctatg cagctctgac gttatggagc ggtcacgtag agggatgtcc 1140

attcttagaa agaagtattt gaaaccatcc aacaatgttc tattctctgt tggctcgacc 1200

atctaccacg agaagaggga cttactgagg agctggcacc tgccgtctgt atttcactta 1260

cgtggcaagc aaaattacac atgtcggtgt gagactatag ttagttgcga cgggtacgtc 1320

gttaaaagaa tagctatcag tccaggcctg tatgggaagc cttcaggcta tgctgctacg 1380

atgcaccgcg agggattctt gtgctgcaaa gtgacagaca cattgaacgg ggagagggtc 1440

tcttttcccg tgtgcacgta tgtgccagct acattgtgtg accaaatgac tggcatactg 1500

gcaacagatg tcagtgcgga cgacgcgcaa aaactgctgg ttgggctcaa ccagcgtata 1560

gtcgtcaacg gtcgcaccca gagaaacacc aataccatga aaaattacct tttgcccgta 1620

gtggcccagg catttgctag gtgggcaaag gaatataagg aagatcaaga agatgaaagg 1680

ccactaggac tacgagatag acagttagtc atggggtgtt gttgggcttt tagaaggcac 1740

aagataacat ctatttataa gcgcccggat acccaaacca tcatcaaagt gaacagcgat 1800

ttccactcat tcgtgctgcc caggataggc agtaacacat tggagatcgg gctgagaaca 1860

agaatcagga aaatgttaga ggagcacaag gagccgtcac ctctcattac cgccgaggac 1920

gtacaagaag ctaagtgcgc agccgatgag gctaaggagg tgcgtgaagc cgaggagttg 1980

cgcgcagctc taccaccttt ggcagctgat gttgaggagc ccactctgga agccgatgtc 2040

gacttgatgt tacaagaggc tggggccggc tcagtggaga cacctcgtgg cttgataaag 2100

gttaccagct acgatggcga ggacaagatc ggctcttacg ctgtgctttc tccgcaggct 2160

gtactcaaga gtgaaaaatt atcttgcatc caccctctcg ctgaacaagt catagtgata 2220

acacactctg gccgaaaagg gcgttatgcc gtggaaccat accatggtaa agtagtggtg 2280

ccagagggac atgcaatacc cgtccaggac tttcaagctc tgagtgaaag tgccaccatt 2340

gtgtacaacg aacgtgagtt cgtaaacagg tacctgcacc atattgccac acatggagga 2400

gcgctgaaca ctgatgaaga atattacaaa actgtcaagc ccagcgagca cgacggcgaa 2460

tacctgtacg acatcgacag gaaacagtgc gtcaagaaag aactagtcac tgggctaggg 2520

ctcacaggcg agctggtgga tcctcccttc catgaattcg cctacgagag tctgagaaca 2580

cgaccagccg ctccttacca agtaccaacc ataggggtgt atggcgtgcc aggatcaggc 2640

aagtctggca tcattaaaag cgcagtcacc aaaaaagatc tagtggtgag cgccaagaaa 2700

gaaaactgtg cagaaattat aagggacgtc aagaaaatga aagggctgga cgtcaatgcc 2760

agaactgtgg actcagtgct cttgaatgga tgcaaacacc ccgtagagac cctgtatatt 2820

gacgaagctt ttgcttgtca tgcaggtact ctcagagcgc tcatagccat tataagacct 2880

aaaaaggcag tgctctgcgg ggatcccaaa cagtgcggtt tttttaacat gatgtgcctg 2940

aaagtgcatt ttaaccacga gatttgcaca caagtcttcc acaaaagcat ctctcgccgt 3000

tgcactaaat ctgtgacttc ggtcgtctca accttgtttt acgacaaaaa aatgagaacg 3060

acgaatccga aagagactaa gattgtgatt gacactaccg gcagtaccaa acctaagcag 3120

gacgatctca ttctcacttg tttcagaggg tgggtgaagc agttgcaaat agattacaaa 3180

ggcaacgaaa taatgacggc agctgcctct caagggctga cccgtaaagg tgtgtatgcc 3240

gttcggtaca aggtgaatga aaatcctctg tacgcaccca cctctgaaca tgtgaacgtc 3300

ctactgaccc gcacggagga ccgcatcgtg tggaaaacac tagccggcga cccatggata 3360

aaaacactga ctgccaagta ccctgggaat ttcactgcca cgatagagga gtggcaagca 3420

gagcatgatg ccatcatgag gcacatcttg gagagaccgg accctaccga cgtcttccag 3480

aataaggcaa acgtgtgttg ggccaaggct ttagtgccgg tgctgaagac cgctggcata 3540

gacatgacca ctgaacaatg gaacactgtg gattattttg aaacggacaa agctcactca 3600

gcagagatag tattgaacca actatgcgtg aggttctttg gactcgatct ggactccggt 3660

ctattttctg cacccactgt tccgttatcc attaggaata atcactggga taactccccg 3720

tcgcctaaca tgtacgggct gaataaagaa gtggtccgtc agctctctcg caggtaccca 3780

caactgcctc gggcagttgc cactggaaga gtctatgaca tgaacactgg tacactgcgc 3840

aattatgatc cgcgcataaa cctagtacct gtaaacagaa gactgcctca tgctttagtc 3900

ctccaccata atgaacaccc acagagtgac ttttcttcat tcgtcagcaa attgaagggc 3960

agaactgtcc tggtggtcgg ggaaaagttg tccgtcccag gcaaaatggt tgactggttg 4020

tcagaccggc ctgaggctac cttcagagct cggctggatt taggcatccc aggtgatgtg 4080

cccaaatatg acataatatt tgttaatgtg aggaccccat ataaatacca tcactatcag 4140

cagtgtgaag accatgccat taagcttagc atgttgacca agaaagcttg tctgcatctg 4200

aatcccggcg gaacctgtgt cagcataggt tatggttacg ctgacagggc cagcgaaagc 4260

atcattggtg ctatagcgcg gcagttcaag ttttcccggg tatgcaaacc gaaatcctca 4320

cttgaagaga cggaagttct gtttgtattc attgggtacg atcgcaaggc ccgtacgcac 4380

aatccttaca agctttcatc aaccttgacc aacatttata caggttccag actccacgaa 4440

