

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 748**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/39** (2006.01)

**A61K 39/008** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2016 PCT/EP2016/061621**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16188973**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2016 E 16725105 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3297666**

54 Título: **Adyuvante molecular y vacuna**

30 Prioridad:

**22.05.2015 EP 15382273**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**11.03.2020**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)  
C/ Serrano 117  
28006 Madrid, ES y  
CZ VETERINARIA, S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ALCOLEA ALCOLEA, PEDRO JOSÉ;  
ALONSO AYALA, ANA MARÍA y  
LARRAGA RODRÍGUEZ DE VERA, VICENTE  
EMILIO**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

ES 2 747 748 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Adyuvante molecular y vacuna

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a los campos de las vacunas y los adyuvantes de vacunas, y se refiere generalmente a adyuvantes de polinucleótido, vacunas de polinucleótido y composiciones de vacuna. Más específicamente, la invención se refiere a dichos polinucleótidos y composiciones de vacuna para su uso en inducir o potenciar una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica en un sujeto mamífero. Además, se refiere a dichos polinucleótidos y composiciones de vacuna para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa, tal como en el tratamiento profiláctico o terapéutico de leishmaniosis.

15 **Antecedentes de la invención**

La leishmaniosis es un grupo de enfermedades producidas por protozoos parásitos del género *Leishmania* que pertenecen a la familia de los tripanosomátidos (Killick-Kendrick, R., Med Vet Entomol 1990, 4(1): 1-24). Se transmite por la picadura de moscas de la arena hematófagas, agrupadas en la subfamilia Phlebotominae, de la que se conocen 30 especies que pueden transmitir la enfermedad. Hay básicamente tres presentaciones clínicas dependiendo de las especies implicadas y la respuesta inmunitaria del huésped, cutánea, mucocutánea y visceral. La última se produce por *L. infantum* y es mortal sin tratamiento. Es una enfermedad endémica que afecta a 15 millones de personas, con 2 millones de nuevos casos al año en 88 países en áreas tropicales y templadas (90 % de ellos en países en desarrollo), Desjeux, P., Clin Dermatol 1996, 14(5): 417-423.

Debido a su elevada prevalencia en los últimos años, ha sido declarada como enfermedad emergente por la Organización Mundial de la Salud y se ha descrito como un parásito oportunista en personas inmunodeprimidas, principalmente en pacientes con SIDA (Pasquau, F., et al. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2005, 24(6): 411-418). Es una enfermedad que es endémica en la cuenca del mediterráneo y en España la leishmaniosis visceral se considera un problema de salud pública, siendo el perro el reservorio de la enfermedad; hay aproximadamente 7 millones de animales registrados en el país, y las tasas de infestación en este huésped varían entre el 10 y el 25 por ciento, con áreas de incidencia mayores de hasta el 34 % (Amela, C., et al., Eur J Epidemiol 1995, 11(2): 157-161).

Debido a la limitada eficacia de los tratamientos actualmente usados contra la enfermedad, la toxicidad de los fármacos y la emergencia de resistencia, además de la aparición de reaparición, es necesario el desarrollo de una vacuna eficaz contra la leishmaniosis. En particular, el desarrollo de una vacuna eficaz contra la leishmaniosis canina no solo controlará la progresión de la enfermedad, sino que la disminución en la carga de parásitos interrumpirá el ciclo de transmisión entre vector y seres humanos.

Desde un punto de vista comercial, actualmente solo hay tres vacunas en el mercado contra la leishmaniosis canina: dos de ellas vendidas exclusivamente en Brasil: Leishmune® (Fort Dodge/Pfizer), la vacuna inactivada y de subunidad (fracción de glicoproteína purificada, ligando de manosa-fucosa) de *Leishmania donovani* (Nogueira, F. S., et al., Vaccine 2005, 23(40): 4805-10) y la vacuna de subunidad de proteína LeishTec® (Hertape Calier Saúde Animal S.A) (proteína recombinante A2-HIS) contra la leishmaniosis visceral. En Europa, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) ha autorizado recientemente la vacuna Cani Leish® (Laboratoires Bio Vétro Test, Groupe Virbac), vacuna inactivada de subunidad de proteína (antígeno purificado obtenido de promastigotes de *L. infantum*) contra la leishmaniosis visceral, cuya comercialización se inició en 2012 (Moreno, J., et al., PLoS Negl Trop Dis 2012, 6(6): e1683). Los resultados de eficacia con estas vacunas son, sin embargo, limitados. Véase, por ejemplo, el informe preparado por la EMA sobre la discusión científica para la autorización de CaniLeish® en la que se indica que ha mostrado protección muy limitada de perros vacunados (es decir, la protección es inferior al 20 % según la disminución en la carga de parásitos que induce en animales vacunados). Ninguna de estas vacunas es una vacuna de ADN.

Se ha desvelado el uso de la vacuna de ADN pCI-neo-LACK en perros contra la leishmaniosis visceral por Ramiro et al. (Vaccine 2003, 21(19-20): 2474-84); y Ramos, I., et al. (Vaccine 2008, 26(3): 333-44). Dicha vacuna se produjo clonando la secuencia que codifica el antígeno de la proteína cinasa C activada (LACK) de *Leishmania infantum*. Pinto E. F. et al. (Infection and immunity 2004, 72(8), 4521-4527) divulgan la vacunación intranasal de ratones con pCI-neo-LACK, que notifica que el ADN de LACK pero el ADN vacío no promovió la inmunidad protectora. Más recientemente, también se describió la proteína LACK que expresa ADN de plásmido libre de resistencia a antibióticos (el plásmido pORT-LACK construido a partir de pCI-neo-LACK eliminando genes de resistencia a ampicilina y neomicina e introduciendo una secuencia de operador lac como marcador de selección) y su uso contra infección por *Leishmania infantum* en una vacunación con pORT-LACK/MVA-LACK de sensibilización-refuerzo heterólogo (Ramos, I., et al., Vaccine 2009, 27(48): 6695-6703).

La vacunación con vacunas de ADN-LACK ha mostrado previamente ser eficaz contra *L. major* en el modelo murino (Gurunathan, S., et al., The Journal of experimental medicine, 1997, 186(7): 1137-47; Gurunathan, S. et al., Nat Med 1998, 4(12): 1409-15 y Stobie, L. et. al., Proc Natl Acad Sci 2000, 97(15): 8427-32).

Hay varias ventajas de la vacunación con ADN con respecto a las técnicas de vacunación tradicionales. Primera, se predice que debido a que las proteínas que están codificadas por la secuencia de ADN se sintetizan en el huésped, la estructura o conformación de la proteína será similar a la proteína nativa asociada al estado de enfermedad.

5 También es probable que la vacunación con ADN ofrezca protección contra diferentes cepas de un virus, generando respuesta de linfocitos T citotóxicos que reconocen epítopos de proteínas conservadas. Además, debido a que los plásmidos se recogen por las células huésped donde puede producirse proteína antigénica, se provocará una respuesta inmunitaria de larga duración. La tecnología también ofrece la posibilidad de combinar diversos inmunógenos en una única preparación para facilitar la inmunización simultánea en relación con varios estados de enfermedad (véase también Box 1 Saade *et al.*, Expert Rev Vaccines 2012, 11(2):189-209).

15 Sin embargo, hay una necesidad de mejorar la inmunogenicidad de vacunas de ADN, especialmente en seres humanos, cuando se compara con vacunas basadas en proteínas tradicionales. Se han intentado muchas estrategias para mejorar la potencia de la vacuna de ADN que incluyen el uso de promotores más eficaces y la optimización de codones, adición de adyuvantes tradicionales o genéticos, electroporación, administración intradérmica y diversas estrategias de sensibilización-refuerzo, véase Saade *et al.*, Expert Rev Vaccines 2012, 11(2):189-209.

20 Un enfoque es el uso de adyuvantes tradicionales que actúan de estimulantes inmunitarios, como los sistemas de administración de antígeno, o ambos. Enfoques de adyuvantes tradicionales usando, por ejemplo, alumbre o lipopolisacárido (LPS) se han sustituido principalmente en vacunas de ADN por el uso de adyuvantes moleculares codificados por plásmido.

25 A pesar de las muchas estrategias que han intentado mejorar la potencia de vacunas de ADN, hay una necesidad continua de estrategias para potenciar adicionalmente la inmunogenicidad de vacunas de ADN.

30 El gen *fabI* codifica la proteína transportadora de enoil-acilo (ACP) reductasa, una enzima que es esencial para la síntesis de ácidos grasos bacterianos y sensible a triclosan que se notificó previamente como un marcador de selección para clonación molecular (véase, por ejemplo, Goh *et al.* 2008, BMC Biotechnology, 8:61). El-attar Laila MR *et al.* (Vaccine 2011, 30(9) 1702-1709) divulgan el uso de *FabI* de *E. coli* como marcador de selección no antibiótico en una vacuna de ADN contra un pestivirus.

### Sumario de la invención

35 Los autores de la invención han descubierto ahora que el gen *FabI* (SEC ID N°: 3), o un fragmento antigénico del mismo (por ejemplo, SEC ID N°: 1), refuerza la inmunogenicidad de vacunas de ADN cuando se co-administra como un adyuvante molecular con un antígeno de interés. Más específicamente, se ha mostrado por los inventores que la co-administración de SEC ID N°: 3 (que comprende SEC ID N°: 1) con el gen *LACK* (SEC ID N°: 5), en particular en un plásmido de ADN tal como pPAL-LACK (SEC ID N°: 23), obtiene niveles similares de inmunogenicidad en una pauta de administración de sensibilización-refuerzo homóloga cuando se compara con la pauta de sensibilización-refuerzo heteróloga que consiste en pCIneo-LACK y MVA-LACK. Una pauta de inmunización heteróloga es una estrategia muy conocida para aumentar la inmunogenicidad y se habría esperado que proporcionara mayor inmunogenicidad que la inmunización homóloga (véase, Ramiro, M. J., *et al.*, Vaccine 2003, 21(19-20): 2474-84 y McConkey *et al.*, Nat Med. 2003, 9(6):729-35).

45 Además, la vacunación homóloga elimina la necesidad de usar un virus y, por tanto, simplifica el almacenamiento, transporte y condiciones de manipulación de las vacunas, con la consecuente reducción de costes para los sistemas sanitarios, ya que los errores de almacenamiento y manipulación pueden costar miles de dólares en vacuna desechada y revacunación.

50 Además, al comparar la eficacia de la vacuna de pPAL-LACK con la vacuna comercial CaniLeish® (grupos E y F del ejemplo 5, respectivamente), se ha demostrado que la carga de parásitos es menor en los perros vacunados con pPAL-LACK no solo con respecto al grupo de control infectado, no vacunado (A) sino también con respecto a CaniLeish®, lo que respalda una mayor protección contra Leishmania.

55 Así, según los hallazgos particulares de la presente invención, se proporciona:

Un primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 60 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2,

65 para su uso como un adyuvante de vacuna.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 5 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2; y
- 10 c. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos;

para su uso como un medicamento.

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 15 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- 20 b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2; y
- c. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos de uno o más agentes infecciosos;

25 para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 30 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2.;
- y
- 35 c. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o
- d. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6.

40 Un quinto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 45 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2;
- y
- 50 c. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o
- 55 d. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6,

para su uso como un medicamento.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 60 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- 65 b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2.;

y

c. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o

d. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6,

para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en el primer aspecto de la invención, que comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica uno o más antígenos, y un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en el segundo aspecto y posteriores de la invención y que comprende además un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo o fragmento del mismo, obtenido u obtenible después de la inmunización de un mamífero con el polinucleótido como se define en el segundo aspecto y posteriores de la invención, y la composición farmacéutica según el séptimo o octavo aspectos de la invención, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es adecuado para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un sujeto mamífero.

#### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática del plásmido pCI-neo-LACK.

Figura 2. Representación esquemática del plásmido pPAL-LACK (SEC ID N°: 23).

Figura 3. Representación esquemática del plásmido pPAL (SEC ID N°: 24).

Figura 4. A) Visualización de la construcción pPAL-LACK en 1 % de gel de agarosa; MW 1 Kb 125 ng. pPAL-LACK 1 (318 ng/ml) carriles 1 y 2 (dilución 1/6); carriles 3 y 4 (dilución 1/12) y carriles 5 y 6 (dilución 1/24). B) Expresión del gen de la proteína LACK clonado en el vector pCIneo en cultivos de células HEK 293T transfectadas durante 48 horas. Las células sin transfectar se usaron como control negativo (SIMULADO).

Figura 5. Representación gráfica que muestra la evolución de la sintomatología después de la infección en los grupos experimentales I a IV, usando el sistema de "evaluación numérica de síntomas" (NES).

Figura 6. Evaluación categórica de la carga de parásitos (CAP) en médula ósea por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Las flechas muestran la reducción de la carga de parásitos en el grupo I en comparación con IV.

Figura 7. Relación entre la sintomatología y la carga de parásitos entre los grupos I y IV.

Figura 8. Evaluación de los niveles de IgG total en suero por ELISA.

Figura 9. Evaluación de los niveles de IgG1 en suero por ELISA.

Figura 10. Evaluación de los niveles de IgG2 en suero por ELISA.

Figura 11. Evaluación de la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> contra el antígeno de Leishmania total (CLA) por la prueba de transformación linfoblástica.

Figura 12. Evaluación de la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> contra el antígeno LACK por la prueba de transformación linfoblástica.

Figura 13. Evaluación de la producción de IFN gamma contra el antígeno de Leishmania total (CLA) en sobrenadantes de ensayo de linfoproliferación por ELISA.

Figura 14. Evaluación de la producción de IL10 contra el antígeno de Leishmania total (CLA) en sobrenadantes del ensayo de linfoproliferación por ELISA.

Figura 15. Evaluación de la producción de IFN gamma contra LACK en sobrenadantes del ensayo de linfoproliferación por ELISA.

Figura 16. Evaluación de la producción de IL10 contra LACK en sobrenadantes del ensayo de linfoproliferación por

ELISA.

Figura 17. Resultados del análisis de la predicción de islas CpG dentro de SEC ID N°: 21

5 Figura 18. Representación gráfica de la carga de parásitos en perros beagle determinada mediante qPCR en diferentes puntos de tiempo A) 120 dpi, B) 180 dpi, C) 240 dpi y D) 300 dpi para cada grupo de tratamiento (A, E y F). Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), N/mg: número de amastigotes por mg de tejido de médula ósea.

10 Figura 19. Representación gráfica que muestra la evolución a lo largo del tiempo (41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi) de la carga de parásitos en perros beagle determinada mediante qPCR para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F. Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). N/mg: número de amastigotes por mg de tejido de médula ósea.

15 Figura 20. Niveles de IFN gamma en ganglios linfáticos de perros beagle mediante qPCR a 41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F y valores estadísticos asociados. Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), Qn = cantidad normalizada (Bookout *et al.*, 2006, PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real de alto rendimiento. Curr Protocol Mol Biol capítulo 15: unidad 15 18); \* Hay dos resultados atípicos (valores mucho más altos).

20 Figura 21. Niveles de IL10 en ganglios linfáticos de perros beagle mediante qPCR a 41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F y valores estadísticos asociados. Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), Qn = cantidad normalizada (Bookout *et al.*, 2006, PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real de alto rendimiento. Curr Protocol Mol Biol capítulo 15: unidad 15 18).

25 Figura 22. Niveles de TNF alfa en ganglios linfáticos de perros beagle mediante qPCR a 41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F y valores estadísticos asociados (valores de aumento a la izquierda). Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), Qn = cantidad normalizada (Bookout *et al.*, 2006, PCR de transcripción inversa cuantitativa en tiempo real de alto rendimiento. Curr Protocol Mol Biol capítulo 15: unidad 15 18).

30 Figura 23. Niveles totales de IgG en suero de perros beagle mediante ELISA a 41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F. Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), densidad óptica a 450 nm DO<sub>450nm</sub>.

35 Figura 24. Niveles de IgG1 en suero de perros beagle mediante ELISA a 41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F. Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), densidad óptica a 450 nm DO<sub>450nm</sub>.

40 Figura 25. Niveles de IgG2 en suero de perros beagle mediante ELISA a 41 dpi, 120 dpi, 180 dpi, 240 dpi y 300 dpi para cada grupo de tratamiento A) grupo A, B) grupo E y C) grupo F. Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Abreviaturas: días después de la infección (dpi), densidad óptica a 450 nm DO<sub>450nm</sub>.

## Descripción detallada de la invención

### 55 Definiciones

Una secuencia de "polinucleótidos" o de "ácidos nucleicos", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN o de ARN, preferentemente a una secuencia de ADN. El término recopila secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de base conocidos de ADN y ARN tales como, pero no se limitan a, 4-acetilcitosina, 8-hidroxil-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, pseudoisocitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético,

oxibutóxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina y 2,6-diaminopurina.

- 5 Una "secuencia codificante" o una secuencia que "codifica" un producto génico, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se transcribe (en el caso de ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) *in vitro* o *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas.

10 El término "identidad", como se usa en el presente documento, se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido con nucleótido o aminoácido con aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias de polipéptidos, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias (polinucleótido o aminoácido) determinando su "identidad en porcentaje". La "identidad en porcentaje" de dos secuencias, tanto secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos, es el número de coincidencias exactas entre dos secuencias alineadas dividido entre la longitud de la secuencia más corta y multiplicado por 100. Programas adecuados para calcular la identidad en porcentaje o similitud entre secuencias son muy conocidos en la técnica, tales como el programa NCBI BLAST, usado, por ejemplo, con parámetros por defecto (<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST>).

15 Los términos "secuencias de control" y "elementos de control" de ADN, como se usan en el presente documento, se refieren conjuntamente a secuencias promotoras, señales de poliadenilación, secuencias de terminación de la transcripción, dominios reguladores en la dirección 5', orígenes de replicación, sitios internos de entrada al ribosoma ("IRES"), potenciadores y similares, que proporcionan conjuntamente la replicación, transcripción y traducción de una secuencia codificante en una célula receptora. No todas estas secuencias/elementos de control necesitan estar siempre presentes, mientras que la secuencia codificante seleccionada pueda replicarse, transcribirse y traducirse en una célula huésped apropiada.

25 "Operativamente ligados", como se usa en el presente documento, se refiere a una disposición de elementos en la que los componentes así descritos están configurados de manera que se realice su función usual. Así, las secuencias de control operativamente ligadas a una secuencia codificante pueden efectuar la expresión de la secuencia codificante. Las secuencias de control no necesitan ser contiguas a la secuencia codificante, mientras que sirvan para dirigir la expresión de la misma. Así, por ejemplo, pueden estar presentes secuencias ya transcritas sin traducir intermedias entre una secuencia promotora y la secuencia codificante y la secuencia promotora puede todavía considerarse "operativamente ligada" a la secuencia codificante.

30 El término "promotor", como se usa en el presente documento, se refiere a una región de ADN que inicia la transcripción de una secuencia codificante particular. Los promotores se localizan cerca de los sitios de inicio de la transcripción de genes, sobre la misma hebra y en la dirección 5' sobre el ADN (hacia la región 5' de la hebra codificante). Los promotores pueden tener aproximadamente 100–1000 pares de bases de longitud. Un "promotor eucariota" incluye elementos que actúan en cis tales como sitios de unión para activar la proteína-1 (AP-1), factor κB nuclear (NF-κB), factor A de unión a CArG (CBF-A), factor Y nuclear (NF-Y) y otros, además de la secuencia de la caja TATA.

35 La expresión "vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable" pretende incluir una formulación o sustancia usada para estabilizar, solubilizar y mezclarse de otro modo con principios activos que van a administrarse a animales vivos, que incluyen seres humanos. Ésta incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Excepto en la medida de que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla tal uso en las composiciones.