gccggatgtg caccctcata tcatgtggtg cgaggggata ttgccacggc caccgaagga 4500

gtgattataa atgctgctaa cagcaaagga caacctggcg gaggggtgtg cggagcgctg 4560

tataagaaat tcccggaaag cttcgattta cagccgatcg aagtaggaaa agcgcgactg 4620

gtcaaaggtg cagctaaaca tatcattcat gccgtaggac caaacttcaa caaagtttcg 4680

gaggttgaag gtgacaaaca gttggcagag gcttatgagt ccatcgctaa gattgtcaac 4740

gataacaatt acaagtcagt agcgattcca ctgttgtcca ccggcatctt ttccgggaac 4800

aaagatcgac taacccaatc attgaaccat ttgctgacag ctttagacac cactgatgca 4860

gatgtagcca tatactgcag ggacaagaaa tgggaaatga ctctcaagga agcagtggct 4920

aggagagaag cagtggagga gatatgcata tccgacgact cttcagtgac agaacctgat 4980

gcagagctgg tgagggtgca tccgaagagt tctttggctg gaaggaaggg ctacagcaca 5040

agcgatggca aaactttctc atatttggaa gggaccaagt ttcaccaggc ggccaaggat 5100

atagcagaaa ttaatgccat gtggcccgtt gcaacggagg ccaatgagca ggtatgcatg 5160

tatatcctcg gagaaagcat gagcagtatt aggtcgaaat gccccgtcga agagtcggaa 5220

gcctccacac cacctagcac gctgccttgc ttgtgcatcc atgccatgac tccagaaaga 5280

gtacagcgcc taaaagcctc acgtccagaa caaattactg tgtgctcatc ctttccattg 5340

ccgaagtata gaatcactgg tgtgcagaag atccaatgct cccagcctat attgttctca 5400

ccgaaagtgc ctgcgtatat tcatccaagg aagtatctcg tggaaacacc accggtagac 5460

gagactccgg agccatcggc agagaaccaa tccacagagg ggacacctga acaaccacca 5520

cttataaccg aggatgagac caggactaga acgcctgagc cgatcatcat cgaagaggaa 5580

gaagaggata gcataagttt gctgtcagat ggcccgaccc accaggtgct gcaagtcgag 5640

gcagacattc acgggccgcc ctctgtatct agctcatcct ggtccattcc tcatgcatcc 5700

gactttgatg tggacagttt atccatactt gacaccctgg agggagctag cgtgaccagc 5760

ggggcaacgt cagccgagac taactcttac ttcgcaaaga gtatggagtt tctggcgcga 5820

ccggtgcctg cgcctcgaac agtattcagg aaccctccac atcccgctcc gcgcacaaga 5880

acaccgtcac ttgcacccag cagggcctgc tcgagaacca gcctagtttc caccccgcca 5940

ggcgtgaata gggtgatcac tagagaggag ctcgaggcgc ttaccccgtc acgcactcct 6000

agcaggtcgg tctcgagaac cagcctggtc tccaacccgc caggcgtaaa tagggtgatt 6060

acaagagagg agtttgaggc gttcgtagca caacaacaat gacggtttga tgcgggtgca 6120

tacatctttt cctccgacac cggtcaaggg catttacaac aaaaatcagt aaggcaaacg 6180

gtgctatccg aagtggtgtt ggagaggacc gaattggaga tttcgtatgc cccgcgcctc 6240

gaccaagaaa aagaagaatt actacgcaag aaattacagt taaatcccac acctgctaac 6300

agaagcagat accagtccag gaaggtggag aacatgaaag ccataacagc tagacgtatt 6360

ctgcaaggcc tagggcatta tttgaaggca gaaggaaaag tggagtgcta ccgaaccctg 6420

catcctgttc ctttgtattc atctagtgtg aaccgtgcct tttcaagccc caaggtcgca 6480

gtggaagcct gtaacgccat gttgaaagag aactttccga ctgtggcttc ttactgtatt 6540

attccagagt acgatgccta tttggacatg gttgacggag cttcatgctg cttagacact 6600

gccagttttt gccctgcaaa gctgcgcagc tttccaaaga aacactccta tttggaaccc 6660

acaatacgat cggcagtgcc ttcagcgatc cagaacacgc tccagaacgt cctggcagct 6720

gccacaaaaa gaaattgcaa tgtcacgcaa atgagagaat tgcccgtatt ggattcggcg 6780

gcctttaatg tggaatgctt caagaaatat gcgtgtaata atgaatattg ggaaacgttt 6840

aaagaaaacc ccatcaggct tactgaagaa aacgtggtaa attacattac caaattaaaa 6900

ggaccaaaag ctgctgctct ttttgcgaag acacataatt tgaatatgtt gcaggacata 6960

ccaatggaca ggtttgtaat ggacttaaag agagacgtga aagtgactcc aggaacaaaa 7020

catactgaag aacggcccaa ggtacaggtg atccaggctg ccgatccgct agcaacagcg 7080

tatctgtgcg gaatccaccg agagctggtt aggagattaa atgcggtcct gcttccgaac 7140

attcatacac tgtttgatat gtcggctgaa gactttgacg ctattatagc cgagcacttc 7200

cagcctgggg attgtgttct ggaaactgac atcgcgtcgt ttgataaaag tgaggacgac 7260

gccatggctc tgaccgcgtt aatgattctg gaagacttag gtgtggacgc agagctgttg 7320

acgctgattg aggcggcttt cggcgaaatt tcatcaatac atttgcccac taaaactaaa 7380

tttaaattcg gagccatgat gaaatctgga atgttcctca cactgtttgt gaacacagtc 7440

attaacattg taatcgcaag cagagtgttg agagaacggc taaccggatc accatgtgca 7500

gcattcattg gagatgacaa tatcgtgaaa ggagtcaaat cggacaaatt aatggcagac 7560

aggtgcgcca cctggttgaa tatggaagtc aagattatag atgctgtggt gggcgagaaa 7620

gcgccttatt tctgtggagg gtttattttg tgtgactccg tgaccggcac agcgtgccgt 7680

gtggcagacc ccctaaaaag gctgtttaag cttggcaaac ctctggcagc agacgatgaa 7740

catgatgatg acaggagaag ggcattgcat gaagagtcaa cacgctggaa ccgagtgggt 7800

attctttcag agctgtgcaa ggcagtagaa tcaaggtatg aaaccgtagg aacttccatc 7860

atagttatgg ccatgactac tctagctagc agtgttaaat cattcagcta cctgagaggg 7920

gcccctataa ctctctacgg ctaacctgaa tggactacga catagtctag tccgccaaga 7980

tatcggcgcg ccgtttaaac ggccggcctt aattaagtaa cgatacagca gcaattggca 8040

agctgcttac atagaactcg cggcgattgg catgccgctt taaaattttt attttatttt 8100

tcttttcttt tccgaatcgg attttgtttt taatatttca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 8160

aaaaaaaaaa aaaaaaaacc cctctctaaa cggaggggtt tttttcagcg taactggact 8220

ggccacagtt aggcggccgc gcatgttcat catcagtaac ccgtatcgtg agcatcctct 8280

ctcgtttcat cggtatcatt acctccatga acagaaatcc cccttacacg gaggcatcag 8340

tgaccaaaca ggaaaaaacc gcccttaaca tggcccgctt tatcagaagc cagacattaa 8400

cgcttctgga gaaactcaac gagctggacg cggatgaaca ggcagacatc tgtgaatcgc 8460

ttcacgacca cgctgatgag ctttaccgca gctgcctcgc gcgtttcggt gatgacggtg 8520

aaaacctctg acacatgcag ctcccggaga cggtcacagc ttgtctgtaa gcggatgccg 8580

ggagcagaca agcccgtcag ggcgcgtcag cgggtgttgg cgggtgtcgg ggcgcagcca 8640

tgacccagtc acgtagcgat agcggagtgt atactggctt aactatgcgg catcagagca 8700

gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa 8760

ataccgcatc aggcgctcgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg 8820

cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat 8880

aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc 8940

gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc 9000

tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga 9060

agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt 9120

ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg 9180

taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc 9240

gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg 9300

gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc 9360

ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaaggacag tatttggtat ctgcgctctg 9420

ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc 9480

gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct 9540

caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt 9600

taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa 9660

aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttattag 9720

aaaaattcat ccagcagacg ataaaacgca atacgctggc tatccggtgc cgcaatgcca 9780

tacagcacca gaaaacgatc cgcccattcg ccgcccagtt cttccgcaat atcacgggtg 9840

gccagcgcaa tatcctgata acgatccgcc acgcccagac ggccgcaatc aataaagccg 9900

ctaaaacggc cattttccac cataatgttc ggcaggcacg catcaccatg ggtcaccacc 9960

agatcttcgc catccggcat gctcgctttc agacgcgcaa acagctctgc cggtgccagg 10020

ccctgatgtt cttcatccag atcatcctga tccaccaggc ccgcttccat acgggtacgc 10080

gcacgttcaa tacgatgttt cgcctgatga tcaaacggac aggtcgccgg gtccagggta 10140

tgcagacgac gcatggcatc cgccataatg ctcacttttt ctgccggcgc cagatggcta 10200

gacagcagat cctgacccgg cacttcgccc agcagcagcc aatcacggcc cgcttcggtc 10260

accacatcca gcaccgccgc acacggaaca ccggtggtgg ccagccagct cagacgcgcc 10320

gcttcatcct gcagctcgtt cagcgcaccg ctcagatcgg ttttcacaaa cagcaccgga 10380

cgaccctgcg cgctcagacg aaacaccgcc gcatcagagc agccaatggt ctgctgcgcc 10440

caatcatagc caaacagacg ttccacccac gctgccgggc tacccgcatg caggccatcc 10500

tgttcaatca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc 10560

atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac aaataggggt tccgcgcaca 10620

tttccccgaa aagtgccacc tgacgtctaa gaaaccatta ttatcatgac attaagcatc 10680

cgcctttcgt tttatttgac catgttggta tg 10712

<210> 34
<211> 29
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 34
aacccctctc taaacggagg ggttttttt 29

<210> 35
<211> 105
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 35
cgcggaaccc ctatttgttt atttttctaa atacattcaa atatgtatcc gctcatgaga 60

caataaccct gataaatgct tcaataatat tgaaaaagga agagt 105

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 36
ctctctacgg ctaacctgaa tgga 24

<210> 37
<211> 18
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 37
taatacgact cactatag 18

<210> 38
<211> 39
<212> RNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 38
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaa 39