45 El término "vacuna", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación biológica que mejora la inmunidad a una enfermedad particular. Una vacuna normalmente contiene un agente que se parece a un microorganismo causante de enfermedad, y está frecuentemente hecha de formas debilitadas o muertas del microbio, sus toxinas o una de sus proteínas de la superficie.

50 El término "vacuna de ADN" o "inmunización basada en ADN", como se usa en el presente documento, se refiere a la inyección de un vector de ADN (normalmente un plásmido bacteriano) que induce una respuesta inmunitaria al antígeno codificado por dicho vector de ADN. Una vez se administra la construcción de ADN, las células huésped captan el ADN extraño, expresando el gen viral y produciendo la proteína correspondiente dentro de la célula. Esta forma de presentación de antígeno y procesamiento induce tanto MHC como respuestas inmunitarias celulares y humorales limitadas a la clase I y la clase II (Encke, J. *et al.*, 1999, *Intervirolgy*, 42:117-124). Las vacunas de ADN normalmente consisten en un plásmido bacteriano operativamente ligado a un promotor eucariota fuerte, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y secuencias de terminación de la poliadenilación/transcripción.

55 El término "adyuvante" o "adyuvante de vacuna", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia o combinación de sustancias que no potencia específicamente la respuesta inmunitaria a un antígeno. El término "adyuvante molecular" o "adyuvante de vacuna molecular", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos o al producto de expresión de la misma que no potencia

- específicamente la respuesta inmunitaria a un antígeno expresado de un polinucleótido, de forma que la expresión de un antígeno del polinucleótido produce una elevada respuesta inmunitaria *in vivo*. Incluida en esta definición están sustancias que pueden actuar de facilitadores de la administración de genes celulares *in vivo*, aumentando así la cantidad de ADN de plásmido administrada a células que pueden expresar el antígeno previsto. Sustancias que pueden potenciar la administración de ADN de plásmido incluirían aquellas que no interactúan sustancialmente con el ADN de plásmido en la formulación y sustancias que interactúan con el ADN de plásmido, formando complejos estrechamente unidos o débilmente unidos entre el adyuvante y el ADN de plásmido, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 5
- 10 El término “enfermedad”, como se usa en el presente documento, pretende ser generalmente sinónimo y se usa indistintamente con los términos “trastorno” y “afección” (como en afección médica), porque todos reflejan una afección anormal del cuerpo o de una de sus partes que altera el funcionamiento normal y normalmente se manifiesta por signos y síntomas diferenciadores.
- 15 El término “tratamiento terapéutico”, como se usa en el presente documento, se refiere a devolver un cuerpo de un estado patológico o enfermedad a su estado sano normal. Por ejemplo, en el que dicha enfermedad es una infección, después de la infección o después de la manifestación clínica de la enfermedad producida por la infección. Se observa que no se entiende que este término, como se usa en el presente documento, incluya el término “tratamiento profiláctico” como se define en el presente documento.
- 20 El término “tratamiento profiláctico”, como se usa en el presente documento, se refiere a prevenir un estado patológico. Por ejemplo, en el que dicha enfermedad es una infección, antes de la infección. Se observa que no se entiende que este término, como se usa en el presente documento, incluya el término “tratamiento terapéutico” como se ha definido anteriormente.
- 25 El término “sujeto mamífero” o “mamífero”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquiera de los vertebrados endotérmicos que pertenecen a la clase Mammalia.
- 30 El término “leishmaniosis”, como se usa en el presente documento, se refiere a la principal enfermedad transmitida por vector producida por protozoos intramacrófagos obligados del género *Leishmania*, y transmitidos por la picadura de las moscas de la arena hembra flebotomias de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*, en los mundos viejo y nuevo, respectivamente. Hay 20 especies de *Leishmania* bien reconocidas conocidas por infectar seres humanos, que incluyen agentes de formas viscerales, cutáneas y mucocutáneas de la enfermedad (véase Dawit *et al.* 2013, *J Bacteriol Parasitol*, 4:166).
- 35 El término “inmunización pasiva”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de anticuerpos o fragmentos de los mismos a un sujeto mamífero con la intención de conferir inmunidad a dicho sujeto mamífero.
- 40 El término “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad inmunológicamente eficaz”, como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad que es eficaz, tras la administración de dosis individuales o múltiples a un sujeto mamífero (tal como un paciente humano), en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad dada.
- 45 El término “agente infeccioso”, como se usa en el presente documento, se refiere a agentes que producen una enfermedad infecciosa. Los agentes infecciosos pertenecen a cuatro grupos principales: virus, bacterias, hongos y parásitos. Dichos agentes infecciosos pueden ser extracelulares o intracelulares.
- 50 El término “enfermedad infecciosa”, como se usa en el presente documento, se refiere a enfermedades producidas por agentes infecciosos tales como bacterias, virus, parásitos u hongos. Las enfermedades infecciosas pueden transmitirse, directa o indirectamente (mediante un vector y/o reservorio), de una persona a otra. Las enfermedades zoonóticas son enfermedades infecciosas de animales que pueden producir enfermedad cuando se transmiten a los seres humanos.
- 55 El término “antígeno”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunológica. Un antígeno, como se usa en el presente documento, incluye una secuencia de longitud completa de una proteína, análogos de la misma o fragmentos inmunogénicos de la misma. El término “fragmento inmunogénico” se refiere a un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopes y así provoca una respuesta inmunológica. Tales fragmentos pueden identificarse usando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopes muy conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., Humana Press 1996, Totowa, New Jersey). Por ejemplo, pueden determinarse epítopes lineales, por ejemplo, sintetizando simultáneamente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos mientras que los péptidos están todavía unidos a los soportes. Tales técnicas se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, el documento US4.708.871; Geysen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81:3998-4002; Geysen *et al.*, *Molec. Immunol.* 1986, 23:709-715. Similarmente, se identifican fácilmente
- 60
- 65

5 epítopes conformacionales determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como por, por ejemplo, cristalografía de rayos X y resonancia magnética nuclear bidimensional. También están incluidos antígenos sintéticos dentro de la definición, por ejemplo, poliepitopes, epitopes flanqueantes y otros antígenos recombinantes o sintéticamente derivados. Véanse, por ejemplo, Bergmann *et al.*, Eur. J. Immunol. 1993, 23:2777-2781; Bergmann *et al.*, J. Immunol. 1996, 157:3242- 3249; Suhrbier, A., Immunol, and Cell Biol. 1997, 75:402-408.

Polinucleótido para su uso como adyuvante

10 Un primer aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 15 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2,

para su uso como un adyuvante de vacuna, preferentemente como adyuvante molecular.

20 Se refiere además a dicha secuencia de polinucleótidos para su uso como adyuvante de vacuna en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, para su uso como adyuvante de vacuna para potenciar o inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica en un sujeto mamífero y a un método de tratamiento terapéutico o profiláctico en el que dicho tratamiento comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad inmunológicamente eficaz de dicho polinucleótido adyuvante.

25 SEC ID N°: 1 se corresponde con las posiciones 700 a 909 del gen *fabI* de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y tiene la siguiente secuencia:

700 aaaagccttgccgctccatgct

721 gaatccgggttctgcctgctgaccctttctaccttggcgctgagcgcgctatcccga

781 ctacaacgttatgggtctggcaaaagcgtctctggaagcgaacgtgcgctatatggcgaa

841 cgcgatgggtccggaaggtgtgcgtgttaacgccatctctgctggtccgatccgtactct

901 ggcggttc.

30 En una realización particular, dicha secuencia con al menos el 85 % de identidad con SEC ID N°: 1 tiene al menos el 90 % de identidad, preferentemente el 95 % de identidad, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad.

35 SEC ID N°: 2 es el polipéptido codificado dentro de SEC ID N°: 1 y tiene la siguiente secuencia: KACRSM LNPGS ALLT LSYLGAERAIPNYNVMGLAKASLEANVRYMANAMGPEGVRVNAISAGPIRLAA

En una realización particular, dicha secuencia con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2 tiene al menos el 95 % de identidad, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad.

40 La SEC ID N°: 1 se corresponde con una secuencia con 59 % de G+C en el gen *fabI* de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*. Se predijo que una secuencia tal era una isla CpG usando el software CpG Island Searcher (Takai y Jones, 2002, PNAS 99(6):3740-5), como se describe en el Ejemplo 4. Como la cantidad de antígeno expresado en vacunas de ADN está frecuentemente en el orden de nanogramos a picogramos, la inmunogenicidad normalmente depende de la ayuda de motivos CpG en el polinucleótido (por ejemplo, el esqueleto de plásmido) que desempeñan una

45 función de adyuvantes que promueven la inducción de respuestas de linfocitos T (Dalpke *et al.* 2001, Immunobiology, 204(5):667-76; Klinman *et al.* 1997, Immunol., 158(8):3635-9; Krieg, *et al.* 1995 Nature,374(6522):546-9).

En una realización preferida, dicha secuencia de polinucleótidos comprende:

- 50 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 3 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 3; o

## ES 2 747 748 T3

- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 4 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 4.

SEC ID N°: 3 se corresponde con el gen *fabI* de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* y tiene la siguiente secuencia:

5  
1 atgggttttc tttccggtaa ggcattctg gtaaccggtg ttgccagcaa actatccatc  
61 gcctacggta tcgctcaggc gatgcaccgc gaaggagctg aactggcatt cacctaccag  
121 aacgacaaac tgaaaggccg cgtagaagaa tttgccgctc aattgggttc tgacatcggt  
181 ctgcagtgcg atgttgacga agatgccagc atcgacacca tgttcgctga actggggaaa  
241 gtttgccga aatttgacgg tttcgtacac tctattggtt ttgcacctgg cgatcagctg  
301 gatggtgact atgttaacgc cgttaccggt gaaggcttca aaattgccca cgacatcagc  
361 tctacagct tcgttgcaat ggcaaaagct tgccgctcca tgctgaatcc gggttctgcc  
421 ctgctgacc tttcctacct tggcgtgag cgcgctatcc cgaactacaa cgttatgggt  
481 ctggcaaaag cgtctctgga agcgaacgtg cgctatatgg cgaacgcgat gggtcggaa  
541 ggtgtgctg ttaacgccat ctctgctggt cggatccgta ctctggcggc ttccgggtatc  
601 aaagacttcc gcaaaatgct ggctcattgc gaagccgta ccccgattcg ccgtaccggt  
661 actattgaag atgtgggtaa ctctgcccga ttctgtgct cggatctctc tgccgggtatc

721 tccgggtgaag tagtccacgt tgaccggcgg ttcagcatcg ctgcaatgaa cgaactcgaa.  
En una realización particular, dicha secuencia con al menos el 85 % de identidad con SEC ID N°: 3 tiene al menos el 90 % de identidad, preferentemente el 95 % de identidad, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad.

10 El gen *fabI* (SEC ID N°: 3) codifica una proteína transportadora de enoil-acilo (ACP) reductasa que tiene la siguiente secuencia (SEC ID N°: 4):

MGFLSGKRILVTGVASKLSIAYGIAQAMHREGAELAFYQNDKLGKRVEEFAAQLGSDI  
VLQCDVAEDASIDTMFAELGKVVPKFDGTVHSIGFAPGDQLDGDYVNAVTVREGFKIAH  
DISSYSFVAMAKACRSM LNPGSALLTSLYLAERAIPNYNVMGLAKASLEANVRYMAN  
AMGPEGVRVNAISAGPIRTLAASGIKDFRKM LAHCEAVTPIRRTVTIEDVGNSAAFLCS  
15 DLSAGISGEVHVHDGGFSAAMNELELK.

20 En una realización particular, dicha secuencia con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 4 tiene al menos el 95 % de identidad, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad, que incluye, por ejemplo, *fabI392(ts)* (Bergler, H *et al.*, J. Gen. Microbiol., 1992, 138 2093-100), *fabI93S* o variantes de *fabI*S241F del producto de expresión del gen *fabI*.

25 La proteína transportadora de enoil-acilo (ACP) reductasa es una enzima que es esencial para la síntesis de ácidos grasos bacterianos y es sensible a triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofeno)fenol) que previamente era conocido como un marcador de selección para la clonación molecular (véase, por ejemplo, Goh *et al.* 2008, BMC Biotechnology, 8:61). La presencia de triclosan afecta el crecimiento de las bacterias y es letal más allá de una cierta concentración en el medio. El mecanismo de selección en este caso no se basa en la existencia de un gen para resistencia al

agente de selección, sino en aumentar la concentración de la proteína enoil-ACP reductasa en el citoplasma en aquellos clones que adquieren el ADN extraño. Así, las bacterias que adquieren dicho polinucleótido, recombinante o no, podrán expresar el gen *fabI* a niveles mucho mayores que las no transformantes, por ejemplo, pueden coexistir hasta aproximadamente 50 moléculas de enoil-ACP reductasa por célula. Si la unión triclosan:enoil-ACP reductasa se produce equivalente a equivalente, habrá un intervalo de concentraciones de triclosan en el que las bacterias transformantes sobrevivirán, y las no transformantes no sobrevivirán. Por tanto, este sistema actúa de marcador de selección sin ser necesaria la presencia de un gen de resistencia a antibiótico.

5 En una realización particular, dicha secuencia de polinucleótidos comprende una de dichas secuencias de ácidos nucleicos (a) o (b) anteriores operativamente ligadas a secuencias de control. Preferentemente, dichas secuencias de ácidos nucleicos (a) o (b) están operativamente ligadas a al menos un promotor, preferentemente a un promotor eucariota, es decir, que permite la expresión de la secuencia codificante insertada en células eucariotas, por ejemplo, en células de mamífero.

15 Preferentemente, dicho promotor es un promotor constitutivo fuerte que garantizará altos niveles de expresión de la secuencia codificante, tales como, por ejemplo, promotores virales, que incluyen el promotor temprano inmediato del citomegalovirus (CMV-IE), el promotor del virus 40 simio (SV40), la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous (RSV-LTR), LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (MoMLV) y otros promotores de LTR retrovirales; y promotores virales tales como promotores de creatina cinasa de músculo (MCK) específica de músculo, de ubiquitina C (UBC) y del factor de alargamiento 1a (EF1a), promotor PGK1 (véase, Papadakis *et al.*, Current Gene Therapy 2004, 4, 89-113). Preferentemente, dicho promotor es un promotor del gen *FabI* (SEC ID N°: 7):

```

1 GTGCTGGAGA ATATTCGGCA AGGTCTGAAC CGTCCCAGCC ATCGCCATGA AAGGGTTAGG

61 GGCTGTATGA GCCTGTTTTGT TGCTGGGGTA ACAATATTTG CACAATACGG TCCCCTCGCC

121 CCTCTGGGGA GAGGGTTAGG GTGAGGGGAA AAGCGCCCCC CCTGCCGCAG CCTGCTCCGG

181 TCGGACCTGG CAACTATAGC TACTCACAGC CAGGTTGATT ATAATAACCG TTTATCTGTT

241 CGTACTGTTT ACTAAAACGA CGAATCGCCT GATTTTCAGG CACAACAAGC ATCAACAATA

301 AGGATTAAAG CT.

```

25 Las secuencias subrayadas son elementos clave de un promotor: las cajas -35 y -10 seguidas por el sitio de unión del factor de transcripción (TF).

30 En una realización particular, dicho polinucleótido es un vector. Por "vector" se indica cualquier elemento genético, tal como un plásmido, fago, transposón, cósmido, cromosoma, virus, virión, etc., que es capaz de replicarse cuando se asocia a los elementos de control apropiados y que pueden transferir secuencias de genes entre células.

35 Dicho vector podría ser un vector viral. Se han usado varios sistemas basados en virus para la administración de genes. Muchos ensayos clínicos de terapia génica se basan en retrovirus o adenovirus para administrar el gen deseado. Otros virus usados como vectores incluyen virus adeno-asociados, lentivirus, virus de la viruela, alfavirus y virus del herpes. Estos virus se diferencian en cómo de bien transfieren los genes a las células que reconocen y pueden infectar, y si alteran el ADN de la célula permanente o temporalmente. Una comparación de diferentes vectores virales en uso para terapia génica junto con una visión general de sus ventajas y desventajas se proporciona en <http://www.genetherapynet.com/viral-vectors.html>. Preferentemente, dicho vector es un plásmido, en el que dicho plásmido es un ADN bacteriano circular o lineal.

40 En una realización preferida, el polinucleótido anteriormente descrito consiste en un plásmido bacteriano en el que una de dichas secuencias de ácidos nucleicos (a) o (b) anteriores está operativamente ligada al menos a un promotor eucariota (preferentemente, un promotor fuerte) y a una secuencia de terminación de la poliadenilación/transcripción. El plásmido bacteriano puede cultivarse en bacterias tales como, por ejemplo, *E. coli* y a continuación aislarse y prepararse en una formulación apropiada (según la vía de administración prevista) antes de administrarse al huésped. Tras la administración, el plásmido se recoge por células del huésped en las que se produce(n) el (los) péptido(s) codificado(s).

50 Más preferentemente, dicho polinucleótido comprende además uno o más, preferentemente todos, de los siguientes elementos:

- i) un sitio de clonación múltiple (MCS) o policonector, que es una secuencia artificial presente en

prácticamente todos los vectores de clonación que consiste en un conglomerado de dianas específicas para diferentes enzimas de restricción que permiten la clonación de la mayoría de los fragmentos de ADN de interés, un ejemplo de MCS es aquel en el plásmido pCIneo (Promega, GenBank: U47120);

- 5 ii) señales de terminación de la poliadenilación y de la transcripción. Ejemplos de señales de terminación de la transcripción incluyen, pero no se limitan a, poliA, poliA de SV40, poliA de hormona de crecimiento humana (HGH) y poliA de hormona de crecimiento bovina;
- 10 iii) una secuencia para la encapsidación de plásmidos en fagos, tal como el origen f1; y
- iv) un origen de replicación bacteriano, tal como el origen de replicación derivado de ColE1.

El polinucleótido anterior puede contener uno o más genes de resistencia a antibiótico, tales como el gen de neomicina fosfotransferasa (npt o neo<sup>R</sup>) o el gen de β-lactamasa (bla o amp<sup>R</sup>). Preferentemente, dicha secuencia de polinucleótidos se caracteriza por la ausencia de genes de resistencia a antibiótico.

La secuencia de polinucleótidos como se ha definido anteriormente se co-administra preferentemente con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos (también denominada "secuencia codificante de antígeno"). La secuencia codificante de antígeno podría encontrarse tanto en la misma secuencia de polinucleótidos que comprende las secuencias de ácidos nucleicos a) o b) como se han definido anteriormente como en un polinucleótido diferente. Cuando dicha secuencia codificante de antígeno es parte de un polinucleótido diferente, dicho polinucleótido que codifica antígeno y la secuencia de polinucleótidos que comprende las secuencias de ácidos nucleicos a) o b) como se han definido anteriormente pueden ser parte de la misma composición o de una diferente. En el último caso, la administración puede ser simultánea o consecutiva, preferentemente la secuencia de polinucleótidos que comprende las secuencias de ácidos nucleicos a) o b) como se han definido anteriormente se administran poco antes o después de la administración de la composición que contiene dicho polinucleótido que codifica antígeno. En una realización preferida, el adyuvante de la invención y la secuencia codificante de antígeno forman parte del mismo polinucleótido, podría ser deseable que tanto la secuencia codificante de antígeno como la secuencia codificante de adyuvante estén bajo el control del mismo promotor.

### El polinucleótido de la invención para su uso como medicamento

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 35 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2; y
- 40 c. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos;

para su uso como un medicamento, preferentemente para su uso como una vacuna.

45 En una realización particular, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- 50 b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos 90% de identidad con la SEC ID N°: 2,

para su uso como un adyuvante de vacuna, tal como se describe en el primer aspecto de la invención, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos.

55 Preferentemente, dichos antígenos son conocidos por provocar una respuesta inmunitaria para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad particular. Normalmente, dicha una o más secuencias codificantes de antígeno están operativamente ligadas a un promotor como se ha definido anteriormente. Más preferentemente, la secuencia según a) o b) anterior y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos están bajo el control del mismo promotor.