<210> 39
<211> 195
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 39
taggagaaag ttcacgttga catcgaggaa gacagcccat tcctcagagc tttgcagcgg 60

agcttcccgc agtttgaggt agaagccaag caggtcactg ataatgacca tgctaatgcc 120

agagcgtttt cgcatctggc ttcaaaactg atcgaaacgg aggtggaccc atccgacacg 180

atccttgaca ttgga 195

<210> 40
<211> 142
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 40
atagtcagca tagtacattt catctgacta atactacaac accaccacca tgaatagagg 60

attctttaac atgctcggcc gccgcccctt cccggccccc actgccatgt ggaggccgcg 120

gagaaggagg caggcggccc cg 142

<210> 41
<211> 66
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 41
ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60

ggacct 66

<210> 42
<211> 141
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 42
cgcagccatg acccagtcac gtagcgatag cggagtgtat actggcttaa ctatgcggca 60

tcagagcaga ttgtactgag agtgcaccat atgcggtgtg aaataccgca cagatgcgta 120

aggagaaaat accgcatcag g 141

<210> 43

<211> 5796
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 43
atgaatagag gattctttaa catgctcggc cgccgcccct tcccggcccc cactgccatg 60

tggaggccgc ggagaaggag gcaggcggcc ccgggaagcg gagctactaa cttcagcctg 120

ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggacctg agaaagttca cgttgacatc 180