60 Se refiere además a la secuencia de polinucleótidos tal como se describe en el presente documento para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, para su uso en potenciar o inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica en un sujeto mamífero y a un método de tratamiento terapéutico o profiláctico en el que tal tratamiento comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho polinucleótido.

En una realización preferida, dicha secuencia de polinucleótidos según lo anterior comprende:

- a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 3 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 3; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 4 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 4 como se ha descrito anteriormente.

En una realización particular, dicha secuencia de polinucleótidos comprende una de dichas secuencias de ácidos nucleicos (a) o (b) anteriores operativamente ligadas a secuencias de control. Preferentemente, dichas secuencias de ácidos nucleicos (a) o (b) están operativamente ligadas a al menos un promotor como se ha definido anteriormente.

En una realización preferida, dicho polinucleótido consiste en el vector pPAL (SEC ID N°: 24), que consiste en los elementos mostrados en la figura 3.

Más detalles y realizaciones preferidas de dicho polinucleótido se han proporcionado bajo el primer aspecto de la invención.

#### Segundo uso médico y usos médicos adicionales

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2; y
- c. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos de uno o más agentes infecciosos;

para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa.

En una realización particular, se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- a) una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos un 85% de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90% de identidad con la SEC ID N°: 2,

para su uso como un adyuvante de vacuna, tal como se describe en el primer aspecto de la invención, que comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos de uno o más agentes infecciosos.

En una realización particular, dicho uno o más antígenos son antígenos de parásitos (incluyendo protozoos y helmintos). Por tanto, según una realización preferida, dicho uno o más antígenos son antígenos de helminto y/o protozoicos. En otra realización particular, dicha enfermedad infecciosa es una enfermedad producida por un agente infeccioso intracelular (tal como virus o parásitos intracelulares) y dicho uno o más antígenos son antígenos del uno o más agentes infecciosos intracelulares. Ejemplos de tales enfermedades son aquellas producidas por parásitos intracelulares obligados que incluyen *Plasmodium sp*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Leishmania sp*. Más preferentemente, dicha enfermedad es leishmaniosis y dicho uno o más antígenos son antígenos de leishmaniosis. Ejemplos de antígenos comerciales con uso profiláctico contra la leishmaniosis son: *LiESP/QA-21* (vacuna CaniLeish®); antígeno A2 (vacuna LeishTec®); ligando de fucosa-manosa (vacuna Leishmune®).

En una realización preferida, la invención se refiere a dicha secuencia de polinucleótidos para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de leishmaniosis, preferentemente para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de leishmaniosis canina.

Un experto en la técnica sabrá cómo evaluar el efecto protector contra la leishmaniosis, que generalmente se muestra por una disminución de la carga de parásitos. La determinación de los niveles de citocinas tales como IFN $\gamma$ , IL-10 o TNF $\alpha$  y la cuantificación de los niveles de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG total, IgG1 y/o IgG2) también pueden usarse en la evaluación de la efectividad del método de inmunización. En particular, un potenciamiento de la citocina proinflamatoria IFN $\gamma$  es característico de una respuesta celular Th1

predominante que se ha asociado a la resistencia a la leishmaniosis, mientras que se ha descrito que un aumento de la respuesta humoral es un marcador de susceptibilidad a la enfermedad.

La carga de parásitos puede determinarse a partir de cualquier muestra biológica que pueda contener el parásito. Las muestras biológicas típicas son sangre, tejidos y órganos linfoides (por ejemplo, los ganglios linfáticos) u órganos diana, tales como la médula ósea, el bazo o el hígado. Los métodos para determinar la carga de parásitos son bien conocidos en la técnica y esto puede incluir la determinación del ADN genómico de *Leishmania*. En general, los cebadores son complementarios a la región conservada del minicirculo de kinetoplast del ADN del parásito, lo que permite la detección de varias especies de *Leishmania* (véase, por ejemplo, Mary *et al.*, J Clin Microbiol 2004, 42 (11): 5249-5255; Lachaud *et al.*, J Clin Microbiol 2001, 39: 613-617). Otros métodos conocidos en la técnica son la prueba de aglutinación directa (véase, por ejemplo, Ramiro *et al.* Vaccine 2003, 21 (19-20): 2474-84), el ensayo de dilución limitante (véase, por ejemplo, Gomes *et al.*, Vaccine 2007, 25 (12): 2168-2172) y la cuantificación de parásitos que expresan GFP (véase, por ejemplo, Pinto E. F. *et al.*, Infection and immunity 2004, 72 (8), 4521-4527)

La determinación de los niveles de citocinas o inmunoglobulinas también puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica para la cuantificación de los niveles de expresión de ARNm o polipéptido diana. Estos métodos son bien conocidos en la técnica y en los ejemplos se describen métodos ilustrativos y no limitativos.

Los niveles de citocinas y/o inmunoglobulinas pueden determinarse a partir de cualquier muestra biológica que pueda contenerlos. Estos incluyen líquidos biológicos, tales como sangre completa, suero, plasma, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, lavado bronquial, líquido ascítico, aspirado de médula ósea, derrame pleural, orina, así como cualquier tejido o cualquier otro componente corporal que pueda contener anticuerpos o citocinas. Preferentemente, dicha muestra biológica es sangre, suero o plasma, más preferentemente suero.

Los métodos de biología molecular para medir cantidades de secuencias de ácidos nucleicos diana son bien conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, PCR de punto final, PCR competitiva, transcriptasa inversa-PCR (RT-PCR), PCR en tiempo real o cuantitativa (qPCR), qPCR de transcriptasa inversa (RT-qPCR), PCR-pirosecuenciación, PCR-ELISA, microalineamientos de ADN, ensayos de hibridación *in situ* tales como transferencia puntual o ensayo de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), ADN ramificado (Nolte, Adv. Clin. Chem 1998,33: 201-235) y para versiones multiplex de dichos métodos (véase por ejemplo, Andoh *et al.*, Current Pharmaceutical Design, 2009; 15,2066-2073). Preferentemente, dicho ensayo de determinación de ácido nucleico es qPCR o RT-qPCR.

Un experto en la técnica conoce diversos tipos de inmunoensayos para la cuantificación de proteínas de interés. Estos métodos se basan en el uso de reactivos de afinidad, que pueden ser cualquier anticuerpo o ligando que se una específicamente a la proteína diana, que preferentemente está marcada.

Por ejemplo, las técnicas de inmunotransferencia de tipo Western o inmunotransferencia permiten la comparación de la abundancia relativa de proteínas separadas por un gel electroforético (por ejemplo, proteínas nativas por estructura tridimensional o proteínas desnaturizadas por la longitud del polipéptido). Las técnicas de inmunotransferencia utilizan anticuerpos (u otros ligandos específicos en técnicas relacionadas) para identificar proteínas diana entre varias especies de proteínas no relacionadas. Implican la identificación de la diana proteica mediante reacciones específicas antígeno-anticuerpo (o proteína-ligando). Las proteínas se separan típicamente por electroforesis y se transfieren a una lámina de material polimérico (generalmente nitrocelulosa, nailon o poli(difluoruro de vinilideno)). Las transferencias puntuales y por ranuras son procedimientos simplificados en los que las muestras de proteínas no se separan por electroforesis sino que se inmovilizan directamente sobre una membrana.

Tradicionalmente, la cuantificación de proteínas en disolución se ha llevado a cabo mediante inmunoensayos sobre un soporte sólido. Dicho inmunoensayo puede ser, por ejemplo, un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA), un ensayo inmunosorbente fluorescente (FIA), un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CIA) o un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo enzimático multiplicado, un radioinmunoensayo en fase sólida (SPROA), un ensayo de polarización de fluorescencia (FP), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), un ensayo de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo (TR-FRET), un ensayo de resonancia de plasmón superficial (SPR). Se incluyen específicamente los multiplex y cualquier versión de próxima generación de cualquiera de los anteriores, tales como los inmunoensayos de citometría de flujo basados en perlas (por ejemplo, basados en la tecnología Luminex xMAP). Preferentemente, dicho inmunoensayo es un ensayo ELISA o cualquier versión multiplex del mismo.

Otros métodos que pueden usarse para la cuantificación de proteínas son las técnicas basadas en la espectrometría de masas (EM), tales como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (CL/EM), descrita por ejemplo en el documento US2010/0173786, o CL-EM/EM en tándem (documentos WO2012/155019, US2011/0039287, M. Rauh, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 1 de febrero de 2012, 883-884. 59-67) y el uso de matrices de péptidos, proteínas o anticuerpos y versiones multiplex de las técnicas anteriores, así como la próxima generación de tales técnicas y combinaciones de las mismas.

El término leishmaniosis engloba una enfermedad causada por más de 25 especies de *Leishmania*, que incluyen, entre otras, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis* y *L. peruviana*.

5 Hay 3 formas principales de la enfermedad:

- 10 – La leishmaniosis visceral (LV, también conocida como kala-azar) es mortal si se deja sin tratar. Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, agrandamiento del bazo e hígado, y anemia. *L. donovani* y *L. infantum* son los principales agentes causantes.
- 15 – La leishmaniosis cutánea (LC) es la forma más común de la leishmaniosis y produce lesiones de la piel, principalmente úlceras, sobre partes expuestas del cuerpo, dejando cicatrices para el resto de la vida e incapacidad grave. *L. major* (viejo mundo) y *L. mexicana* y *L. amazonensis* (nuevo mundo) son los principales agentes etiológicos.
- La leishmaniosis mucocutánea conduce a destrucción parcial o total de las membranas mucosas de la nariz, boca y garganta. *L. braziliensis* es la principal especie responsable de esta forma de enfermedad.

Más información sobre la enfermedad, diagnóstico y tratamiento puede encontrarse, por ejemplo, mediante [http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniosis/health\\_professionals/index.html](http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniosis/health_professionals/index.html) o <http://www.who.int/leishmaniosis/resources/en/>.

25 Preferentemente, la leishmaniosis es leishmaniosis visceral. El término general leishmaniosis visceral engloba un amplio espectro de gravedad y manifestaciones. La aparición puede ser crónica, subaguda o aguda. Aunque el periodo de incubación generalmente oscila de semanas a meses, la infección asintomática puede manifestarse clínicamente años a décadas después de la exposición en personas que se inmunocomprometieron por otros motivos médicos (tales como VIH/SIDA). La leishmaniosis visceral se produce normalmente por las especies *L. donovani* y *L. infantum* (*L. chagasi* generalmente se considera sinónimo de *L. infantum*) y afecta a los órganos internos (particularmente, bazo, hígado y médula ósea).

30 Se refiere además a un método de tratamiento terapéutico o profiláctico contra las enfermedades anteriores en el que tal tratamiento comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho polinucleótido.

35 Por ejemplo, dicho sujeto mamífero está seleccionado de un ser humano, animal de compañía, ganado no doméstico o animal de zoológico. Por ejemplo, el sujeto puede seleccionarse de un ser humano, perro, gato, vaca, cerdo, oveja, caballo, oso, etc. En una realización preferida, dicho sujeto mamífero es un animal que se sabe que es un huésped afectado por *Leishmania*, tal como, por ejemplo, hiracoideos, cánidos, roedores, équidos y seres humanos. En una realización más preferida, dicho sujeto mamífero es un perro (principal reservorio para *L. infantum*) o un ser humano.

Más detalles y realizaciones preferidas de dicho polinucleótido se han proporcionado bajo los aspectos previos de la invención.

#### 45 Secuencia de polinucleótidos de la invención que comprende el gen LACK y usos médicos de la misma

Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 50 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
- b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2;
- 55 y
- c. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o
- 60 d. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6.

La SEC ID N°: 5 se corresponde con el ARNm del homólogo del receptor de la proteína cinasa C activada de *Leishmania infantum* (p36Li), cds completas (gen LACK) con número de acceso de GenBank: U49695.1. En una realización particular, dicha secuencia con al menos el 85 % de identidad con SEC ID N°: 5 tiene al menos el 90 % de identidad, preferentemente el 95 % de identidad, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de

identidad. SEC ID N°: 6 (antígeno LACK) es el polipéptido codificado dentro de SEC ID N°: 5 y tiene la siguiente secuencia:

MNYEGHLKGHRGWVTSLACPQQAGSYIKVVSTSRDGTAIWKANPDRHSVDSYGL  
 PSHRLEGHTGFVSCVSLAHATDYALTASWDRSIRMWDLRNGQCQRKFLKHTKDVLA  
 AFSPDDRLIVSAGRDNVIRVWNVAGECMHEFLRDGHEDWVSSICFSPSLEHPIVVSGS  
 WDNTIKVWNVNGGKCERTLKGHSNYVSTVTVSPDGSLCASGGKDGAALLWDLSTGE  
 QLFKINVESTPINQIAFSPNRFWMCVATERSLSVYDLESKAVIAELTPDGAKPSECISIAW  
 SADGNTLYSGHKDNLIRVWSISDAE.

5 En una realización particular, dicha secuencia con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6 tiene al menos el 95 % de identidad, más preferentemente el 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad.

10 El antígeno LACK es un análogo en *Leishmania* del receptor para la proteína cinasa C activada en mamíferos (RACK) según su secuencia de aminoácidos.

En una realización preferida, dicha secuencia de polinucleótidos según lo anterior comprende:

- 15 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 3 o una secuencia con al menos un 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 3; o
- 20 b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en la SEC ID N°: 4 o una secuencia de aminoácidos con al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N°: 4 tal como se describió anteriormente.

En una realización más preferida, dicho polinucleótido comprende uno o más, preferentemente todos, de los siguientes elementos:

- 25 i) una secuencia de ácidos nucleicos como se ha definido anteriormente que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o SEC ID N°: 3 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 3; o
- 30 que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2; o una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 4 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 4;
- 35 i) el potenciador/promotor del citomegalovirus (CMV);
- ii) el sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido pCIneo (Promega, GenBank: U47120);
- 40 iii) una secuencia de ácidos nucleicos como se ha definido anteriormente que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6;
- iv) las señales de terminación de la poliadenilación y de la transcripción del SV40;
- 45 v) el origen f1 para la encapsidación de plásmido en fagos;
- vi) el origen de replicación derivado de ColE1.

50 En una realización preferida, dicho polinucleótido consiste en el vector pPAL-LACK (SEC ID N°: 23), que consiste en los elementos mostrados en la Figura 2.

55 Por ejemplo, el vector pPAL-LACK se genera a partir del plásmido pCI-neo-LACK por un proceso de dos etapas, en el que primero hay una eliminación del gen *npt*, en segundo lugar hay una inserción del gen *fabI* y el promotor del gen *fabI* en el vector pCI-bla-LACK para obtener pCI-bla-LACK-*fabI* y finalmente se elimina el gen *bla*, como se ha detallado en el Ejemplo 1.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 5
- a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
  - b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2.;
- 10 y
- c. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o
  - d. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6,
- 15

para su uso como un medicamento.

20 Se refiere además a dicha secuencia de polinucleótidos para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad, para su uso en potenciar o inducir una respuesta inmunitaria profiláctica o terapéutica en un sujeto mamífero y a un método de tratamiento terapéutico o profiláctico, en el que tal tratamiento comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho polinucleótido.

25 Más detalles y realizaciones preferidas de dicho polinucleótido y su uso médico se han proporcionado bajo los aspectos previos de la invención.

Un sexto aspecto de la invención se refiere a una secuencia de polinucleótidos que comprende:

- 30
- a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
  - b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2.;
- 35 y
- c. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o
  - d. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6,
- 40

para su uso en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa.

45 Se refiere además a un método de tratamiento terapéutico o profiláctico contra una enfermedad infecciosa en el que tal tratamiento comprende administrar a un sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho polinucleótido.

50 En una realización preferida, la invención se refiere a dicha secuencia de polinucleótidos para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de leishmaniosis, preferentemente para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de leishmaniosis canina.

55 En otra realización preferida, la invención se refiere a dicha secuencia de polinucleótidos para su uso en un tratamiento terapéutico o profiláctico de inducir o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto mamífero.

Más detalles y realizaciones preferidas de dicho polinucleótido y sus usos médicos se han proporcionado bajo los aspectos previos de la invención.

#### Polinucleótido de la invención y respuesta Th1 protectora

60 De un modo similar a otros agentes infecciosos intracelulares, la inmunidad contra Leishmania requiere el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular eficaz. Preferentemente, el polinucleótido de la invención induce o potencia una respuesta celular adaptativa específica cuando se administra a un sujeto mamífero. Se sabe que esta inducción de una respuesta celular eficaz es una característica deseable para vacunas profilácticas contra la leishmaniosis, en particular contra leishmaniosis canina.

65

Las estrategias de vacunación se basan en el actual entendimiento de las características de una respuesta inmunitaria anti-*Leishmania* eficaz. Estudios en modelos murinos han proporcionado un importante conocimiento sobre la función de inmunidad celular para controlar la infección por *Leishmania major* (Sacks *et al.*, 2002, Nature Reviews 2(11):845–58). Así, sin desear quedar ligado a teoría, la resistencia a la leishmaniosis está relacionada con una respuesta 1 de linfocitos T colaboradores (Th1), caracterizada por una alta producción de IFN- $\gamma$  de la población de linfocitos T CD4+ específicos de antígeno. Entonces, estas células son eficaces en promover la activación de macrófagos, y la *Leishmania* intracelular se destruye de un modo dependiente de óxido nítrico. Por otra parte, las respuestas 2 de linfocitos T colaboradores (Th2), con producción de citocinas IL-4 y IL-10, están asociadas a susceptibilidad y exacerbación de la enfermedad (Heinzel *et al.*, The Journal of Experimental Medicine 1989, 169 (1):59–72; Heinzel *et al.*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1991, 88, (16):7011–5; Muller *et al.*, Immunological Reviews 1989, 112:95–113).

En el caso de leishmaniosis canina, aunque generalmente se generan ambos tipos de linfocitos T fenotípicos, hay una evidencia cada vez mayor de la existencia de una correlación entre las respuestas Th1 y Th2 y el control y progresión de la enfermedad, siendo respectivamente el equilibrio entre ambos tipos de respuestas determinante del desenlace final (Brachelente *et al.*, Veterinary Pathology 2005, 42(2):166–75; Chamizo C. *et al.*, Veterinary Immunology and Immunopathology 2005, 103 (1–2):67–75; Pinelli E *et al.*, European Journal of Immunology 1995, 25(6):1594–600; Pinelli E *et al.*, Infection and Immunity 1994, 62(1):229–35; Quinnell RJ *et al.*, The Journal of Infectious Diseases 2001, 183(9):1421–4; Ramos I *et al.*, Vaccine 2008, 26(3):333–44; Ramos, I., *et al.*, Vaccine 2009, 27(48): 6695–6703).

En una realización preferida, la invención se refiere a dicho polinucleótido para su uso en la inducción o potenciación de una respuesta inmunitaria en el tratamiento profiláctico o terapéutico de una enfermedad infecciosa, preferentemente leishmaniosis, en un sujeto mamífero. Dicha respuesta inmunitaria es preferentemente una respuesta celular caracterizada por una predominancia de subpoblación Th1 de linfocitos T CD4+ colaboradores (Th) frente a la subpoblación Th2. Más preferentemente, el polinucleótido de la invención tal como se describe en el presente documento proporciona una respuesta Th1 protectora contra infección por *Leishmania*, en particular contra infección por *L. infantum*.

Más detalles y realizaciones preferidas de dicho polinucleótido y sus usos médicos se han proporcionado bajo los aspectos previos de la invención.

#### Composición farmacéutica que comprende una secuencia de polinucleótidos

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en el primer aspecto de la invención, que comprende además una secuencia de polinucleótidos que codifica uno o más antígenos, y un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un octavo aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una secuencia de polinucleótidos como se define en el segundo aspecto de la invención y aspectos posteriores y que comprende además un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, líquidos tales como agua, solución salina, polietilenglicol, ácido hialurónico, glicerol y etanol. También pueden incluirse sales farmacéuticamente aceptables en ellas, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos y similares; y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. También se prefiere que la preparación contenga un excipiente farmacéuticamente aceptable que sirve de estabilizador, particularmente para péptido, proteína u otras moléculas similares si van a incluirse en la composición de vacuna. Ejemplos de vehículos adecuados que también actúan de estabilizadores para péptidos incluyen, sin limitación, calidades farmacéuticas de dextrosa, sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, inositol, dextrano y similares. Otros vehículos adecuados incluyen almidón, celulosa, fosfatos de sodio o calcio, ácido cítrico, ácido tartárico, glicina, polietilenglicoles de alto peso molecular (PEG) y combinación de los mismos. Una discusión minuciosa de excipientes, aditivos y vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (22ª edición, 2012).

También pueden incluirse ciertos facilitadores de la captación y/o expresión de moléculas de polinucleótidos ("agentes facilitadores de la transfección") en, por ejemplo, composiciones de vectores no virales, por ejemplo, facilitadores tales como bupivacaína, cardiotoxina y sacarosa, y vehículos facilitadores de la transfección tales como preparaciones liposómicas o de lípidos que se usan rutinariamente para administrar moléculas de ácidos nucleicos. Los liposomas aniónicos y neutros están ampliamente disponibles y son muy conocidos para administrar moléculas de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Liposomes: A Practical Approach, (1990) RPC New Ed, IRL Press).

Las preparaciones de lípidos catiónicos también son vehículos muy conocidos para su uso en la administración de moléculas de polinucleótidos. Preparaciones de lípidos adecuadas incluyen DOTMA (cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio), disponible bajo el nombre comercial Lipofectin, y DOTAP (1,2-bis(oleiloxi)-3(trimetilamonio)propano). Estos lípidos catiónicos pueden usarse preferentemente en asociación con un lípido

neutro, por ejemplo, DOPE (dioleilfosfatidiletanolamina).

Alternativamente, las secuencias de polinucleótidos de la presente invención pueden encapsularse, adsorberse a o asociarse a, vehículos en partículas. Ejemplos de vehículos en partículas incluyen aquellos derivados de polímeros de poli(metacrilato de metilo), además de micropartículas derivadas de poli(lactidas) y poli(lactida-co-glicolidas), conocidos como PLG. También pueden usarse otros sistemas en partículas y polímeros, por ejemplo, polímeros tales como polilisina, poliarginina, poliornitina, espermina, espermidina, además de conjugados de estas moléculas.

En una realización particular, dicha composición farmacéutica es una vacuna, con o sin adición de una sustancia adyuvante o composición.

En una realización particular, dicha composición farmacéutica comprende al menos otro adyuvante, como se ha definido anteriormente. Adyuvantes preferidos incluyen cualquier sustancia que potencie la respuesta inmunitaria de un sujeto a los antígenos codificados por el polinucleótido de la invención. Pueden potenciar la respuesta inmunitaria afectando cualquier número de vías, por ejemplo, estabilizando el complejo de antígeno/MHC, haciendo que esté presente más complejo de antígeno/MHC sobre la superficie celular, potenciando la maduración de células presentadoras de antígeno (APC) o prolongando la vida de APC.

Dicho adyuvante puede ser un adyuvante tradicional tal como bacterias muertas, componentes bacterianos, sales de aluminio, emulsiones de aceite, partículas de polisacáridos y biopolímeros. Preferentemente, dicho adyuvante es un adyuvante molecular. Los adyuvantes moleculares son secuencias de ácidos nucleicos que codifican péptidos conocidos por estimular, modificar o modular el sistema inmunitario de un huésped. Ejemplos de adyuvantes moleculares para reforzar la inmunogenicidad de vacunas de ADN pueden ser plásmidos que codifican citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$ , GM-CSF o IL-15) como inmunoestimulantes naturales. También se han evaluado plásmidos que codifican quimiocinas para su capacidad para potenciar vacunas de ADN. Más recientemente, también se han investigado moléculas co-estimulantes de la superfamilia de ligando/receptor de TNF y moléculas de señalización como adyuvantes de vacunas de ADN (Saade *et al.*, Expert Rev Vaccines 2012, 11(2):189-209).

#### Vía de administración y programa de dosificación

Dicho polinucleótido y composición farmacéutica como se definen y según los aspectos previos de la invención se formulan para ser compatibles con su vía de administración prevista. Métodos para realizar la administración son conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Éstos incluyen, por ejemplo, inyecciones, por vías parenterales tales como intravenosa, intravascular, intrarterial, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, u otras, además de oral, nasal, oftálmica, rectal o tópica. También se contempla específicamente administración de liberación sostenida, por medios tales como inyecciones de liberación prolongada o implantes erosionables. Una vía de administración preferida es inyección subcutánea o intramuscular. Otra vía de administración preferida es administración intranasal.

La dosis se seleccionará según la vía de administración, pauta de tratamiento y/o programa de administración, teniendo en cuenta los datos de toxicidad y eficacia existentes.

Pueden usarse estrategias de vacunación basadas en pautas de sensibilización-refuerzo. Éstas son conocidas por potenciar respuestas contra patógenos difíciles. Estas estrategias normalmente implican la sensibilización de las respuestas inmunitarias usando un antígeno expresado primero por un vector, normalmente un ADN de plásmido, seguido de uno o más refuerzos con la administración del mismo antígeno en un vector diferente, normalmente un virus recombinante. Esta estrategia se conoce como pauta de sensibilización-refuerzo heteróloga. Alternativamente, puede usarse una pauta de sensibilización-refuerzo homóloga en la que el mismo vector que codifica el antígeno se usa para las etapas de sensibilización y refuerzo. Preferentemente, dicho vector que codifica antígeno es un ADN de plásmido.

Por consiguiente, una pauta de administración preferida para dicho polinucleótido o composición farmacéutica es una pauta de sensibilización-refuerzo homóloga, preferentemente en la que dicho polinucleótido es un polinucleótido de plásmido bacteriano, más preferentemente dicho polinucleótido es el vector pPAL-LACK.

Una dosis unitaria adecuada para la vacunación es 5-20 mg de antígeno que codifica ADN / por kg de peso corporal, y tal dosis se administra preferentemente 1, 2 o 3 veces (preferentemente en una pauta homóloga) y con un intervalo de 1-3 semanas. Por ejemplo, la sensibilización se lleva a cabo en el día -60 y el refuerzo en el día -30 o -45 antes de la infección o día de exposición planeada al agente infeccioso.

En una realización particular, dicho polinucleótido como se define y según los aspectos previos de la invención se usa con otros fármacos para proporcionar un tratamiento profiláctico o terapéutico de combinación. Los otros fármacos pueden formar parte de la misma composición, o proporcionarse como una composición separada para administración al mismo tiempo o en un momento diferente.

Más detalles y realizaciones preferidas de dicha composición farmacéutica y sus usos médicos se han

proporcionado bajo los aspectos previos de la invención.

El polinucleótido de la invención para la inmunización de un mamífero

5 Un noveno aspecto de la invención se refiere a un anticuerpo, incluyendo un fragmento del mismo, seleccionado preferentemente de la lista que consiste en Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, Vhh, nanocuerpo y diacuerpo, obtenido u obtenible después de la inmunización de un mamífero con el polinucleótido como se define en el primer y segundo aspectos de la invención, la composición farmacéutica según el tercer aspecto de la invención o el polinucleótido según los aspectos cuarto, quinto o sexto de la invención o una composición farmacéutica que comprende los mismos, en el que dicho anticuerpo o fragmento del mismo es adecuado para el tratamiento profiláctico o terapéutico de un sujeto mamífero, preferentemente para su uso en inmunización pasiva.

15 En un aspecto relacionado, la invención se refiere a un método para la obtención de anticuerpos que comprende la inmunización de un mamífero, con el polinucleótido tal como se define en los aspectos primero y segundo de la invención, el polinucleótido según los aspectos cuarto a sexto de la invención o una composición farmacéutica que comprende los mismos. Dicho mamífero puede ser un humano o un mamífero no humano.

20 En una realización particular, se refiere a un método para la obtención de anticuerpos que comprende la inmunización de un mamífero, preferentemente un mamífero no humano, con el polinucleótido según el cuarto aspecto de la invención, o una composición farmacéutica que lo comprende.

Dicho método puede comprender además el aislamiento y/o purificación de los anticuerpos obtenidos. Los métodos para el aislamiento y/o purificación de polipéptidos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Isolation and Purification of Proteins, 5 de febrero de 2003 por CRC Press, ISBN 9780824707262) Generalmente, la purificación de anticuerpos comprende una etapa de clarificación y una vez que se ha obtenido una disolución clarificada que contiene el polipéptido de interés, se intenta su separación de las otras proteínas producidas usando una combinación de diferentes técnicas de cromatografía. Estas técnicas separan las mezclas de proteínas en función de su carga, grado de hidrofobicidad o tamaño. Varias resinas de cromatografía diferentes están disponibles para cada una de estas técnicas, lo que permite una adaptación precisa del esquema de purificación a la proteína particular involucrada. La cromatografía de afinidad, que explota una interacción específica entre la proteína que va a purificarse y un agente de captura inmovilizado, también puede ser una opción para algunos polipéptidos. Preferentemente, la purificación de anticuerpos comprende una etapa de cromatografía de afinidad, más preferentemente cromatografía de proteína A.

35 El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio e incluye anticuerpos completamente ensamblados, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), fragmentos de anticuerpo de unión al antígeno (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos), camelcuerpos y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores en tanto que presenten la actividad biológica deseada.

40 Un "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo de unión al antígeno" de un anticuerpo se define por este documento como un fragmento de un anticuerpo (por ejemplo, una región variable de una IgG) que es suficiente para conferir unión del antígeno específica al polipéptido, en tanto que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada. Una "región de unión al antígeno" de un anticuerpo normalmente se encuentra en una o más regiones hipervariables de un anticuerpo, es decir, las regiones CDR-1, -2 y/o -3; sin embargo, las "regiones estructurales" variables también pueden desempeñar una función importante en la unión al antígeno, tal como proporcionando un andamiaje para las CDR.

50 Ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, anticuerpo de dominio (dAb), fragmentos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv), fragmentos de anticuerpos monocatenarios, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos lineales [Johnson G, Wu TT. (2000) Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot. Nucleic Acids Res. 28:214-218]; anticuerpos recombinantes quelantes, tricuerpos o bicuerpos, intracuerpos, nanocuerpos, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP), una proteína de fusión del dominio de unión al antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado, un anticuerpo que contiene VHH, o muteínas o derivados de los mismos; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos [Chotia C, Lesk AM. (1987)

Secuencias de plásmidos

60 Leyenda:

65	Negrita	Sitio de clonación múltiple (MCS) o sitio de restricción Pacl
	Subrayado	Gen LACK
	Dobre subrayado	Gen fabI que incluye promotor (elementos clave caja -35, caja -10 y sitio de unión a TF, <i>en cursiva</i> ).

# ES 2 747 748 T3

Letras mayúsculas Promotor *fabI* dentro de esta secuencia del genoma de *E. coli*

## pCI-bla-*fabI*-LACK (SEC ID N°: 22)

```
1 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta
61 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc
121 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg
181 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc
241 gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat
301 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc
361 ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga
421 cggtaaattg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg
481 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac
541 caatgggcgt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt
601 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg
661 cgatcgcccg ccccgttgac gcaaattgggc gtaggcgtg tacgggtgga ggtctatata
721 agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggt agtttatcac
781 agttaaattg ctaacgcagt cagtgttct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt
841 gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa
901 ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact
961 cttgcgtttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac
1021 aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact
5 1081 ataggctagc ctcgagaatt cacccatgaac tacgagggtc acctgaaggg ccaccgcgga
```

ES 2 747 748 T3

1141 tgggtcacct cctggcctg cccgcagcag gcggggctgt acatcaaggt ggtgtcgacg  
 1201 tcgcgcgatg gcacggccat ctctggaaa gccaaccccg accgccacag cgtggacagc  
 1261 gactacggtc tgccgagcca cgcctcgag gccacaccg gcttcgtgtc gtgtgtgtcg  
 1321 ctggcccacg ccaccgacta cgcgctgacc gcgtcctggg accgctccat cgcgatgtgg  
 1381 gacctgcgca atggccagtg ccagcgcgaag ttctgaagc acaccaagga cgtgctcgcc  
 1441 gtcgcttct cgccggacga cgcctgatc gtgtccgcg gccgcgaaa cgtgatccgc  
 1501 gtgtggaacg tggcgggca gtgatgcac gagttcctgc gcgacggcca cgaggactgg  
 1561 gtgagcagca tctgtttctc gccgtcgctg gagcatccga tcgtggtgtc cggcagctgg  
 1621 gacaacacca tcaaggtatg gaacgtgaac gggggcaagt gtgagcgac gctcaagggc  
 1681 cacagcaact acgtgtccac ggtgacggtg tcgccagacg ggtcgtgtg cgcgtccggc  
 1741 ggcaaggacg gcgcggcct gctgtgggac ctgagcaccg gcgagcagct gttcaagatc  
 1801 aacgtggagt cgccatcaa ccagatcgcc ttctcgcca accgcttctg gatgtgcgtc  
 1861 gcgacggaga ggtctctgtc cgtgtacgac ctggagagca aggctgtgat tgcggagctg  
 1921 acgccggacg gcgcgaagcc gtccgagtgc atctccattg cctggtccgc cgacggcaac  
 1981 actctgtact ccggtcacia ggacaacctg atccgcgtgt ggtccatctc cgacccgag  
 2041 **taactagagt cgacccgggc ggccg**cttcc ctttagtgag ggttaatgct tcgagcagac  
 2101 atgataagat acattgatga gtttgacaaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc  
 2161 tttatttgtg aaatttgtga tgctattgtt ttatttghaa ccattataag ctgcaataaa  
 2221 caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag  
 2281 gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa tccgataagg atcgatccgg  
 2341 gctggcgtaa tagcgaagag gccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga  
 2401 atggcgaatg gacgcgcct gttagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg  
 2461 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgt**taaa ttaa**GTGCTG GAGAATATTC GGCAAGGTCT  
 2521 GAACCGTCCC AGCCATCGCC ATGAAAGGGT TAGGGGCTGT ATGAGCCTGT TTGTTGCTGG  
 2581 GGTAACAATA TTTGCACAAT ACGGTCCCCT CGCCCCTCTG GGGAGAGGGT TAGGGTGAGG  
 2641 GGAAAAGCGC CCCCCCTGCC GCAGCCTGCT CCGGTCGGAC CTGGCAACTA TAGCTACTCA  
 2701 CAGCCAGGTT GATTATAATA ACCGTTTATC TGTTCTGACT GTTTACTAAA ACGACGAATC  
 2761 GCCTGATTTT CAGGCACAAC AAGCATCAAC AATAAGGATT AAAGCTatgg gttttctttc  
 2821 cggtaaagcg attctggtaa ccggtgttgc cagcaacta tccatgcct acggtatcgc  
 2881 tcaggcgatg caccgcaag gagctgaact ggcattcacc taccagaacg acaaactgaa  
 2941 aggccgcgta gaagaatttg ccgctcaatt gggttctgac atcgttctgc agtgcgatgt  
 3001 tgcagaagat gccagcatcg acaccatggt cgctgaactg gggaaagttt ggccgaaatt  
 3061 tgacggtttc gtacactcta ttggttttgc acctggcgat cagctggatg gtgactatgt  
 3121 taacgccgtt acccgtgaag gcttcaaaat tgcccacgac atcagctcct acagcttctg  
 3181 tgcaatggca aaagcttgc gctccatgct gaatccgggt tctgccttgc tgaccctttc  
 3241 ctaccttggc gctgagcgc ctatcccga ctacaacgtt atgggtctgg caaaagcgtc  
 3301 tctggaagcg aacgtgcct atatggcga cgcgatgggt ccggaagggt tgcgtgttaa  
 3361 cgccatctct gctggtccga tccgtactct ggcggcttcc ggtatcaaag acttccgcaa  
 3421 aatgctggct cattgcgaag ccgttacccc gatccgct accgttacta ttgaagatgt  
 3481 gggtaactct gcggcattcc tgtgctccga tctctctgcc ggtatctccg gtgaagtagt

ES 2 747 748 T3

3541 ccacgttgac ggcggtttca gcatcgctgc aatgaacgaa ctcgaactga aataa**ttaat**  
 3601 **ta**accgcgta ccgcgatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa  
 3661 gccagccccg acaccgccca acaccgctg acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg  
 3721 catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac  
 3781 cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatth ttataggtta  
 3841 atgtcatgat aataatggth tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg  
 3901 gaaccctat ttgtttatth ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat  
 3961 aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc  
 4021 gtgtcgcctt tattccctth tttgcgcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa  
 4081 cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac  
 4141 tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga  
 4201 tgagcactth taaagttctg ctatgtggcg cgttattatc ccgtattgac gccgggcaag  
 4261 agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca  
 4321 cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca  
 4381 tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa  
 4441 ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc  
 4501 tgaatgaagc cataccaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa  
 4561 cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc ttcccggcaa caattaatag  
 4621 actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctccggcctt ccggctggct  
 4681 ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac  
 4741 tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa  
 4801 ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agatagggtc ctactgatt aagcattggt  
 4861 aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat  
 4921 ttaaaaggat ctaggatgaag atcctttttg ataatctcat gaccaaaatc cottaacgtg  
 4981 agttttcgtt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc  
 5041 ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtg  
 5101 tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag  
 5161 cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact  
 5221 ctgtagcacc gcctacatac ctgcctctgc taatcctgth accagtggct gctgccagtg  
 5281 gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc  
 5341 ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg  
 5401 aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcggccac gcttcccga gggagaaagg  
 5461 cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag  
 5521 ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc  
 5581 gattttttgtg atgctcgtca gggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct  
 5641 ttttacggtt cctggcctth tgctggcctt ttgctcacat ggctcgcagc atct

pPAL-LACK (SEC ID N°: 23)

1 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta  
 61 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc  
 121 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg  
 181 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc  
 241 gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat  
 301 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc  
 361 ccaacttgga gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc ccccctattg acgtcaatga  
 421 cggtaaattg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg  
 481 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac  
 541 caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt  
 601 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgta gtaacaactg  
 661 cgatcgcccg ccccgttgac gcaaatgggc gtagggcgtg tacgggtgga ggtctatata  
 721 agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac  
 781 agttaaattg ctaacgcagt cagtgttctt gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt  
 841 gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggg actgggcagg taagtatcaa  
 901 ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact  
 961 cttgcgtttc tgataggcac ctattgggtc tactgacatc cactttgcct ttctctccac  
 1021 aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggttag agtact**taat acgactcact**  
 1081 **ataggctagc ctcgagaatt caccatgaac tacgagggtc acctgaaggg ccaccgcgga**  
 1141 tggtgcacct ccctggcctg ccgcgagcag gcggggctgt acatcaaggg ggtgtcgacg  
 1201 tcgcgctgatg gcacggccat ctctgtgaaa gccaaacccg accgccacag cgtggacagc  
 1261 gactacggtc tgccgagcca ccgcctcgag ggccacaccg gcttcgtgtc gtgtgtgtcg  
 1321 ctggcccacg ccaccgacta cgcgctgacc gcgtcctggg accgctccat ccgcatgtgg  
 1381 gacctgcca atggccagtg ccagcgcaag ttctgaagc acaccaagga cgtgctcgcc  
 1441 gtgccttct cgccggacga ccgcctgatc gtgtccgagg gccgcgacaa cgtgatccgc  
 1501 gtgtggaacg tggcgggcca gtgcatgcac gattcctgc gcgacggcca cagggactgg  
 1561 gtgagcagca tctgtttctc gccgtcgctg gagcatccga tcgtggtgtc cggcagctgg  
 1621 gacaacacca tcaaggtatg gaacgtgaac gggggcaagt gtgagcgcac gctcaagggc  
 1681 cacagcaact acgtgtccac ggtgacgggtg tcgccagacg ggtcgtgtgt cgcgtccggc  
 1741 ggcaaggacg gcgcggcgtc gctgtgggac ctgagcaccg gcgagcagct gttcaagatc  
 1801 aacgtggagt cgcccatcaa ccagatcgcc ttctcgcca accgcttctg gatgtgcgtc  
 1861 gcgacggaga ggtctctgtc cgtgtacgac ctggagagca aggctgtgat tgcggagctg  
 1921 acgccggacg gcgcgaagcc gtccgagtgc atctccattg cctggtccgc cgacggcaac  
 1981 actctgtact ccggtcacaa ggacaacctg atccgcgtgt ggtccatctc cgacgccgag  
 2041 taactagagt cgacccgggc ggccgcttcc ctttagtgag ggttaatgct tcgagcagac  
 2101 atgataagat acattgatga gtttgacaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc  
 2161 tttattttgtg aaattttgtg tgcatttgc tttattgtaa ccattataag ctgcaataaa  
 2221 caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag  
 2281 gttttttaaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa tccgataagg atcgatccgg  
 2341 gctggcgtaa tagcgaagag gccgcaccg atcgccttc ccaacagttg cgcagcctga