gaggaagaca gcccattcct cagagctttg cagcggagct tcccgcagtt tgaggtagaa 240

gccaagcagg tcactgataa tgaccatgct aatgccagag cgttttcgca tctggcttca 300

aaactgatcg aaacggaggt ggacccatcc gacacgatcc ttgacattgg aagtgcgccc 360

gcccgcagaa tgtattctaa gcacaagtat cattgtatct gtccgatgag atgtgcggaa 420

gatccggaca gattgtataa gtatgcaact aagctgaaga aaaactgtaa ggaaataact 480

gataaggaat tggacaagaa aatgaaggag ctcgccgccg tcatgagcga ccctgacctg 540

gaaactgaga ctatgtgcct ccacgacgac gagtcgtgtc gctacgaagg gcaagtcgct 600

gtttaccagg atgtatacgc ggttgacgga ccgacaagtc tctatcacca agccaataag 660

ggagttagag tcgcctactg gataggcttt gacaccaccc cttttatgtt taagaacttg 720

gctggagcat atccatcata ctctaccaac tgggccgacg aaaccgtgtt aacggctcgt 780

aacataggcc tatgcagctc tgacgttatg gagcggtcac gtagagggat gtccattctt 840

agaaagaagt atttgaaacc atccaacaat gttctattct ctgttggctc gaccatctac 900

cacgagaaga gggacttact gaggagctgg cacctgccgt ctgtatttca cttacgtggc 960

aagcaaaatt acacatgtcg gtgtgagact atagttagtt gcgacgggta cgtcgttaaa 1020

agaatagcta tcagtccagg cctgtatggg aagccttcag gctatgctgc tacgatgcac 1080

cgcgagggat tcttgtgctg caaagtgaca gacacattga acggggagag ggtctctttt 1140

cccgtgtgca cgtatgtgcc agctacattg tgtgaccaaa tgactggcat actggcaaca 1200

gatgtcagtg cggacgacgc gcaaaaactg ctggttgggc tcaaccagcg tatagtcgtc 1260

aacggtcgca cccagagaaa caccaatacc atgaaaaatt acctttgcc cgtagtggcc 1320

caggcatttg ctaggtgggc aaaggaatat aaggaagatc aagaagatga aaggccacta 1380

ggactacgag atagacagtt agtcatgggg tgttgttggg cttttagaag gcacaagata 1440

acatctattt ataagcgccc ggatacccaa accatcatca aagtgaacag cgatttccac 1500

tcattcgtgc tgcccaggat aggcagtaac acattggaga tcgggctgag aacaagaatc 1560

aggaaaatgt tagaggagca caaggagccg tcacctctca ttaccgccga ggacgtacaa 1620

gaagctaagt gcgcagccga tgaggctaag gaggtgcgtg aagccgagga gttgcgcgca 1680

gctctaccac ctttggcagc tgatgttgag gagcccactc tggaagccga tgtcgacttg 1740

atgttacaag aggctggggc cggctcagtg gagacacctc gtggcttgat aaaggttacc 1800

agctacgatg gcgaggacaa gatcggctct tacgctgtgc tttctccgca ggctgtactc 1860

aagagtgaaa aattatcttg catccaccct ctcgctgaac aagtcatagt gataacacac 1920

tctggccgaa aagggcgtta tgccgtggaa ccataccatg gtaaagtagt ggtgccagag 1980

ggacatgcaa tacccgtcca ggactttcaa gctctgagtg aaagtgccac cattgtgtac 2040

aacgaacgtg agttcgtaaa caggtacctg caccatattg ccacacatgg aggagcgctg 2100

aacactgatg aagaatatta caaaactgtc aagcccagcg agcacgacgg cgaatacctg 2160

tacgacatcg acaggaaaca gtgcgtcaag aaagaactag tcactgggct agggctcaca 2220

ggcgagctgg tggatcctcc cttccatgaa ttcgcctacg agagtctgag aacacgacca 2280

gccgctcctt accaagtacc aaccataggg gtgtatggcg tgccaggatc aggcaagtct 2340

ggcatcatta aaagcgcagt caccaaaaaa gatctagtgg tgagcgccaa gaaagaaaac 2400

tgtgcagaaa ttataaggga cgtcaagaaa atgaaagggc tggacgtcaa tgccagaact 2460

gtggactcag tgctcttgaa tggatgcaaa caccccgtag agaccctgta tattgacgaa 2520

gcttttgctt gtcatgcagg tactctcaga gcgctcatag ccattataag acctaaaaag 2580

gcagtgctct gcggggatcc caaacagtgc ggtttttta acatgatgtg cctgaaagtg 2640

cattttaacc acgagatttg cacacaagtc ttccacaaaa gcatctctcg ccgttgcact 2700

aaatctgtga cttcggtcgt ctcaaccttg ttttacgaca aaaaaatgag aacgacgaat 2760

ccgaaagaga ctaagattgt gattgacact accggcagta ccaaacctaa gcaggacgat 2820

ctcattctca cttgtttcag agggtgggtg aagcagttgc aaatagatta caaaggcaac 2880

gaaataatga cggcagctgc ctctcaaggg ctgacccgta aaggtgtgta tgccgttcgg 2940

tacaaggtga atgaaaatcc tctgtacgca cccacctctg aacatgtgaa cgtcctactg 3000

acccgcacgg aggaccgcat cgtgtggaaa acactagccg gcgacccatg gataaaaaca 3060

ctgactgcca agtaccctgg gaatttcact gccacgatag aggagtggca agcagagcat 3120

gatgccatca tgaggcacat cttggagaga ccggacccta ccgacgtctt ccagaataag 3180

gcaaacgtgt gttgggccaa ggctttagtg ccggtgctga agaccgctgg catagacatg 3240

accactgaac aatggaacac tgtggattat tttgaaacgg acaaagctca ctcagcagag 3300

atagtattga accaactatg cgtgaggttc tttggactcg atctggactc cggtctattt 3360

tctgcaccca ctgttccgtt atccattagg aataatcact gggataactc cccgtcgcct 3420

aacatgtacg ggctgaataa agaagtggtc cgtcagctct ctcgcaggta cccacaactg 3480

cctcgggcag ttgccactgg aagagtctat gacatgaaca ctggtacact gcgcaattat 3540

gatccgcgca taaacctagt acctgtaaac agaagactgc ctcatgcttt agtcctccac 3600

cataatgaac acccacagag tgacttttct tcattcgtca gcaaattgaa gggcagaact 3660

gtcctggtgg tcggggaaaa gttgtccgtc ccaggcaaaa tggttgactg gttgtcagac 3720

cggcctgagg ctaccttcag agctcggctg gatttaggca tcccaggtga tgtgcccaaa 3780

tatgacataa tatttgttaa tgtgaggacc ccatataaat accatcacta tcagcagtgt 3840

gaagaccatg ccattaagct tagcatgttg accaagaaag cttgtctgca tctgaatccc 3900

ggcggaacct gtgtcagcat aggttatggt tacgctgaca gggccagcga aagcatcatt 3960

ggtgctatag cgcggcagtt caagttttcc cgggtatgca aaccgaaatc ctcacttgaa 4020

gagacggaag ttctgtttgt attcattggg tacgatcgca aggcccgtac gcacaatcct 4080

tacaagcttt catcaacctt gaccaacatt tatacaggtt ccagactcca cgaagccgga 4140

tgtgcaccct catatcatgt ggtgcgaggg gatattgcca cggccaccga aggagtgatt 4200

ataaatgctg ctaacagcaa aggacaacct ggcggagggg tgtgcggagc gctgtataag 4260

aaattcccgg aaagcttcga tttacagccg atcgaagtag gaaaagcgcg actggtcaaa 4320

ggtgcagcta aacatatcat tcatgccgta ggaccaaact tcaacaaagt ttcggaggtt 4380

gaaggtgaca aacagttggc agaggcttat gagtccatcg ctaagattgt caacgataac 4440

aattacaagt cagtagcgat tccactgttg tccaccggca tcttttccgg gaacaaagat 4500

cgactaaccc aatcattgaa ccatttgctg acagctttag acaccactga tgcagatgta 4560

gccatatact gcagggacaa gaaatgggaa atgactctca aggaagcagt ggctaggaga 4620

gaagcagtgg aggagatatg catatccgac gactcttcag tgacagaacc tgatgcagag 4680

ctggtgaggg tgcatccgaa gagttctttg gctggaagga agggctacag cacaagcgat 4740

ggcaaaactt tctcatattt ggaagggacc aagtttcacc aggcggccaa ggatatagca 4800

gaaattaatg ccatgtggcc cgttgcaacg gaggccaatg agcaggtatg catgtatatc 4860

ctcggagaaa gcatgagcag tattaggtcg aaatgccccg tcgaagagtc ggaagcctcc 4920

acaccaccta gcacgctgcc ttgcttgtgc atccatgcca tgactccaga aagagtacag 4980

cgcctaaaag cctcacgtcc agaacaaatt actgtgtgct catcctttcc attgccgaag 5040

tatagaatca ctggtgtgca gaagatccaa tgctcccagc ctatattgtt ctcaccgaaa 5100

gtgcctgcgt atattcatcc aaggaagtat ctcgtggaaa caccaccggt agacgagact 5160

ccggagccat cggcagagaa ccaatccaca gaggggacac ctgaacaacc accacttata 5220

accgaggatg agaccaggac tagaacgcct gagccgatca tcatcgaaga ggaagaagag 5280

gatagcataa gtttgctgtc agatggcccg acccaccagg tgctgcaagt cgaggcagac 5340

attcacgggc cgccctctgt atctagctca tcctggtcca ttcctcatgc atccgacttt 5400

gatgtggaca gtttatccat acttgacacc ctggagggag ctagcgtgac cagcggggca 5460

acgtcagccg agactaactc ttacttcgca aagagtatgg agtttctggc gcgaccggtg 5520

cctgcgcctc gaacagtatt caggaaccct ccacatcccg ctccgcgcac aagaacaccg 5580

tcacttgcac ccagcagggc ctgctcgaga accagcctag tttccacccc gccaggcgtg 5640

aatagggtga tcactagaga ggagctcgag gcgcttaccc cgtcacgcac tcctagcagg 5700

tcggtctcga gaaccagcct ggtctccaac ccgccaggcg taaatagggt gattacaaga 5760

gaggagtttg aggcgttcgt agcacaacaa caatga 5796

<210> 44
<211> 2382
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 44
ggctcagtgg agacacctcg tggcttgata aaggttacca gctacgatgg cgaggacaag 60