ES 2 747 748 T3

2401 atggcgaatg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg  
 2461 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgt**taa ttaa**GTGCTG GAGAATATTC GGCAAGGTCT  
 2521 GAACCGTCCC AGCCATCGCC ATGAAAGGGT TAGGGGCTGT ATGAGCCTGT TTGTTGCTGG  
 2581 GGTAACAATA TTTGCACAAT ACGGTCCCCT CGCCCCTCTG GGGAGAGGGT TAGGGTGAGG  
 2641 GGAAAAGCGC CCCCCCTGCC GCAGCCTGCT CCGGTCGGAC CTGGCAACTA TAGCTACTCA  
 2701 CAGCCAGGTT GATTATAATA ACCGTTTATC TGTTCGTACT GTTACTAAA ACGACGAATC  
 2761 GCCTGATTTT CAGGCACAAC AAGCATCAAC AATAAGGATT AAAGCTatgg gttttctttc  
 2821 cggtaagcgc attctggtaa ccggtgttgc cagcaacta tccatgcct acggtatcgc  
 2881 tcaggcgatg caccgcgaag gagctgaact ggcattcacc taccagaacg acaaactgaa  
 2941 aggccgcgta gaagaatttg ccgctcaatt gggttctgac atcgttctgc agtgcgatgt  
 3001 tgcagaagat gccagcatcg acaccatggt cgctgaaactg gggaaagtgt ggccgaaatt  
 3061 tgacggtttc gtacactcta ttggttttgc acctggcgat cagctggatg gtgactatgt  
 3121 taacgccgtt acccgtgaag gcttcaaaat tgcccacgac atcagctcct acagcttcgt  
 3181 tgcaatggca aaagcttgcc gctccatgct gaatccgggt tctgccctgc tgaccctttc  
 3241 ctaccttggc gctgagcgcg ctatcccga ctacaacgtt atgggtctgg caaaagcgtc  
 3301 tctggaagcg aacgtgctct atatggcgaa cgcgatgggt ccggaagggt tgcgtgttaa  
 3361 cgccatctct gctggtccga tccgtactct ggcggcttcc ggtatcaaag acttccgcaa  
 3421 aatgctggct cattgcgaag ccgttacccc gattcggcgt accgttacta ttgaagatgt  
 3481 gggtaactct gggcattcc tgtgctccga tctctctgcc ggtatctccg gtgaagtagt  
 3541 ccacgttgac ggcggtttca gcatcgctgc aatgaacgaa ctcgaactga aataa**ttaat**  
 3601 **taa**accgcgta tggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgatagt taagccagcc  
 3661 ccgacaccg ccaacaccg ctgacgcgc ctgacgggt tgtctgctcc cggcatccgc  
 3721 ttacagaaa gctgtgaccg tctccgggag ctcatgtgtc agaggttttc acaagttgca  
 3781 ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc  
 3841 ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcaactgggc cagatggtaa gccctccgct  
 3901 atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc  
 3961 gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat  
 4021 atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt  
 4081 tttgataatc tcatgaccaa aatcccttaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac  
 4141 ccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgcgt aatctgctgc  
 4201 ttgcaaacia aaaaaccacc gctaccagcg gtggtttgtt tgccggatca agagctacca  
 4261 actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta  
 4321 gtgtagccgt agttaggcca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgtc  
 4381 ctgctaatac tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtctgtct taccgggttg  
 4441 gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggctcg gctgaacggg gggttcgtgc  
 4501 acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatactaca gcgtgagcta  
 4561 tgagaaaagc ccacgcttc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg  
 4621 gtcggaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt  
 4681 cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg  
 4741 cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac gtttctggc cttttgctgg

4801 ccttttgctc acatggctcg acagatct

**pPAL (SEC ID N°: 24)**

1 tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta  
61 ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc  
121 aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg  
181 gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc  
241 gcctggctga ccgcccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat  
301 agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc  
361 ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtccg cccctattg acgtcaatga  
421 cggtaaattg cccgcctggc attatgcca gtacatgacc ttacgggact ttctacttg  
481 gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac  
541 caatgggctg ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt  
601 caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg  
661 cgatcggccg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtgga ggtctatata  
721 agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggt agtttatcac  
781 agttaaattg ctaacgcagt cagtgttct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt  
841 gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa  
901 ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact  
961 cttgcgtttc tgataggcac ctattgttct tactgacatc cactttgcct ttctctccac  
1021 aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtact**taat acgactcact**  
1081 **ataggctagc ctcgagaatt cacgcgtggt acctctagag tcgaccggg cggccgcttc**  
1141 ccttttagtga gggttaatgc ttcgagcaga catgataaga tacattgatg agtttggaca  
1201 aaccacaact agaatgcagt gaaaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc  
1261 tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt  
1321 tatgtttcag gttcaggggg agatgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctacia  
1381 atgtggtaaa atccgataag gatcgatccg ggctggcgta atagcgaaga ggcccgcacc  
1441 gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggacgcgcc tgtagcggcg  
1501 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgtacactt gccagcgt**ta**  
1561 **atta**AGTGCT GGAGAATATT CGGCAAGGTC TGAACCGTCC CAGCCATCGC CATGAAAGGG  
1621 TTAGGGGCTG TATGAGCCTG TTTGTTGCTG GGGTAACAAT ATTTGCACAA TACGGTCCCC  
1681 TCGCCCCTCT GGGGAGAGGG TTAGGGTGAG GGGAAAAGCG CCCCCCTGC CGCAGCCTGC  
1741 TCCGGTCGGA CCTGGCAACT ATAGCTACTC ACAGCCAGGT TGATTATAAT AACCGTTTAT  
1801 CTGTTCGTAC TGTTTACTAA AACGACGAAT CGCCTGATTT TCAGGCACAA CAAGCATCAA  
1861 CAATAAGGAT TAAAGCTatg ggttttcttt ccgtaagcg cattctggta accggtgtg  
1921 ccagcaaaact atccatcgcc tacggtatcg ctcagggcgat gcaccgcgaa ggagctgaac  
1981 tggcattcac ctaccagaac gacaaaactga aaggccgcgt agaagaattt gccgctcaat  
2041 tgggttctga catcgttctg cagtgcgatg ttgcagaaga tgccagcatc gacaccatgt  
5 2101 tcgctgaact ggggaaagt tggccgaaat ttgacggttt cgtacactct attggtttg

2161 cacctggcga tcagctggat ggtgactatg ttaacgccgt taccctgtaa ggcttcaaaa  
 2221 ttgcccacga catcagctcc tacagcttcg ttgcaatggc aaaagcttgc cgctccatgc  
 2281 tgaatccggg ttctgccctg ctgacccttt cctaccttgg cgctgagcgc gctatcccga  
 2341 actacaacgt tatgggtctg gcaaaagcgt ctctggaagc gaacgtgcmc tatatggcga  
 2401 acgcgatggg tccggaaggt gtgcgtgtta acgccatctc tgctgggtccg atccgtactc  
 2461 tggcggcttc cggtatcaaa gacttccgca aaatgctggc tcattgcmga gccgttacc  
 2521 cgattcgcgc taccgttact attgaagatg tgggtaactc tgccggcattc ctgtgctccg  
 2581 atctctctgc cggtatctcc ggtgaagtag tccacgttga cggcgggttc agcatcgcctg  
 2641 caatgaacga actcgaactg aaataa**ttaa** **tta**accgcgt atgggtgact ctcagtacaa  
 2701 tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacacc gccaacacc gctgacgcgc  
 2761 cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga  
 2821 gctcatgtgt cagaggtttt cacaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc  
 2881 tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtgagcgt gggctctcgc gtatcattgc  
 2941 agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca  
 3001 ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca  
 3061 ttggtaactg tcagaccaag ttactcata tatactttag attgatntaa aacttcattt  
 3121 ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta  
 3181 acgtgagttt tcggtccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg  
 3241 agatcccttt tttctgcmc taatctgctg cttgcaaca aaaaaaccac cgctaccagc  
 3301 ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag  
 3361 cagagcmcag ataccaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa  
 3421 gaactctgta gcaccgcta catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggtgctgc  
 3481 cagtggcgat aagtcgtgct ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc  
 3541 gcagcggctc ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacct  
 3601 caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag  
 3661 aaaggcmcag aggtatccgg taagcmcag ggtcmcgaaca ggagagcmcga cmagggagct  
 3721 tccaggggga aacgcctggt atctttatag tctgtcggg tttcgcacc tctgacttga  
 3781 gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc  
 3841 ggccttttta cggttcctgg ccttttgcct gccttttgcct cacatggctc gacagatct

Se entenderá que realizaciones particulares descritas en los ejemplos se muestran a modo de ilustración y no como limitaciones de la invención.

5 Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la memoria descriptiva son indicativas del nivel de experiencia de aquellos expertos en la materia a la que se refiere la presente invención.

10 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, métodos convencionales de virología, microbiología, biología molecular y técnicas de ADN recombinante dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Current Edition); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., Current Edition); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., Current Edition); CRC Handbook of Parvoviruses, vol. I & II (P. Tijessen, ed.); Fundamental Virology, 2nd Edition, vol. I & II (B. N. Fields and D. M. Knipe, eds.).

El uso de la palabra "un" o "una" puede significar "uno", pero también está de acuerdo con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

En toda la presente solicitud, el término “aproximadamente” significa el valor indicado  $\pm 5\%$  de su valor, preferentemente el valor indicado  $\pm 2\%$  de su valor, lo más preferentemente el término “aproximadamente” significa exactamente el valor indicado ( $\pm 0\%$ ).

5

## Ejemplos

### Ejemplo 1.- Material y métodos

#### 10 1. Generación del vector pPAL-LACK

##### 1.1. Obtención del gen *fab I* y su promotor a partir de ADN genómico de *E. coli* por PCR

###### Extracción de ADN genómico de *E. coli*

15

A partir de un cultivo de colonias de *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) (New England Biolabs, genotipo fhuA2[lon] ompT gal ( $\lambda$  DE3) [dcm]  $\Delta$ hdsS; características principales: deficiente en proteasas Lon y ompT, resistente al fago T1) en un matraz en 10 ml de Luria Bertani (LB) a 37 °C mantenido con agitación durante la noche (150 rpm) y a una densidad óptica (DO) de 0,1 (a 550 nm), se aumentó a un volumen total de 25 ml. Se dejó crecer a una DO de 0,5 (a 550 nm) y se recogió por centrifugación a 15.000 g 5' a temperatura ambiente. El sedimento de células se lavó con 50 ml de tampón TES (NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM a pH =8,0, EDTA 5 mM), se centrifugó de nuevo y se resuspendió en 100  $\mu$ l de tampón de lisis (25 % de sacarosa, 40  $\mu$ g/ml de RNasa A, 1 mg/ml de lisozima, NaCl 0,1 M, TrisHCl 50 mM a pH =8,0, EDTA 10 mM). La lisis se dejó durante un máximo de 20 minutos y a continuación se añadieron 100  $\mu$ l de 2 % de SDS. Se mezcló por vórtex durante 3 minutos y se congeló y se descongeló cuatro veces rápidamente en nitrógeno líquido. Posteriormente, se añadió proteinasa K a una concentración final de 10  $\mu$ g/ml y se incubó durante 30 minutos a 30 °C. Después de este tiempo se llevó a cabo la fenolización. Primero, la mezcla anterior se llevó a un volumen de 500  $\mu$ l añadiendo la cantidad necesaria de agua milliQ. A continuación, se añadió 1 volumen de una mezcla 25:24:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se emulsionó por agitación vigorosa durante 20". Se centrifugó a 15.000 g durante 5' a temperatura ambiente y la fase acuosa (superior) se recuperó cuidadosamente extrayendo lentamente del menisco para evitar la contaminación con el contenido de la interfase. A continuación, se añadió 1 volumen de 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico a la fase acuosa recuperada y las fases se re-emulsionaron y se separaron como se ha descrito. Finalmente, se llevó a cabo la precipitación de ADN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C. La muestra se dejó precipitar a -20 °C durante al menos 30'. A continuación, se centrifugó a 15.000 g a 4 °C durante 20', el sobrenadante se desechó cuidadosamente, el lavado se realizó con 500  $\mu$ l de etanol al 70 % y el sedimento se dejó secar al aire a temperatura ambiente después de desechar el sobrenadante. Para terminar, el sedimento se resuspendió en 350  $\mu$ l de tampón TE (Tris-HCl a pH = 8,0, EDTA).

40

###### Amplificación del gen *fab I* y su promotor por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se diseñaron cebadores de oligonucleótidos para la amplificación de un promotor del gen *fab I* seguido de dicho gen de ADN genómico de la cepa BL21 de *E. coli*. Dichos oligonucleótidos contienen la diana de la endonucleasa de restricción *Pac I* en la posición 5 min, además de cualquier secuencia de nucleótidos corta para permitir la catálisis de enzimas, ya que necesita un sustrato mínimo sobre el que hacer el corte. Teniendo en cuenta estos requisitos, los cebadores que se obtuvieron fueron los siguientes:

45

SEC ID N°: 8 (*PacI-fabl-promotor-Fw*): 5'TACTGGATTAATTAAGTGCTGGAGAATATTCG 3'

SEC ID N°: 9 (*PacI-fabl-Rv*): 5' TACTGGATTAATTAATTATTTTCAGTTTCGAGTTTCGTTTC 3'

50

Con el fin de llevar a cabo la reacción, primero, lo siguiente se mezcló a 4 °C en este orden: agua milliQ necesaria para completar el volumen final de la reacción (25  $\mu$ l), ADN genómico de BL21 de *E. coli* a 0,2 ng/ $\mu$ l, tampón HiFi (KAPA Biosystems) a 1x (concentración inicial  $i_c$ - 5x), mezcla de dNTP (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Invitrogen) a 0,3 mM cada uno ( $i_c$  = 10 mM cada uno), *PacI-fabl-promotor-cebador Fw* 0,3  $\mu$ M y *PacI-fabl-cebador Rv* 0,3  $\mu$ M. Todos estos reactivos se almacenaron a -20 °C. A continuación, la reacción de amplificación se realizó con el siguiente perfil de ciclado térmico programado en el ciclador térmico Verity (*Applied Biosystems*): 95 °C, 5'; 25 x [98 °C, 20"; 48 °C, 15"; 72 °C, 30"]; 72 °C 5'. La reacción se realizó por octuplicado.

55

###### Verificación del producto de PCR por electroforesis en gel de agarosa

60

Con el fin de analizar los resultados de la reacción de amplificación previa, 1  $\mu$ l de producto de PCR (4 % del total) se mezcló con 4  $\mu$ l de agua milliQ y 1  $\mu$ l de tampón de carga para ADN (30 % v/v de glicerol, EDTA 10 mM a pH 8,0, 0,1 % v/v de xilenocianol, 0,1 % v/v de azul de bromofenol en agua). Por otra parte, se preparó un 1 % en peso/volumen de gel de agarosa (Pronadisa) en 1X tampón TAE (diluído a partir de 50X TAE: base Tris 2 M, 5,7 % v/v de ácido acético glacial y EDTA 50 mM a pH 8,0) añadiendo el colorante Gel Red (concentración inicial 10.000X) (Biotium) y las muestras se separaron electroforéticamente en un sistema *Mini-SubCell* GT (BioRad) aplicando una

65

corriente de 5 V/cm con una fuente de alimentación *Power Pac Basic Power Supply* (BioRad) durante 75 min. Se usó marcador de peso molecular de 1 kb (NEB) como marcador de tamaño. El resultado se visualizó usando un sistema de lámpara de UV *Gel Doc XR* (BioRad) con el software *Quantity One* (BioRad).

## 5 Purificación del producto de PCR

Una vez se comprobó la eficacia de la amplificación, se mezclaron los volúmenes restantes (96 %) de los diversos tubos en los que se llevó a cabo la reacción que tuvieron un resultado positivo y, a continuación, el ADN se purificó usando el siguiente procedimiento de extracción con disolventes orgánicos.

10 Primero, la mezcla previa se llevó a un volumen de 500  $\mu$ l añadiendo la cantidad necesaria de agua milliQ. A continuación, se añadió 1 volumen de una mezcla 25:24:1 de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se emulsionó por agitación vigorosa durante 20". Se centrifugó a 15.000 g durante 5' a temperatura ambiente y la fase acuosa (superior) se recuperó cuidadosamente extrayendo lentamente del menisco para evitar la contaminación con el contenido de la interfase. A continuación, se añadió 1 volumen de 24:1 de cloroformo:alcohol isoamílico a la fase acuosa recuperada y las fases se re-emulsionaron y se separaron como se ha descrito. Finalmente, se llevó a cabo la precipitación de ADN añadiendo 0,1 volúmenes de acetato sódico 3 M a pH 5,2 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto previamente enfriado a -20 °C. La muestra se dejó precipitar a -20 °C durante al menos 30'. A continuación, se centrifugó a 15.000 g a 4 °C durante 20', el sobrenadante se desechó cuidadosamente, el lavado se realizó con 20 500  $\mu$ l de 70 % de etanol y el sedimento se dejó secar al aire a temperatura ambiente después de desechar el sobrenadante. Para terminar, el sedimento se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua milliQ.

Después de cuantificar el producto de PCR purificado por espectrofotometría de absorción UV, que significó pérdida adicional del 4,8 % de él, se llevó a cabo la digestión con la enzima *Pac I*.

## 25 Digestión del inserto con la enzima *Pac I*

Se mezcló la mitad del volumen disponible del producto de PCR purificado (inserto) a una concentración final de 24 ng/ $\mu$ l con lo siguiente y en este orden: agua necesaria para completar el volumen final (total de 20  $\mu$ l), tampón NEB1 a 1X (concentración inicial 10X) (NEB), 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA; concentración inicial, 10 mg/ml) (NEB) y *Pac I* 0,4 U/ $\mu$ l (concentración inicial 10 U/ $\mu$ l) (NEB). La mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C.

## Aislamiento del inserto separado por electroforesis en gel de agarosa y purificación del producto del gel

35 Se realizó electroforesis sobre 1 % de gel de agarosa como se ha descrito anteriormente del volumen entero de producto PCR purificado que posteriormente se digirió con *Pac I* con el fin de comprobar su integridad y purificarlo de nuevo después de la digestión. Para el último fin, una vez terminó la electroforesis, el gel se visualizó y el fragmento de agarosa que contenía la banda correspondiente al producto de PCR se cortó con un bisturí. A continuación, dicho fragmento de agarosa se pesó y el ADN se purificó usando el kit de extracción en gel *QiaQuick* (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, el producto resultante se concentró secando y depositando el ADN en una centrifuga a vacío *Speed Vac (Savant)* y resuspendiéndolo a continuación en un volumen de 11  $\mu$ l.

## 45 **1.2. Preparación del vector pPAL-LACK a partir de pCI-neo-LACK**

### 1.2.1. Purificación de la vacuna recombinante pCI-neo-LACK

Con el fin de obtener plásmido recombinante pCI-neo-LACK, el clon de *E. coli* de la cepa XL10 que lo contenía (Ramiro, M. J., *et al.*, Vaccine 2003, 21(19-20): 2474-84, obtenido del plásmido pCIneo (Promega, GenBank: U47120) se cultivó en medio líquido LB (triptona-peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l; esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 min a 1,05 kg/cm<sup>2</sup>) con ampicilina a 100  $\mu$ g/ml a 37 °C durante 16 h. A continuación, dicho plásmido se purificó por el método de preparación a pequeña escala o *miniprep* con el kit de aislamiento de plásmido *High Pure* (Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 55 1.2.2. Preparación del vector pCI-bla-LACK: eliminación del gen *npt* de pCI-neo-LACK por PCR

Con el fin de excluir el gen *npt* de pCI-neo-LACK (Figura 1), y a su vez amplificar el fragmento de interés, se usó de nuevo PCR. Dicho fragmento de interés se designó pCibla-LACK, que actúa de vector en el proceso de clonación, ya que incluye el origen de replicación. El gen *bla* no se eliminó en esta etapa debido a que el proceso se presentó en dos etapas para garantizar la viabilidad del proceso. Así, en la primera etapa el gen *bla* se usaría como sistema de selección para introducir el gen *fab I* con su promotor, y en la segunda etapa el gen *bla* se eliminaría, usando el gen *fab I* como sistema de selección, evitando así usar el que se estaba siendo introducido como sistema de selección.

65 La amplificación del fragmento pCibla-LACK se llevó a cabo con los siguientes cebadores, que excluyen la

secuencia del gen *npt*, pero no la de *bla* y su promotor:

SEC ID N°: 10 (*PacI-pCbla-1*): 5' TACTGGATTAATTAACCGCGTATGGTGCACTCTCA 3'  
 SEC ID N°: 11 (*PacI-pCbla-2*): 5' TACTGGATTAATTAACGCTGGCAAGTGTAGCGGT 3'

5 Las condiciones de la reacción de amplificación fueron como se han descrito en la Sección 1.1., con las siguientes excepciones: se usaron los cebadores descritos anteriormente, el plásmido purificado como se ha descrito en la Sección 1.2.1. a una concentración final de 40 pg/μl, temperatura de hibridación 60 °C en lugar de 48 °C y tiempo de extensión a 72 °C de 2' en lugar de 3".

10 Se llevaron a cabo el análisis y la purificación del producto de PCR del vector pCbla-LACK como se ha detallado en la Sección 1.1. Se realizó la digestión del producto de PCR restante (91,2 %) y la purificación del producto de PCR bajo las mismas condiciones descritas en la Sección 1.1., pero en un volumen final de 100 μl con una concentración de enzima *Pac I* de 0,8 U/μl.

15 Reacción de ligación del inserto (gen *fabI* y su promotor) con el vector pCI-*bla*-LACK para obtener pCI-*bla*-LACK-*fabI*

El inserto (gen *fabI* y su promotor) tiene la siguiente secuencia (SEC ID N°: 21):

1 gtgctggaga atattcggca aggtctgaac cgtcccagcc atcgccatga aagggttagg  
 61 ggctgtatga gcctgtttgt tgctggggta acaatatttg cacaatacgg tcccctcgcc  
 121 cctctgggga gagggtagg gtgaggggaa aagcgcccc cctgcccag cctgctccgg  
 181 tcggacctgg caactatagc tactcacagc caggttgatt ataataaccg tttatctggt  
 241 cgtactgttt actaaaacga cgaatcgct gattttcagg cacaacaagc atcaacaata  
 301 aggattaaag ctatggggtt tctttccggt aagcgcattc tggtaaccgg tgttgccage  
 361 aaactatcca tcgctacgg tatcgctcag gcgatgcacc gcgaaggagc tgaactggca  
 421 ttcacctacc agaacgacaa actgaaaggc cgcgtagaag aatttgccgc tcaattgggt  
 481 tctgacatcg ttctgcagtg cgatggtgca gaagatgcca gcatcgacac catgttcgct  
 541 gaactgggga aagtttgcc gaaatttgac ggtttcgtac actctattgg ttttgcacct  
 601 ggcgatcagc tggatggtga ctatgttaac gccggtacc gtgaaggctt caaaattgcc  
 661 cacgacatca gtcctacag cttcggtgca atggcaaaag cttgccgctc catgctgaat  
 20 721 ccgggttctg cctgctgac ctttccctac cttggcgctg agcgcgctat cccgaactac

## ES 2 747 748 T3

```
781 aacggttatgg gtctggcaaa agcgtctctg gaagcgaacg tgcgctatat ggccaacgcg
841 atgggtccgg aaggtgtgcg tgtaaacgcc atctctgctg gtccgatccg tactctggcg
901 gcttccggta tcaaagactt ccgcaaaatg ctgggtcatt gcgaagccgt taccgccatt
961 cgccgtaccg ttactattga agatgtgggt aactctgctg cattcctgtg ctccgatctc
1021 tctgccggta tctccgggta agtagtccac gttgacggcg gtttcagcat cgctgcaatg
1081 aacgaactcg aactgaaata a
```

Antes de continuar con la reacción de ligación, el inserto y el vector se dializaron usando filtros (*Millipore*). A continuación, la cuantificación de 1 µl de inserto y vector se realizó por densitometría después de realizar la separación electroforética correspondiente sobre 1 % de gel de agarosa como se ha descrito en la Sección 1.1. Para este fin, después de obtener la imagen del gel en el sistema *Gel DocXR* (BioRad), la cantidad cargada total se calculó usando el software *Quantity One* (BioRad) usando las bandas resultantes de la separación electroforética del marcador de tamaño y de peso molecular *1Kb Molecular Weight Marker* (NEB) como patrones. De este modo, el inserto y el vector se cuantificaron simultáneamente.

Con el fin de realizar la reacción de ligación, primero, la siguiente mezcla se realizó en un volumen final de 15 µl en el siguiente orden: agua milliQ necesaria para completar el volumen final, 13,3 ng/µl de inserto digerido y purificado (gen *fab I* y su promotor), vector digerido y purificado (pCI-bla-LACK), tampón ADN ligasa T4 a 1x (concentración inicial 10x) (NEB) y 26,7 U *Weiss*/µl de ADN ligasa T4 (concentración inicial 400 U *Weiss*/µl) (NEB). La cantidad de vector añadido se define por una relación equimolar de inserto:vector de 5:1. Por tanto, su cálculo se realiza usando la siguiente expresión:

$$\text{ng de vector} = \frac{\text{ng de inserto} \cdot \text{pb de vector}}{5 \cdot \text{pb de inserto}}$$

Una vez se preparó la mezcla de reacción, se incubó a 16 °C durante 16 h.

El gen LACK se clonó en las dianas Xba I y EcoR I (de ahí que hayan eliminado la diana para Mlu I, localizada entre los dos en el MCS del plásmido pCIneo).

### Preparación de bacterias electrocompetentes y transformación por electroporación

Para la preparación de bacterias electrocompetentes se empieza a partir de un precultivo en placa de una colonia de DH5α de *E. coli* en 20 ml de LB a 37 °C mantenida con agitación durante la noche (150 rpm). Se aumenta a un cultivo de 600 ml a 37 °C y se deja cultivar a una DO de 0,5-0,7 (a 550 nm). Posteriormente, el cultivo se mantiene sobre hielo durante 30 minutos y se centrifuga durante 10 minutos a 4.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se elimina y se seca bien con un capilar. Posteriormente se resuspende en 25 ml de HEPES 1 mM a pH =7 frío (también puede resuspenderse en agua milliQ). El lavado se repite dos veces adicionales y después de la última centrifugación el sobrenadante se desecha y se resuspende en un total de 24 ml de glicerol al 10 %.

Con el fin de realizar la transformación por electroporación, una alícuota de 20 ml de bacterias electrocompetentes se mezcló inicialmente a 4 °C con 2 ml (100 ng-200 ng) de ADN y se recogió en una cubeta de electroporación estéril con una separación de 1 mm entre electrodos (*Cell Projects*) enfriada a 4 °C. Con el fin de ser capaz de aplicar todo el ADN disponible en un pequeño volumen tal, su precipitación se realizó previamente como se ha descrito en la Sección 2.1.4. De este modo se lograría prevenir la sobrecarga cuando se aplica el pulso eléctrico. Se aplicó un pulso de 1,8 kV durante 5,4-5,8 ms en un electroporador *Micropulser TM* (Bio-Rad), se añadió rápidamente 1 ml de medio SOC (triptona-peptona 2 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM; esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 min a 1,05 kg/cm<sup>2</sup>) y se incubó a 37 °C durante una hora con agitación orbital a 220 rpm. Finalmente, las células se sembraron en placa sobre LB-agar (medio LB con 15 g/l de agar; esterilizado en autoclave a 120 °C durante 20 min a 1,05 kg/cm<sup>2</sup>) con 100 mg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C durante 16 h. La mezcla restante se almacenó a -80 °C, habiéndose añadido previamente 20 % de glicerol estéril.

### Selección de clones recombinantes pCI-bla-fabI-LACK

Con el fin de seleccionar clones que contienen insertos *fab I*, se cogieron aleatoriamente 20 colonias y se propagaron en medio de cultivo líquido LB en presencia de ampicilina 100 mg/ml. A continuación, los plásmidos

correspondientes se purificaron siguiendo el procedimiento descrito en 2.1.7. y ambas alícuotas se analizaron por electroforesis en gel de agarosa como se ha descrito en la Sección 2.1.3. Solo aquellos clones que fueron positivos se seleccionaron para ser secuenciados usando los cebadores descritos en la Sección 2.1.2. Por tanto, la presencia o ausencia del inserto *fab I* se analizó por el método de secuenciación de Sanger. Para este fin, los plásmidos y cebadores se enviaron al servicio de secuenciación de ADN *Secugen*, en el Centro de Investigación Biológica. La secuencia de pCI-bla-fabl-LACK obtenida se proporciona como SEC ID N°: 22.

### 1.2.3. Eliminación del gen *bla* de pCI-bla-fabl-LACK (SEC ID N°: 22) obteniéndose la vacuna recombinante pPAL-LACK (SEC ID N°: 23)

Se seleccionó uno de los clones recombinantes pCI-bla-fabl-LACK, se propagó en cultivo y el plásmido recombinante correspondiente se purificó según el procedimiento descrito en la Sección 1.2.1. Con el fin de eliminar el gen *bla* de esta construcción, se excluyó por PCR usando cebadores adecuados, mientras que al mismo tiempo se realizó la amplificación del fragmento de interés en la reacción.

Los cebadores usados fueron los siguientes:

SEC ID N°: 12 (*BamHI-pCI-Δbla-1*): 5' GTACAGGATCCCATGTGTGTCAGAGGTTTTTCAC 3'

SEC ID N°: 13 (*BamHI-pCI-Δbla-2*): 5' GTACAGGATCCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTT 3'

La amplificación por reacción de PCR se realizó como se ha detallado en la Sección 1.2.2., con las siguientes excepciones: los cebadores y molde de ADN usados son los detallados en esta sección; la temperatura de hibridación fue 58 °C en lugar de 60 °C; y el tiempo de extensión fue 2' 30" en lugar de 2'.

Finalmente, después de llevar a cabo la purificación apropiada, como se describe en la Sección 1.2.2. para el vector, se llevó a cabo la reacción de ligación de la molécula lineal consigo misma, es decir, su recircularización, usando las condiciones descritas en la Sección 1.2.2., pero con las siguientes diferencias: solo la molécula de plásmido que va a recircularizarse está presente, con una concentración final de 32 ng/ml en un volumen de reacción final de 10 μl.

### 30 Transformación de bacterias competentes por choque térmico

Finalmente, se transformaron bacterias competentes de la cepa SURE de *E. coli* (*Agilent Technologies*) por choque térmico siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta cepa garantiza la estabilidad genética de la construcción debido a que se ha modificado genéticamente para ser negativa para las actividades de transposición y recombinación, evitando así transposiciones no deseadas entre el plásmido y el ADN cromosómico. Por este motivo se usó para mantener la construcción final que forma la vacuna recombinante libre de genes de resistencia a antibiótico pPAL-LACK.

Después de completarse el proceso, se llevó a cabo la secuenciación completa de pPAL-LACK como se describe en la Sección 1.2.2. para verificar la integridad de todos los elementos componentes usando, además de los cebadores descritos anteriormente, los siguientes:

SEC ID N°: 14 (*pCIseq1*): 5' TCAATATTGGCCATTAGCCA 3'

SEC ID N°: 15 (*106-LACK-pCIseq*): 5' CCACGAGATGGCCGTGCCATC 3'

SEC ID N°: 16 (*LACK-Fw*): 5' ATGAACTACGAGGGTCACCT 3'

SEC ID N°: 17 (*LACK-Rv*): 5' TTAAGGGATTTTGGTCATGA 3'

SEC ID N°: 18 (*pCIseq2*): 5' GTTAAGGGATTTTGGTCATGA 3'

SEC ID N°: 19 (*pCIseq3*): 5' TCATGACCAAAATCCCTTAAC 3'

SEC ID N°: 20 (*XbaI-pCIseq4*): 5' TCTAGAGTGCACCCGGGC 3'

## **2. Verificación de la expresión del gen LACK en cultivo *in vitro* de células HEK 293T**

Se cultivan células HEK 293T (ATCC CRL-3216) hasta que fueron semiconfluentes (aproximadamente 48 h) en una placa de Petri a 37 °C en presencia de 5 % de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Lonza) (suero bovino fetal inactivado por calor (HIFBS) inactivado a 56 °C durante 1 h) y penicilina 100 UI/ml de estreptomycin 100 ng/ml, siendo este el medio completo (CM). Las células adheridas se desprenden por tripsina-verseno (Lonza) inactivándolo rápidamente añadiendo medio DMEM acondicionado térmicamente a 37 °C. Las células se centrifugan a 250 g durante 10 min, se resuspenden en CM cinco veces más diluido que al principio y se siembran en placas de 12 pocillos en un volumen de 1 ml/pocillo, teniendo cada uno 1 cm de radio. Se reincuban y cuando son semi-confluentes, se lavan con medio DMEM acondicionado térmicamente a 37 °C y a continuación se incuban durante 5' con una mezcla previamente preparada del siguiente modo: para cada uno de los pocillos anteriores, se mezclan suavemente 4 ml de JetPei (*PolyPlus Transfection*) con 46 ml de una disolución estéril de NaCl 150 mM; por otra parte, se mezclan 2 mg del plásmido, en este caso pPAL-LACK y, por otra parte, pCI-neo como control negativo y pCI-neo-LACK como control positivo, con la misma disolución de NaCl hasta un volumen de 50 ml (que no supera el 10 % de volumen de disolución de ADN con respecto al total); a continuación, la primera mezcla se añade a la segunda, nunca al revés, se mezclan suavemente y se incuban a temperatura ambiente

durante 30'. Después de añadir cuidadosamente esta mezcla a las células por la pared, y después de la incubación durante 5 min a temperatura ambiente, se añade 1 ml de CM por pocillo y las células se incuban de la misma forma hasta que alcanzan la confluencia o están próximas a ella.

- 5 Para verificar que el gen LACK se ha expresado, se analizará la presencia o ausencia de la proteína por transferencia Western. Para este fin, primero se lisan las células con una disolución al 1 % de SDS en peso/volumen en 1x PBS a temperatura ambiente durante 5 min y se separan electroforéticamente en sistema de tampón discontinuo en gel de acrilamida bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE); el gel de concentración es 5 % (5 % de acrilamida-0,14 % de bisacrilamida, Tris-HCl 0,1 M a pH 8,8, 0,1 % de SDS, 0,036 % de persulfato de amonio y N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) 2,3 mM) y el gel de separación es 10 % (10 % de acrilamida-0,27 % de bisacrilamida, Tris-HCl 376 mM a pH 8,8, 0,1 % de SDS, 0,034 % de persulfato de amonio y TEMED 5 mM). Las muestras se aplicaron al gel en tampón de carga (Tris-HCl 50 mM a pH 6,8, DTT 100 mM, 2 % de SDS, 0,1 % de azul de bromofenol) y entonces se realizó SDS-PAGE en tampón de electroforesis (Tris-base 20 mM, glicina 67 mM, 0,1 % de SDS) a 12 mA durante 30 min y luego a 120 V a 30 mA durante aproximadamente 2 h en una celda *MiniProtean® II* (BioRad). La electroforesis se realizó por duplicado: i) se tiñó un gel con azul de Coomassie para visualizar los extractos de proteína total y ii) el otro gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa.

- 20 Para llevar a cabo la transferencia de las proteínas del gel a la membrana (*Hybond™-C pure Amersham Life Science*), dos estropajos, dos papeles 3M (6x9 cm) y una membrana de nitrocelulosa se sumergen en tampón de transferencia (0,3 % de Tris-base, 1,44 % de glicina, 20 % de metanol). Posteriormente se colocan en un recipiente y en este orden: estropajo, papel 3M, gel, membrana de nitrocelulosa, papel 3M y estropajo, de manera que cuando se cierre el recipiente se coloca sobre la bandeja de transferencia hacia el polo negro (polo negativo), permitiendo así la transferencia de proteínas del gel a la membrana. El recipiente se coloca sobre la bandeja de transferencia con el mismo tampón en el que se han sumergido todos los elementos anteriormente mencionados, llevando a cabo la transferencia a 100 voltios durante 1 hora a 4 °C.

- 30 Una vez se ha llevado a cabo la transferencia de proteínas del gel a la membrana, se realizó transferencia Western para verificar la expresión del gen LACK. Para esto, primero se bloqueó la membrana con 5 % de leche desnatada en PBS-*Tween* durante 1 hora de agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevaron a cabo 3 lavados con PBS-*Tween*, uno rápido, uno de 15' y uno de 5'. La incubación con el anticuerpo primario (anti-LACK) se realizó inmediatamente a una dilución 1:1000 en PBS-*Tween* durante 1 hora de agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevaron a cabo 2 lavados de la misma forma ya tratada y la incubación con el anticuerpo secundario (de cabra anti-conejo marcado con peroxidasa) se llevó a cabo a una dilución 1:2000 en PBS-*Tween*. Posteriormente, se llevaron a cabo los mismos lavados y la membrana se reveló para el análisis de la presencia o ausencia de expresión de la proteína LACK.

### 3. Evaluación de los niveles de protección de pPAL-LACK contra infección experimental con *Leishmania infantum*

#### 40 3.1. **Animales de experimentación**

- Un total de 18 perros Beagle formaron parte del estudio, alojados en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. El mantenimiento del bienestar animal y la salud de los mismos se garantizó por veterinarios cualificados según la actual legislación española (RD1201/05). Se llevaron a cabo procedimientos de observación clínica por veterinarios cualificados según RD1201/05. El alojamiento, manipulación y alimentación de los animales tuvo lugar según los requisitos etológicos del animal usado en la investigación. Los procedimientos de manipulación y la frecuencia de muestreo se diseñaron para minimizar la tensión y los riesgos de salud de individuos, según la legislación europea (86/609) y la legislación española (R.D. 223/1988. R.D. 1021/2005) y las actuales pautas para el uso ético de animales en investigación.