atcggctctt acgctgtgct ttctccgcag gctgtactca agagtgaaaa attatcttgc 120

atccaccctc tcgctgaaca agtcatagtg ataacacact ctggccgaaa agggcgttat 180

gccgtggaac cataccatgg taaagtagtg gtgccagagg gacatgcaat acccgtccag 240

gactttcaag ctctgagtga aagtgccacc attgtgtaca acgaacgtga gttcgtaaac 300

aggtacctgc accatattgc cacacatgga ggagcgctga acactgatga agaatattac 360

aaaactgtca agcccagcga gcacgacggc gaatacctgt acgacatcga caggaaacag 420

tgcgtcaaga aagaactagt cactgggcta gggctcacag gcgagctggt ggatcctccc 480

ttccatgaat tcgcctacga gagtctgaga acacgaccag ccgctcctta ccaagtacca 540

accatagggg tgtatggcgt gccaggatca ggcaagtctg gcatcattaa aagcgcagtc 600

accaaaaaag atctagtggt gagcgccaag aaagaaaact gtgcagaaat tataagggac 660

gtcaagaaaa tgaaagggct ggacgtcaat gccagaactg tggactcagt gctcttgaat 720

ggatgcaaac accccgtaga gaccctgtat attgacgaag cttttgcttg tcatgcaggt 780

actctcagag cgctcatagc cattataaga cctaaaaagg cagtgctctg cggggatccc 840

aaacagtgcg gttttttaa catgatgtgc ctgaaagtgc attttaacca cgagatttgc 900

acacaagtct tccacaaaag catctctcgc cgttgcacta aatctgtgac ttcggtcgtc 960

tcaaccttgt tttacgacaa aaaaatgaga acgacgaatc cgaaagagac taagattgtg 1020

attgacacta ccggcagtac caaacctaag caggacgatc tcattctcac ttgtttcaga 1080

gggtgggtga agcagttgca aatagattac aaaggcaacg aaataatgac ggcagctgcc 1140

tctcaagggc tgacccgtaa aggtgtgtat gccgttcggt acaaggtgaa tgaaaatcct 1200

ctgtacgcac ccacctctga acatgtgaac gtcctactga cccgcacgga ggaccgcatc 1260

gtgtggaaaa cactagccgg cgacccatgg ataaaaacac tgactgccaa gtaccctggg 1320

aatttcactg ccacgataga ggagtggcaa gcagagcatg atgccatcat gaggcacatc 1380

ttggagagac cggaccctac cgacgtcttc cagaataagg caaacgtgtg ttgggccaag 1440

gctttagtgc cggtgctgaa gaccgctggc atagacatga ccactgaaca atggaacact 1500

gtggattatt ttgaaacgga caaagctcac tcagcagaga tagtattgaa ccaactatgc 1560

gtgaggttct ttggactcga tctggactcc ggtctatttt ctgcacccac tgttccgtta 1620

tccattagga ataatcactg ggataactcc ccgtcgccta acatgtacgg gctgaataaa 1680

gaagtggtcc gtcagctctc tcgcaggtac ccacaactgc ctcgggcagt tgccactgga 1740

agagtctatg acatgaacac tggtacactg cgcaattatg atccgcgcat aaacctagta 1800

cctgtaaaca gaagactgcc tcatgcttta gtcctccacc ataatgaaca cccacagagt 1860

gacttttctt cattcgtcag caaattgaag ggcagaactg tcctggtggt cggggaaaag 1920

ttgtccgtcc caggcaaaat ggttgactgg ttgtcagacc ggcctgaggc taccttcaga 1980

gctcggctgg atttaggcat cccaggtgat gtgcccaaat atgacataat atttgttaat 2040

gtgaggaccc catataaata ccatcactat cagcagtgtg aagaccatgc cattaagctt 2100

agcatgttga ccaagaaagc ttgtctgcat ctgaatcccg gcggaacctg tgtcagcata 2160

ggttatggtt acgctgacag ggccagcgaa agcatcattg gtgctatagc gcggcagttc 2220

aagttttccc gggtatgcaa accgaaatcc tcacttgaag agacggaagt tctgtttgta 2280

ttcattgggt acgatcgcaa ggcccgtacg cacaatcctt acaagctttc atcaaccttg 2340

accaacattt atacaggttc cagactccac gaagccggat gt 2382

<210> 45
<211> 1821
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 45
tacatctttt cctccgacac cggtcaaggg catttacaac aaaaatcagt aaggcaaacg 60