- 50 La ausencia de anticuerpos para *Leishmania* se confirmó por ensayos indirectos de inmunofluorescencia (IFI) y todos ellos se desparasitaron y recibieron vacunas rutinarias contra la leptospirosis, moquillo, adenovirus-2, hepatitis, paragripe y parvovirus.

#### 55 3.2. **Preparación de inóculo infeccioso e infección experimental**

##### 3.2.1. Preparación de inóculo infeccioso

##### Origen del material infeccioso

- 60 Se usará un perro polisintomático, naturalmente infectado y que no ha recibido ningún tratamiento. Una vez sacrificado, siguiendo los patrones del comité ético para experimentación animal, los presentes inventores continuarán extrayendo el bazo, ganglios linfáticos poplíteos, fémur y varias costillas.

##### 65 Preparación de medios de cultivo

Se usaron dos tipos de medio de cultivo:

- Medio bifásico NNN (agar de sangre de conejo), según el método tradicional
- Medio líquido RPMI 1640 (con L-glutamina y NaHCO<sub>3</sub> - SIGMA®), complementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS) y 2 % de hemina (SIGMA®)

A ambos medios se añadieron disolución de antibiótico de penicilina/estreptomicina (100 UI/ml y 100 µg/ml, respectivamente).

### 10 Aislamiento de cepas

Del material infeccioso (bazo, ganglios linfáticos y médula ósea), se hicieron siembras en medio NNN y se incubaron a 26-27 °C. Se monitorizaron cada 24 horas para verificar el crecimiento de promastigotes. Cuando se observó crecimiento óptimo (promastigotes alargados finos), se cultivaron de nuevo en medio RPMI 1640 (descrito anteriormente). Cuando se obtuvo la cantidad suficiente y necesaria de promastigotes metacíclicos, se lavaron 3 veces en solución salina (SS) estéril y se contaron para establecer una disolución de 10<sup>8</sup> promastigotes/ml.

### 3.2.2. Infección experimental

20 Cada perro se inoculó intravenosamente con 1 ml de esta suspensión.

La infección experimental de todos los animales en el estudio, excepto el control negativo, se llevó a cabo con 10<sup>8</sup> promastigotes de *Leishmania infantum*. El protocolo de vacunación seguido se refleja en la Tabla 1.

	PERRO Nº	pPAL-LACK	pCIneo-LACK	MVA-LACK	INFECCIÓN
		Día -60/-45	Día -60	Día -45	Día 0
G1	1	+	-	-	10 <sup>8</sup> promastigotes
	2	+	-	-	10 <sup>8</sup> promastigotes
	3	+	-	-	10 <sup>8</sup> promastigotes
	4	+	-	-	10 <sup>8</sup> promastigotes
	5	+	-	-	10 <sup>8</sup> promastigotes
G2	6	-	+	+	10 <sup>8</sup> promastigotes
	7	-	+	+	10 <sup>8</sup> promastigotes
	8	-	+	+	10 <sup>8</sup> promastigotes
	9	-	+	+	10 <sup>8</sup> promastigotes
	10	-	+	+	10 <sup>8</sup> promastigotes
G3	11	-	-	-	-
	12	-	-	-	-
	13	-	-	-	-
G4	14	-	-	-	10 <sup>5</sup> promastigotes
	15	-	-	-	10 <sup>5</sup> promastigotes
	16	-	-	-	10 <sup>5</sup> promastigotes
	17	-	-	-	10 <sup>5</sup> promastigotes
	18	-	-	-	10 <sup>5</sup> promastigotes

25 Tabla 1. Protocolo de vacunación, e infección experimental. ufp: unidades formadoras de placa; G1 pPAL-LACK 200 mcg; G2 pCIneo-LACK 100 µg/ml + MVA-LACK (10<sup>8</sup>); G3 CONTROL NEGATIVO; G4 CONTROL POSITIVO.

30 Con el fin de evaluar la eficacia de la vacuna recombinante p-PAL-LACK, la respuesta inmunitaria contra la vacuna se evaluó en todos los animales del estudio evaluando diversos parámetros: síntomas durante la prueba (Sección 3.3 más adelante), carga de parásitos de la médula ósea por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) (Sección 3.4 más adelante), inmunidad humoral (Sección 3.5 más adelante) e inmunidad celular (Sección 3.6 más adelante).

### 3.3 Evaluación de la sintomatología

35 Se realizó monitorización clínica durante todo el experimento, en el que se evaluaron los síntomas más comunes que se producen en la leishmaniosis canina usando un sistema de "evaluación numérica de síntomas" (NES). En particular, se evaluaron los siguientes síntomas para determinar el grado de "sintomatología compatible con la leishmaniosis". Este término, como se usa en el presente documento, se refiere a un compendio de síntomas que son característicos, pero no exclusivos de leishmaniosis:

- conjuntivitis y otras lesiones oculares,

- presencia de lesiones de la piel: úlceras, descamación, alopecia, despigmentación, etc.

- presencia de linfadenopatías,

5

- membranas mucosas pálidas,

- onicogrifosis (crecimiento de las uñas abombado y anormal),

10

- atrofia muscular,

- pérdida de peso,

15

- esplenomegalia (bazo agrandado),

- hepatomegalia (hígado agrandado).

Dicho sistema de "evaluación numérica de síntomas" (NES) se usó con el fin de cuantificar tanto el número de síntomas mostrados por cada animal como la intensidad a la que se produjeron estos síntomas. En presencia de un signo clínico, un valor entre 1 y 3 se asignó dependiendo de la intensidad con la que dicho signo o síntoma se expresó, o 0 en caso de ausencia del mismo. Así, NES era el nombre de la suma de los valores asignados a los síntomas analizados.

20

### 3.4 **Determinación de la carga de parásitos de médula ósea por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

25

La carga de parásitos en la médula ósea se evaluó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real en todos los animales del estudio durante todo el experimento. Para este fin, se extrajo una muestra de médula ósea y se recogió en tubos que contenían EDTA para la preservación de las muestras y se mantuvieron a 4 °C hasta que se procesaron adicionalmente.

30

#### 3.4.1. Extracción de ADN genómico de médula ósea: Kit de tejido *NucleoSpin 96* (Macherey-Nagel/Cultek)

i. Se prepararon 20 mg de tejido en placas de pocillos redondos, *Round-well Block*.

35

ii. Se preparó una disolución de 25 µl de proteinasa K (proporcionada en el kit) con 180 de tampón T1 por muestra y se dispensaron 200 µl de esta mezcla en el bloque de la etapa i.

iii. El bloque se cerró con tiras de tapas y se agitó vigorosamente durante 10-15 s.

40

iv. El bloque que contenía las muestras se incubó a 56 °C durante 10 min o hasta que se indicó que las muestras se habían lisado apropiadamente y se mezclaron regularmente durante esta etapa. Se colocó un peso sobre la tapa para prevenir que se abriera debido a la presión del gas.

45

v. Si fuera necesario, se eliminaron residuos sólidos por centrifugación durante 2 min a 5.600 g y entonces el sobrenadante se transfirió a un nuevo bloque, *Round-well Block*.

vi. A partir de aquí, se llevaron a cabo las etapas iii a xi del procedimiento 1.1., con las siguientes diferencias:

50

- Se usó una placa de unión de tejido *NucleoSpin*.

- Se realizó un lavado con tampón *BW* y otro con tampón *B5*.

55

- La elución se llevó a cabo en 100 µl de tampón *BE* precalentado a 70 °C incubando durante 1 min a temperatura ambiente y centrifugando durante 2 min a 5.600 g.

#### 3.4.2. Preparación de patrones internos y externos

i. Se cultivaron promastigotes de *L. infantum* en medio RPMI complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado y 100 µg/ml de estreptomicina-100 UI/ml de penicilina.

60

ii. Una vez alcanzaron la fase estacionaria, se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min, se lavaron tres veces con PBS y se resuspendieron en PBS.

65

iii. Se purificó ADN usando el kit de sangre *NucleoSpin* en tubos separados. Para hacer esto, se usaron 200 µl de

sedimento resuspendido en PBS (etapa ii) y se siguieron las etapas de la Sección 1.1., aunque en tubos separados. La extracción se inició usando diferentes cantidades que incluyen un control sin muestra para determinar posteriormente el rendimiento.

- 5 iv. Se añadieron cantidades conocidas de ADN genómico de *L. infantum* a muestras de ADN de perro negativas por PCR a *Leishmania* sp., de manera que la cantidad por patrón fue finalmente 10-20 ng en 2 µl.

#### 3.4.3. Cuantificación de ADN genómico

- 10 La cuantificación se realizó con Qubit, kit de ensayo *Qubit DNA BR (Life Technologies)*. Todos los componentes, excepto el tampón *Qubit DNA BR* ("Componente B"), se preservaron a 4 °C.

i. Se calculó el número de muestras incluyendo tanto disoluciones patrón como un exceso.

- 15 ii. Se mezclaron 199 volúmenes del "Componente B" (tampón *Qubit DNA BR*) con 1 volumen de reactivo "Componente A" (reactivo *Qubit DNA BR*).

iii. Se añadieron 180-199 mcl de esta mezcla por tubo, dependiendo del volumen de muestra medido (entre 1 y 20 µl), de forma que el volumen final fue 200 µl.

- 20 iv. Se añadieron 10 mcl de cada patrón a 190 µl de la mezcla previa en los tubos correspondientes. En este caso, hubo dos patrones: "Componente C" (patrón *Qubit DNA BR* nº 1), que es el blanco, y "Componente D" (patrón *Qubit DNA BR* nº 2), que tiene una concentración de ADNmc de 20 ng/µl.

- 25 v. Se añadió un volumen adecuado de muestra (1 - 20 µl).

vi. Se realizaron mezcla por vórtex y un giro por pulsos en la centrífuga.

vii. Los tubos se incubaron durante 2 min a temperatura ambiente.

- 30 viii. En el cribado principal de Qubit, se seleccionó "ADN" y luego "ADNbc" como tipo de prueba. Entonces, el cribado mostró "Patrones".

ix. Se seleccionó "Ejecutar un nuevo calibrado".

- 35 x. Se insertó el tubo que contenía el patrón nº 1 en la ranura y se presionó el botón "Leer". A continuación, se sacó dicho tubo y se repitió la operación con el patrón nº 2. El resultado del calibrado se mostró en la pantalla.

xi. Se repitió la operación anterior para todas las muestras presionando "Leer la siguiente muestra".

- 40 xii. La concentración de la muestra se calculó del siguiente modo:

$$\text{Concentración de muestra} = Q \cdot (200/x),$$

- 45 en la que Q es el valor proporcionado por Qubit y x el volumen de muestra que se añadió al tubo. Este valor de concentración se calculó por la unidad presionando "Calcular la conc. madre" y seleccionando el volumen de muestra que se había añadido en la rueda en el centro de la pantalla.

#### 50 3.4.4. RT-PCR cuantitativa en tiempo real por el método de sondas *TaqMan*

Nota: Se prepararon todas las mezclas y los reactivos se mantuvieron sobre hielo durante el proceso. El recipiente se descontaminó de ADN y nucleasa.

- 55 i. En el área de manipulación de muestras, se prepararon diluciones 1/5 sucesivas de ADN genómico a partir de una disolución a una concentración de 5-10 ng/µl.

- 60 ii. En el área limpia para almacenamiento y manipulación de los reactivos, se preparó la mezcla de reacción maestra (*master mix*) para todas las reacciones que tenían que realizarse que incluyen diluciones y duplicados biológicos y técnicos más un resto adecuado según la pérdida por pipeteado. Cada mezcla de reacción tuvo un volumen final de 10 µl y consistió en los siguientes componentes, excluyendo la muestra:

Mezcla maestra de PCR *TaqMan Fast Universal* (2X)                      5,00 µl (1X)

- 65 Cebadores Leish-1 y Leish-2 (100 µM cada uno)                      0,09 µl (900 nM cada uno)

Sonda Leish-P (100 µM) 0,09 µl (200 nM)

Agua libre de nucleasa (*Life Technologies*) 2,82 µl

5

Las secuencias de cebador y sonda fueron:

SEC ID N°: 25 (Leish-1) 5'AACTTTTCTGGTCCTCCGGGTAG3'

10

SEC ID N°: 26 (Leish-2) 5'ACCCCCAGTTTCCCGCC3'

SEC ID N°: 27 (Leish-P) 5'-6-FAM-AAAAATGGGTGCAGAAAT3'

15

iii. Usando la pipeta multicanal, se añadieron 8 µl de mezcla maestra por pocillo en una placa de 384 pocillos, que se preparó en el área limpia para el almacenamiento y manipulación de reactivos.

iv. La placa se movió al área de preparación de muestras y se añadieron 2 µl de muestra por pocillo.

20

v. Las reacciones de qPCR se ejecutaron en un sistema de PCR en tiempo real 7900HT Fast usando el software SDS 4.1. (*Life Technologies*) siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante. Las condiciones del ciclo térmico fueron: 95 °C durante 5 min; 40 x [95 °C durante 30"; 60 °C durante 1 min, adquisición de datos].

### 3.4.5. Análisis

25

Nota: Se realizó el proceso completo con *Microsoft Excel*. Hubo una plantilla disponible para hacer esto, de manera que los valores Ct y, una vez se había realizado la regresión lineal, el valor de la pendiente de la línea, se entró en los cuadros correspondientes, de manera que una vez se hizo esto se obtuvieron automáticamente los resultados.

30

i. Cálculo de las medias aritméticas de los duplicados hechos de cada dilución, la cuasi-desviación estándar o incertidumbre (desviación estándar, DE) y el coeficiente de variación (CV).

$$CV (\%) = (DE_{\text{dilución}} / Ct_{\text{medio de dilución}}) \times 100$$

35

ii. Eliminación de los puntos cuyo CV es superior al 20 % (se consideraron resultados atípicos).

40

iii. Cálculo de la eficiencia de amplificación independientemente para cada muestra biológica y para cada tríada de cebadores y sonda a partir de los datos de los duplicados y diluciones sucesivas correspondientes. Se representó el valor de Ct frente al logaritmo de la masa del molde total añadida a la mezcla de reacción (µg) y se realizó la regresión lineal. El valor del coeficiente de regresión ( $r^2$ ) debe ser tan próximo como sea posible a 1. La eficiencia se determinó por el valor de la pendiente de la línea.

Note: Se realizó el mismo proceso con patrones internos y externos.

45

iv. Cálculo de la eficiencia.

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

v. Cálculo de la cantidad corregida con la eficiencia para cada uno de los valores.

50

$$\text{Cantidad} = \text{Eficiencia}^{-Ct}$$

vi. Cálculo de la media y DE de la cantidad para los duplicados técnicos de una dilución y condición dadas.

55

vii. Normalización (por condición y dilución). Se consideró una cantidad de ADNr 18S (reactivo de ensayo Taqman desarrollado previamente con ARNr 18S eucariota, *Life Technologies*).

a. Los valores de cantidad para micróculos (mc) se dividieron entre aquellos del gen de referencia ("GOR": gen de referencia, tal como IFNgamma o IL-10).

60

b. Cálculo de la  $DE_{\text{cantidad normalizada}}$ :

$$DE_{\text{cantidad normalizada}} = \text{Cantidad normalizada} \cdot [(DE_{mc} / \text{Cantidad}_{mc})^2 + (SD_{GOR} / \text{Cantidad}_{GOR})^2]^{1/2}$$

65

viii. Cálculo del número de amastigotes/mg de tejido por patrón externo e interno.

Note: Se aplicó el rendimiento calculado en la extracción de ADN.

ix. Cálculo de la media del número de amastigotes/mg de tejido obtenidos con diferentes diluciones y la DE correspondiente (cálculo de la DE de las medias).

5

### 3.5. *Evaluación de inmunidad humoral*

Determinación de los niveles relativos de IgG, IgG1 e IgG2 total por la técnica de enzimoanálisis de adsorción (ELISA) de sangre de todos los animales en el estudio y durante todo el experimento. Para este fin, se extrajo el suero de todas las muestras recogidas y se mantuvo a -20 °C hasta que se llevó a cabo el ELISA en placas de 96 pocillos.

10

La determinación de los niveles relativos de IgG, IgG1 e IgG2 total se llevó a cabo por la técnica de enzimoanálisis de adsorción (ELISA).

15

#### 3.5.1. Preparación de las muestras

Las muestras se transportaron de Zaragoza a Madrid a -20 °C con envases fríos dentro una caja de poliestireno expandido. Se usó una caja de congelación para organizar y guardar las muestras y para reducir el riesgo de contaminación.

20

i. Se limpió con etanol el área de extracción de muestras.

ii. La extracción de la muestra de 2 ml de sangre se realizó usando una aguja de 21 G estéril y una jeringa de 5 ml.

25

iii. Inmediatamente, la muestra se llevó a la mesa de procesamiento de muestras de la sala de muestreo, se sacó la aguja y se vertió el contenido de la jeringa en un tubo de separación de suero (EUROTUBE, *Deltalab*).

iv. La muestra de sangre se mezcló con los gránulos por inversión suave 5 veces.

30

v. Las muestras siguieron a temperatura ambiente durante 25-35 minutos para que la sangre coagulara apropiadamente (en el caso de los inventores, concretamente 30 min después de la última extracción antes de la centrifugación).

35

vi. La centrifugación a un máximo de 1.000 g (1.500 g es el máximo especificado por el fabricante) durante 10 min a 24-26 °C como mínimo.

vii. El suero se recogió y se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml. Los tubos se colocaron en una caja de congelación.

40

viii. Las muestras se transportaron dentro de una caja de congelación de Zaragoza a Madrid a -20 °C dentro de una caja de poliestireno con bolsas de hielo.

ix. Al día siguiente, los sueros se almacenaron en un congelador a -20 °C para la preservación.

45

x. El día antes de uso, los sueros se descongelaron y se tomaron alícuotas adecuadas. Las diluciones correspondientes de los diferentes sueros se dispusieron en placas de 96 pocillos. De este modo, las cantidades de muestra necesarias se transfirieron a placas de ELISA con pipetas multicanal en la etapa correspondiente.

#### 3.5.2. Preparación del antígeno de Leishmania soluble (SLA)

50

i. Se realizó un cultivo de promastigotes de *L. infantum* en medio RPMI complementado con 10 % de suero bovino fetal inactivado y 100 µg/ml de estreptomina-100 UI/ml de penicilina. Por ejemplo: 100 ml de cultivo con  $2 \times 10^6$  promastigotes iniciales.

55

ii. Una vez alcanzaron la fase estacionaria, se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min y se lavaron tres veces con PBS. Finalmente, se resuspendieron en PBS.

iii. Se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación (-20 °C - temperatura ambiente) sin acelerar la congelación o descongelación.

60

Nota: Esto sería el CLA, que se cuantificaría directamente por el método de Bradford.

iv. Se realizó sonicación manteniendo el tubo sobre hielo (tres ciclos).

65

v. Se realizó una etapa de centrifugación a 16.000 g durante 3 min.

vi. El sobrenadante (SLA) se recuperó y se cuantificó por el método de Bradford (véase la nota en la etapa iii).

3.5.3. ELISA para la detección y cuantificación relativa de IgG, IgG1 e IgG2 total

5 El experimento se realizó por duplicado según las siguientes instrucciones:

i. Preparación de disoluciones:

10 i.1. Disolución de trabajo de SLA: 200 µg/ml.

i.2. Tampón carbonato-bicarbonato. Para 100 ml, 840 mg de NaHCO<sub>3</sub> y 356 mg de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,6.

i.3. Disolución de bloqueo: 1 % de BSA en PBS.

15 i.4. Disolución de lavado: 0,1 % de BSA, 0,03 % de Tween-20 en PBS.

i.5. Anticuerpos y proteína A. Preparar la dilución en el momento de uso.