gtgctatccg aagtggtgtt ggagaggacc gaattggaga tttcgtatgc cccgcgcctc 120

gaccaagaaa aagaagaatt actacgcaag aaattacagt taaatcccac acctgctaac 180

agaagcagat accagtccag gaaggtggag aacatgaaag ccataacagc tagacgtatt 240

ctgcaaggcc tagggcatta tttgaaggca gaaggaaaag tggagtgcta ccgaaccctg 300

catcctgttc ctttgtattc atctagtgtg aaccgtgcct tttcaagccc caaggtcgca 360

gtggaagcct gtaacgccat gttgaaagag aactttccga ctgtggcttc ttactgtatt 420

attccagagt acgatgccta tttggacatg gttgacggag cttcatgctg cttagacact 480

gccagttttt gccctgcaaa gctgcgcagc tttccaaaga aacactccta tttggaaccc 540

acaatacgat cggcagtgcc ttcagcgatc cagaacacgc tccagaacgt cctggcagct 600

gccacaaaaa gaaattgcaa tgtcacgcaa atgagagaat tgcccgtatt ggattcggcg 660

gcctttaatg tggaatgctt caagaaatat gcgtgtaata atgaatattg ggaaacgttt 720

aaagaaaacc ccatcaggct tactgaagaa aacgtggtaa attacattac caaattaaaa 780

ggaccaaaag ctgctgctct ttttgcgaag acacataatt tgaatatgtt gcaggacata 840

ccaatggaca ggtttgtaat ggacttaaag agagacgtga aagtgactcc aggaacaaaa 900

catactgaag aacggcccaa ggtacaggtg atccaggctg ccgatccgct agcaacagcg 960

tatctgtgcg gaatccaccg agagctggtt aggagattaa atgcggtcct gcttccgaac 1020

attcatacac tgtttgatat gtcggctgaa gactttgacg ctattatagc cgagcacttc 1080

cagcctgggg attgtgttct ggaaactgac atcgcgtcgt ttgataaaag tgaggacgac 1140

gccatggctc tgaccgcgtt aatgattctg gaagacttag gtgtggacgc agagctgttg 1200

acgctgattg aggcggcttt cggcgaaatt tcatcaatac atttgcccac taaaactaaa 1260

tttaaattcg gagccatgat gaaatctgga atgttcctca cactgtttgt gaacacagtc 1320

attaacattg taatcgcaag cagagtgttg agagaacggc taaccggatc accatgtgca 1380

gcattcattg gagatgacaa tatcgtgaaa ggagtcaaat cggacaaatt aatggcagac 1440

aggtgcgcca cctggttgaa tatggaagtc aagattatag atgctgtggt gggcgagaaa 1500

gcgccttatt tctgtggagg gtttattttg tgtgactccg tgaccggcac agcgtgccgt 1560

gtggcagacc ccctaaaaag gctgtttaag cttggcaaac ctctggcagc agacgatgaa 1620

catgatgatg acaggagaag ggcattgcat gaagagtcaa cacgctggaa ccgagtgggt 1680

attctttcag agctgtgcaa ggcagtagaa tcaaggtatg aaaccgtagg aacttccatc 1740

atagttatgg ccatgactac tctagctagc agtgttaaat cattcagcta cctgagaggg 1800

gcccctataa ctctctacgg c 1821

<210> 46
<211> 1671
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 46

gcaccctcat atcatgtggt gcgaggggat attgccacgg ccaccgaagg agtgattata 60

aatgctgcta acagcaaagg acaacctggc ggaggggtgt gcggagcgct gtataagaaa 120

ttcccggaaa gcttcgattt acagccgatc gaagtaggaa aagcgcgact ggtcaaaggt 180

gcagctaaac atatcattca tgccgtagga ccaaacttca acaaagtttc ggaggttgaa 240

ggtgacaaac agttggcaga ggcttatgag tccatcgcta agattgtcaa cgataacaat 300

tacaagtcag tagcgattcc actgttgtcc accggcatct tttccgggaa caaagatcga 360

ctaacccaat cattgaacca tttgctgaca gctttagaca ccactgatgc agatgtagcc 420

atatactgca gggacaagaa atgggaaatg actctcaagg aagcagtggc taggagagaa 480

gcagtggagg agatatgcat atccgacgac tcttcagtga cagaacctga tgcagagctg 540

gtgagggtgc atccgaagag ttctttggct ggaaggaagg gctacagcac aagcgatggc 600

aaaactttct catatttgga agggaccaag tttcaccagg cggccaagga tatagcagaa 660

attaatgcca tgtggcccgt tgcaacggag gccaatgagc aggtatgcat gtatatcctc 720

ggagaaagca tgagcagtat taggtcgaaa tgccccgtcg aagagtcgga agcctccaca 780

ccacctagca cgctgccttg cttgtgcatc catgccatga ctccagaaag agtacagcgc 840

ctaaaagcct cacgtccaga acaaattact gtgtgctcat cctttccatt gccgaagtat 900

agaatcactg gtgtgcagaa gatccaatgc tcccagccta tattgttctc accgaaagtg 960

cctgcgtata ttcatccaag gaagtatctc gtggaaacac caccggtaga cgagactccg 1020

gagccatcgg cagagaacca atccacagag gggacacctg aacaaccacc acttataacc 1080

gaggatgaga ccaggactag aacgcctgag ccgatcatca tcgaagagga agaagaggat 1140

agcataagtt tgctgtcaga tggcccgacc caccaggtgc tgcaagtcga ggcagacatt 1200

cacgggccgc cctctgtatc tagctcatcc tggtccattc ctcatgcatc cgactttgat 1260

gtggacagtt tatccatact tgacaccctg gagggagcta gcgtgaccag cggggcaacg 1320

tcagccgaga ctaactctta cttcgcaaag agtatggagt ttctggcgcg accggtgcct 1380

gcgcctcgaa cagtattcag gaaccctcca catcccgctc cgcgcacaag aacaccgtca 1440

cttgcaccca gcagggcctg ctcgagaacc agcctagttt ccaccccgcc aggcgtgaat 1500

agggtgatca ctagagagga gctcgaggcg cttaccccgt cacgcactcc tagcaggtcg 1560

gtctcgagaa ccagcctggt ctccaacccg ccaggcgtaa atagggtgat tacaagagag 1620

gagtttgagg cgttcgtagc acaacaacaa tgacggtttg atgcgggtgc a 1671

<210> 47
<211> 1602
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 47
gagaaagttc acgttgacat cgaggaagac agcccattcc tcagagcttt gcagcggagc 60

ttcccgcagt ttgaggtaga agccaagcag gtcactgata atgaccatgc taatgccaga 120

gcgttttcgc atctggcttc aaaactgatc gaaacggagg tggacccatc cgacacgatc 180

cttgacattg gaagtgcgcc cgcccgcaga atgtattcta agcacaagta tcattgtatc 240

tgtccgatga gatgtgcgga agatccggac agattgtata agtatgcaac taagctgaag 300

aaaaactgta aggaaataac tgataaggaa ttggacaaga aaatgaagga gctcgccgcc 360

gtcatgagcg accctgacct ggaaactgag actatgtgcc tccacgacga cgagtcgtgt 420

cgctacgaag ggcaagtcgc tgtttaccag gatgtatacg cggttgacgg accgacaagt 480

ctctatcacc aagccaataa gggagttaga gtcgcctact ggataggctt tgacaccacc 540

ccttttatgt ttaagaactt ggctggagca tatccatcat actctaccaa ctgggccgac 600

gaaaccgtgt taacggctcg taacataggc ctatgcagct ctgacgttat ggagcggtca 660

cgtagaggga tgtccattct tagaaagaag tatttgaaac catccaacaa tgttctattc 720

tctgttggct cgaccatcta ccacgagaag agggacttac tgaggagctg gcacctgccg 780

tctgtatttc acttacgtgg caagcaaaat tacacatgtc ggtgtgagac tatagttagt 840

tgcgacgggt acgtcgttaa aagaatagct atcagtccag gcctgtatgg gaagccttca 900

ggctatgctg ctacgatgca ccgcgaggga ttcttgtgct gcaaagtgac agacacattg 960

aacggggaga gggtctcttt tcccgtgtgc acgtatgtgc cagctacatt gtgtgaccaa 1020

atgactggca tactggcaac agatgtcagt gcggacgacg cgcaaaaact gctggttggg 1080

ctcaaccagc gtatagtcgt caacggtcgc acccagagaa acaccaatac catgaaaaat 1140

taccttttgc ccgtagtggc ccaggcattt gctaggtggg caaaggaata taaggaagat 1200

caagaagatg aaaggccact aggactacga gatagacagt tagtcatggg gtgttgttgg 1260

gcttttagaa ggcacaagat aacatctatt tataagcgcc cggataccca aaccatcatc 1320

aaagtgaaca gcgatttcca ctcattcgtg ctgcccagga taggcagtaa cacattggag 1380

atcgggctga gaacaagaat caggaaaatg ttagaggagc acaaggagcc gtcacctctc 1440

attaccgccg aggacgtaca agaagctaag tgcgcagccg atgaggctaa ggaggtgcgt 1500

gaagccgagg agttgcgcgc agctctacca cctttggcag ctgatgttga ggagcccact 1560

ctggaagccg atgtcgactt gatgttacaa gaggctgggg cc 1602

<210> 48
<211> 798
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 48
atgattgaac aggatggcct gcatgcgggt agcccggcag cgtgggtgga acgtctgttt 60

ggctatgatt gggcgcagca gaccattggc tgctctgatg cggcggtgtt tcgtctgagc 120

gcgcagggtc gtccggtgct gtttgtgaaa accgatctga gcggtgcgct gaacgagctg 180

caggatgaag cggcgcgtct gagctggctg gccaccaccg gtgttccgtg tgcggcggtg 240

ctggatgtgg tgaccgaagc gggccgtgat tggctgctgc tgggcgaagt gccgggtcag 300

gatctgctgt ctagccatct ggcgccggca gaaaaagtga gcattatggc ggatgccatg 360

cgtcgtctgc ataccctgga cccggcgacc tgtccgtttg atcatcaggc gaaacatcgt 420

attgaacgtg cgcgtacccg tatggaagcg ggcctggtgg atcaggatga tctggatgaa 480

gaacatcagg gcctggcacc ggcagagctg tttgcgcgtc tgaaagcgag catgccggat 540

ggcgaagatc tggtggtgac ccatggtgat gcgtgcctgc cgaacattat ggtggaaaat 600

ggccgtttta gcggctttat tgattgcggc cgtctgggcg tggcggatcg ttatcaggat 660

attgcgctgg ccacccgtga tattgcggaa gaactgggcg gcgaatgggc ggatcgtttt 720

ctggtgctgt atggcattgc ggcaccggat agccagcgta ttgcgtttta tcgtctgctg 780

gatgaatttt tctaataa 798

<210> 49

<211> 192
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 49
gtgaccaaac aggaaaaaac cgcccttaac atggcccgct ttatcagaag ccagacatta 60

acgcttctgg agaaactcaa cgagctggac gcggatgaac aggcagacat ctgtgaatcg 120

cttcacgacc acgctgatga gctttaccgc agctgcctcg cgcgtttcgg tgatgacggt 180

gaaaacctct ga 192

<210> 50
<211> 44
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
sintético

<400> 50
ataggcggcg catgagagaa gcccagacca attacctacc caaa 44

<210> 51
<211> 117
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 51
atacagcagc aattggcaag ctgcttacat agaactcgcg gcgattggca tgccgcttta 60

aaatttttat tttatttttc ttttcttttc cgaatcggat tttgttttta atatttc 117

<210> 52
<211> 845
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 52
ccattgcata cgttgtatcc atatcataat atgtacattt atattggctc atgtccaaca 60

ttaccgccat gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca 120

ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct 180

ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta 240

acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac 300

ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt 360

aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag 420

tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca gtacatcaat 480

gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat 540

gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc 600

ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagagctctc 660

cctatcagtg atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgagc tcgtttagtg 720

aaccgtcaga tcgcctggag acgccatcca cgctgttttg acctccatag aagacaccgg 780

gaccgatcca gcctccgcgg ccgggaacgg tgcattggaa cgcggattcc ccgtgccaag 840

agtga 845

<210> 53
<211> 227
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido
sintético

<400> 53
ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc 60

tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 180

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatggcc 227

<210> 54
<211> 76

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 54

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 4
<212> PRT
<213> Desconocido

<220
<223> Descripción de desconocido: Péptido motivo "KDEL"

<400> 55
Lys Asp Glu Leu
1

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 56
His His Ala Ala

1

<210> 57
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 57
Arg Lys Ser Tyr Leu
1 5

<210> 58
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 58
Arg Lys Ser Tyr
1

<210> 59
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 59
Arg Glu Lys Arg
1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2022/0008493
Recibo: 25-204143
Fecha: 20/11/2025

CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO
CC: 66.783.790
Pago PSE No: 1189422
CUS: 1942026191

Patente PCT
VACUNAS BASADAS EN CALR Y JAK2 MUTANTES Y SUS USOS

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	$ 225,000	$ 225,000
		TOTAL			$ 225,000

Sede Centro: Carrera 13 No.27-00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá D.C. - Colombia
Web: www.sic.gov.co e-mail:contactenos@sic.gov.co Conmutador:(571)5870000 Contact Center: (571)5920400