20 Dilución 1:15.000 en disolución de bloqueo para anticuerpo de cabra anti-IgG1-HRP de perro (Bethyl laboratories), 1:20.000 en disolución de bloqueo para anticuerpo de oveja anti-IgG2-HRP de perro (Bethyl laboratories) y 1:8.000 (0,19 µg/ml) en disolución de lavado para proteína A rec de HRP (Life Technologies).

i.6. Tampón citrato. 1 g de ácido cítrico y 1,8 g de fosfato de disodio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) a pH 5 en 100 ml.

25 i.7. Sustratos OPD (Invitrogen-Zymed) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Preparar en el momento de uso. Disolver 1 comprimido de OPD en 12 ml de tampón citrato y añadir 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (35 %).

30 ii. Se recubrieron pocillos de placa añadiendo 100 µl de SLA 10 µg/ml en tampón carbonato-bicarbonato a pH 9,6 a cada uno de ellos (se preparan 100 ml de SLA 10 µg/ml añadiendo 95 ml del tampón a 5 ml de SLA 200 µg/ml).

iii. La placa se cubrió con *Parafilm* y se incubó durante la noche a 4 °C.

35 iv. Entonces, el contenido de los pocillos se desechó invirtiendo la placa con un movimiento vigoroso y se secó golpeando sobre papel de filtro. Esta etapa se realizó después de cada incubación hasta la etapa x incluida.

v. Se añadieron 200 µl/pocillo de disolución de bloqueo y se realizó una etapa de incubación de 1 h a temperatura ambiente.

40 vi. Se llevaron a cabo 3 lavados con 200 µl/pocillo de disolución de lavado.

vii. Entonces se añadieron 100 µl de cada muestra al pocillo correspondiente usando la pipeta multicanal (véase 1.x.) y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente.

45 viii. Se realizaron 3 lavados con 200 µl/pocillo de disolución de lavado.

ix. Los anticuerpos primarios se añadieron a la dilución adecuada a los pocillos correspondientes (véase i.5), que luego se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente.

50 x. Se llevaron a cabo dos lavados con 200 µl/pocillo de disolución de lavado y uno con el mismo volumen de PBS.

xi. Se añadieron 100 µl/pocillo de sustratos OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (véase i.7) y las placas se cubrieron con lámina y se incubaron en la oscuridad durante 20-30 min a temperatura ambiente.

55 xii. La reacción se detuvo con 50 µl/pocillo de 1 % de SDS.

xiii. Se leyó la absorbancia a 450 nm. Para este fin, se usaron el lector de placas *Microplate Reader Model 680* (BioRad) y el software *Microplate Manager 5.2.1*. (BioRad) y los datos se exportaron a un archivo de *Microsoft Excel* haciendo clic en *Archivo, Exportar a Excel*.

60 xiv. Se realizó un ensayo de ELISA indirecto de todos los grupos experimentales para cada tiempo del experimento siguiendo el procedimiento especificado anteriormente, y los cálculos se detallaron más abajo. Los valores individuales para cada animal se representaron en un histograma de tiempo y los valores medios de los grupos en una gráfica de densidad óptica a 450 nm con el tiempo, de manera que, en el último caso, la gráfica se completó a medida que avanzó el experimento.

65

- i. El valor medio de los blancos se restó correspondientemente a cada uno de los datos.
- ii. Se calcularon la media aritmética y la incertidumbre (DE) de cada muestra (duplicados en placa diferente).
- 5 iii. Se representó el histograma de tiempo correspondiente.
- iv. Se calcularon la media aritmética y la incertidumbre (DE) dentro de cada grupo.
- iv. Se representó el punto en la gráfica de densidad óptica a 450 nm ( $DO_{450nm}$ ) con el tiempo (días).

### 3.6. Evaluación de la inmunidad celular

La evaluación de la inmunidad celular contra el antígeno LACK se llevó a cabo en dos niveles. Por una parte, la tasa de proliferación se determinó en células mononucleares de sangre periférica contra diferentes estímulos, antígeno de Leishmania total (CLA) y proteína LACK. Después de cinco días de incubación, se realizó el marcado de células con los anticuerpos  $CD4^+$  y  $CD8^+$ , y se analizaron por citometría de flujo. Por otra parte, se determinó el nivel de citocinas IFN- $\gamma$  y IL-10 en sobrenadantes de proliferación *in vitro*, mencionado anteriormente.

#### 3.6.1. Prueba de transformación linfoblástica (LTT) o linfoproliferación en células mononucleares de sangre periférica (CMSP)

- i. Extracción de 8 ml de sangre en tubos de heparina-Li bajo condiciones estériles. Transporte a temperatura ambiente. Almacenamiento durante la noche a temperatura ambiente.
- 25 ii. Aislamiento de CMSP por gradiente de Ficoll.
  - a. Se decantaron 8 ml de sangre en un tubo que contenía 10 ml de PBS-EDTA en un tubo de polipropileno de 50 ml.
  - 30 b. La muestra diluida se depositó en 7 ml de Ficoll (*Lymphoprep*) muy lentamente con el tubo de polipropileno de 50 ml en posición horizontal y sustancialmente perpendicular a la pipeta.
  - c. El gradiente se centrifugó a 2.000 rpm en la centrifuga *Beckman* durante 30 min a temperatura ambiente. Se recogió el anillo (capa leucocítica) y se llevó a otro tubo igual.
- 35 iii. Lavado y lisis de eritrocitos. Se realizó un lavado con 50 ml de PBS-EDTA por centrifugación durante 5 min a 2.000 rpm en la centrifuga *Beckman*. Las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de lisis de eritrocitos, que se dejó actuar durante 10 min a temperatura ambiente, y todo el volumen se llevó a 1,5 ml a nuevos tubos de Eppendorf estériles. Las células se recogieron por centrifugación en la microcentrifuga 5415R o 5424R de Eppendorf a 2.500 g durante 30 s a 25 °C y cuando la lisis se completó, se observó el sedimento blanco y el sobrenadante rojo. Si no se completó la lisis, se repitió. Se tomaron dos alícuotas de dos muestras diferentes para los controles negativos de marcado de CFSE (aproximadamente el 20 % de muestras que tienen muchas células). Las muestras se centrifugaron a 2.500 g durante 30 s a 25 °C en la microcentrifuga 5415R o 5424R de Eppendorf.
- 40 iv. Marcado con CFSE (kit de proliferación celular CellTrace™ CFSE, para citometría de flujo, Thermo Fisher Scientific): el sedimento se resuspendió en 100  $\mu$ l de 2,5-10  $\mu$ g/ml de CFSE (3,75-15  $\mu$ l de 1 mg/ml de disolución madre más 1496,25-1485  $\mu$ l de PBS). Se llevó a cabo incubación en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 min.
- 50 v. Se tomaron dos alícuotas de dos muestras diferentes para los controles positivos de marcado de CFSE (aproximadamente el 20 % de muestras que tienen muchas células).
- 55 vi. Se realizaron dos lavados con 1 ml de medio de lavado (los sobrenadantes se eliminaron con puntas de filtro de micropipeta estéril).
- vii. Las células se resuspendieron en 200  $\mu$ l de medio de proliferación con los estímulos correspondientes (en el caso de los controles negativos y positivos de marcado con CFSE, en 50  $\mu$ l). Se añadieron 50  $\mu$ l (1/4 de cada muestra, para distribuir entre control sin estímulo y tres estímulos) a cada pocillo de 1 ml de medio con estímulo y se incubaron a 37 °C bajo 5 % de atmósfera de  $CO_2$  durante 3 días.

*Nota:* Se resuspendieron células en 50  $\mu$ l de medio sin estímulo para cada pocillo de cada muestra que iba a organizarse y distribuirse en placas de 24 pocillos a las que se habían añadido previamente 950  $\mu$ l de medio con el estímulo correspondiente.

Concentraciones de estímulos:

	<u>Conc. final</u>	<u>Conc. de la disolución madre</u>
ConA (concanavalina A, Sigma)	1 µg/ml	1 mg/ml
CLA	10 µg/ml	1 mg/ml
LACK	5 µg/ml	0,1 -1 mg/ml
Control negativo (medio)	-	-

### 3.6.2 Protocolo de marcado para citometría

Se realizó el procedimiento completo con las placas sobre hielo y las centrifugas refrigeradas a 4 °C.

- 5 i. Se transfirió el volumen entero de las placas de 24 pocillos a placas de 96 pocillos de pocillos profundos (*Eppendorf*), de manera que se usaron cuatro pocillos de la misma columna para la muestra de cada perro (uno por cada estímulo).
- 10 ii. Centrifugación a 2.300 rpm durante 5 min a 4 °C en la centrifuga *Beckman*.
- iii. Los sobrenadantes se almacenaron en placas de pocillos profundos nuevos y se preservaron a -20 °C para detectar el nivel de las citocinas anteriormente mencionadas por ELISA.
- 15 iv. Las placas de pocillos profundos que contenían los sedimentos se agitaron con vórtex y cada uno se resuspendió en 200 µl de PBS-1 % de BSA (en 300 ml en los controles CFSE+ y CFSE-).
- 20 v. Las células se pasaron a placas de fondo en V de 96 pocillos añadiendo 100 µl por pocillo, de forma que dos pocillos de las placas de 96 pocillos se correspondieron con cada estímulo para cada muestra (uno para marcar con anti-CD4 y otro con anti-CD8). Por tanto, los presentes inventores tuvieron 8 pocillos por perro. Se usan tres pocillos en lugar de dos para los controles CFSE+ y CFSE-, ya que el primero estaría sin anticuerpo, el segundo con anticuerpo de rata anti-CD4 de perro (Serotec) y el tercero con anticuerpo de rata anti-CD8 de perro (Serotec). Todos los controles se hicieron por duplicado.
- 25 vi. Centrifugación a 2.000 rpm durante 5 min a 4 °C en la centrifuga *Beckman*. El sobrenadante se desechó rápidamente y la placa se invirtió fuertemente y se secó al revés sobre papel de filtro.
- vii. El sedimento se resuspendió agitando la placa con vórtex y añadiendo rápidamente 200 µl de PBS-1 % de BSA con la pipeta multicanal.
- 30 viii. Se repitió el lavado (etapas 6 y 7), pero la resuspensión se realizó en 50 µl de PBS-1 % de BSA.
- ix. Añadir 50 µl de dilución 1/5 del anticuerpo marcado con RPE correspondiente (anticuerpo de rata anti-CD4 de perro o anticuerpo de rata anti-CD8 de perro). Cada uno de los dos pocillos por estímulo indicado en la etapa 5 se marcó con uno de los anticuerpos. Se realizó mezcla meticulosa con pipeta multicanal.
- 35 x. Se realizó una etapa de incubación en la oscuridad a 4 °C (sobre hielo) durante 1 h.
- xi. Se realizaron dos lavados con 200 µl de PBS-1 % de BSA por pocillo.
- 40 xii. Después de la última centrifugación de las etapas de lavado, las muestras se resuspendieron en 200 µl de PBS-0,5 % de BSA-0,003 % de azida de sodio.
- xiii. Análisis por citometría de flujo (FC500 Beckman-Coulter, siguiendo las instrucciones del fabricante).

45 Nota: Cuando muestras no se analizaron inmediatamente, se fijaron con 1 % de paraformaldehído añadiendo 150 µl por pocillo, se incubaron durante 1 h a 4 °C, se centrifugaron y se resuspendieron como se indica en la etapa 12. Finalmente se guardaron durante hasta 1 semana a 4 °C en la oscuridad una vez fijadas.

### 3.6.3. Determinación del nivel de citocinas IFN-γ y IL-10 en los sobrenadantes de proliferaciones *in vitro* por ELISA

- 50 i. Se diluyó el anticuerpo de captura (IL10 canina DuoSet (R&D Systems, ref. DY735) o IFNγ canino DuoSet (R&D Systems, ref. DY781B)) a la concentración de trabajo de 2 µg/ml en PBS.

- ii. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de captura diluido a cada pocillo.
- 5 iii. Se realizó una etapa de incubación a temperatura ambiente durante la noche.
- iv. Se desecharon los contenidos.
- v. Se realizaron tres lavados con 400 µl de tampón de lavado (0,05 % de Tween 20 en PBS a pH 7,2-7,4) y el líquido se eliminó bien entre lavados.
- 10 vi. Se realizó el bloqueo añadiendo 300 µl de diluyente de reactivo (1 % de BSA en PBS a pH 7,2-7,4) e incubando (etapa vii).
- vii. Etapa de incubación: al menos 1 h a temperatura ambiente.
- 15 viii. Los lavados se repitieron como en el punto 5.
- ix. Añadir 100 µl de la muestra a la dilución adecuada o el patrón, con el que se realizaron al menos 7 diluciones sucesivas 1:2, siendo el máximo 2000 pg/ml.
- 20 x. Cubrir la placa e incubar a temperatura ambiente.
- xi. Los lavados se repitieron como en el punto 5.
- 25 xii. Se añadieron 100 µl de anticuerpo de detección (de ratón anti-IL-10 canina biotinilado) a la concentración de trabajo (20 ng/ml).
- xiii. Incubación durante 2 h a temperatura ambiente.
- 30 xiv. Los lavados se repitieron como en el punto 5.
- xv. Se añadieron 100 µl de estreptavidina-HRP.
- xvi. Se realizó una etapa de incubación de 20 min a temperatura ambiente previniendo la incidencia de luz.
- 35 xvii. Los lavados se repitieron como en el punto 5.
- xviii. Se añadieron 100 µl de disolución de sustrato (OPD).
- 40 xix. Se realizó incubación a temperatura ambiente durante 20 min previniendo la incidencia de luz.
- xx. Se añadieron 50 µl de disolución de parada (1 % de SDS) a las muestras, que luego se mezclaron bien.
- 45 xxi. La absorbancia se leyó a 450 nm.

**Ejemplo 2.- Generación del vector pPAL-LACK y verificación de la expresión del gen LACK en cultivo *in vitro* de células HEK293T**

50 Se generó el plásmido pPAL-LACK como se ha descrito en el Ejemplo 1, Sección 1. Se proporciona una representación esquemática del plásmido en la Figura 2. Además, una fotografía de la construcción pPAL-LACK purificada en 1 % de gel de agarosa se muestra en la Figura 4 A.

55 Se llevó a cabo expresión *in vitro* del gen LACK en la línea celular HEK293T humana como se ha detallado en el Ejemplo 1, Sección 2, que muestra expresión similar a la observada en la transfección realizada con el plásmido pCIneo-LACK. La banda de la proteína LACK en un gel de SDS-PAGE de extractos de células HEK293T aparece a la altura esperada de 36 kDa, como se muestra en la Figura 4 B.

**Ejemplo 3.- Evaluación de los niveles de protección de pPAL-LACK contra infección experimental con *Leishmania infantum***

60 **I. Evaluación de la sintomatología**

65 Como se muestra en la Figura 5, los grupos vacunados con menor sintomatología compatible con leishmaniosis (véase la Sección 3.3.) son I y II. Los resultados observados 300 días después de la infección (dpi) han permanecido iguales hasta el sacrificio de los animales, ya que no se ha observado cambio en el tiempo final.

**II. Determinación de la carga de parásitos de médula ósea por RT-PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)**

5 Médula ósea. Con el tiempo, la carga de parásitos ha permanecido a un nivel más bajo en el grupo I (Figura 6). El grupo II ha mostrado la misma tendencia, excepto por el intervalo de tiempo de aproximadamente 240 dpi, en el que hubo un aumento en el grupo II y una disminución en el grupo IV. La Figura 7 se refiere a la sintomatología a la carga de parásitos en médula ósea.

10 La carga de parásitos también se evaluó en sangre y órganos diana como se describe a continuación:

- Sangre. La carga de parásitos se evaluó a partir de 240 dpi, siendo más baja en los grupos I y II.

- Órganos diana. La carga de parásitos se evaluó después de las autopsias.

- 15 a) Bazo. Los mejores resultados (menor carga de parásitos) se obtuvieron en el grupo I.
- b) Ganglio linfático. Menor carga de parásitos en el grupo II y luego en el grupo I. El grupo IV está altamente parasitizado en ganglio linfático.
- 20 c) Hígado. Perfil relativo similar a ganglio linfático, en el que el grupo II tiene la menor carga de parásitos cuando se compara con los otros grupos.

**III. Evaluación de inmunidad humoral**

25 Durante el periodo de inmunización, los niveles de IgG, IgG1 e IgG2 total contra antígeno de Leishmania soluble (SLA) permanecieron constantes en el nivel inicial (Figuras 8-10). Los niveles de IgG y IgG2 total empezaron a aumentar en la fase de infección temprana (21 y 40 dpi) en todos los grupos experimentales (GI y GII) y controles positivos (GIV) y alcanzaron el máximo en el día 120 (Figuras 8 y 10). Sin embargo, los niveles de IgG1 no aumentaron durante la fase de infección temprana y su elevación 120 dpi se detectó primero en todos los grupos excepto en el grupo II en el que hubo un ligero aumento en la fase de infección temprana (Figura 9). Por tanto, la serología indica que la infección experimental se llevó a cabo satisfactoriamente en todos los grupos experimentales y el control positivo, mientras que en los controles negativos (GIII) no se detectó la producción de IgG específica contra el parásito. No se detectaron diferencias significativas entre los grupos, excepto con el grupo III, como era de esperar.

30

35

**IV. Evaluación de inmunidad celular**

40 Se midieron niveles de activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> contra CLA y LACK por linfoproliferación o ensayos de transformación linfoblástica. Los sobrenadantes de cultivos de CMSP permitieron la evaluación de los niveles de IFNg secretada e IL10 por ELISA.

- Activación celular.

45 Los niveles de activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en CMSP contra CLA y LACK fueron mayores y más uniformes en el grupo I con el tiempo en general. En el grupo II también fueron superiores a en el grupo IV (Figuras 11 y 12). En órganos diana, los presentes inventores encontraron:

- 50 a) Bazo. Se encuentra mayor en el grupo I, seguido de II y IV. Como puede observarse en el grupo III, algunas veces hay un fondo de proliferación celular no específica.
- b) Ganglio linfático. Activación a niveles similares en los grupos I y II, superior a en el resto.
- 55 c) Hígado. No se detectó nada relevante y los resultados son muy irregulares. Puede ser debido al alto número de hepatocitos presentes.

- Niveles de citocinas en sobrenadantes de ensayos de linfoproliferación.

60 En células mononucleares de sangre periférica (CMSP), la producción de IFNg contra CLA en grupos I y II es superior a en el grupo IV (Figura 13), y aquella de IL10 es menor (Figura 14). Lo mismo ocurre contra LACK (Figuras 15 y 16).

65 En vista de estos resultados, el uso del plásmido pPAL-LACK en la pauta homóloga (grupo I) proporciona resultados de producción de IFNg y de IL-10 similares al grupo II en el que se usó una pauta heteróloga (plásmido pCIneo-LACK/ MVA-LACK), eliminando así la necesidad de usar un virus.

**Ejemplo 4.- Determinación de la secuencia antigénica dentro de fabI de *E. coli***

La predicción de islas CpG se realizó con el software CpG Island Searcher (Takai *et al.*, 2002, PNAS 99(6):3740-5). Primero, la secuencia del gen *fabI* de *E. coli* que incluye su promotor (SEC ID N°: 21) se introdujo en el software. Se usaron parámetros por defecto (% de GC = 55; ObsCpG/ExpCpG = 0,65; hueco entre islas adyacentes = 100 pb), excepto por la longitud seleccionada (200 pb). Como resultado, se identificó una secuencia que contiene 59 % de G+C (SEC ID N°: 1) entre las posiciones 700 y 909 de dicha secuencia. Se propone que esta isla CpG es el motivo de ADN inmunoestimulante responsable de los elevados niveles de protección observados (véase el Ejemplo 3).

**10 Ejemplo 5.- Evaluación de los niveles de protección de pPAL-LACK contra la leishmaniosis canina en comparación con la vacuna comercial CaniLeish® (Virbac)****Ejemplo 5.1 MATERIAL Y MÉTODOS****15 I. Experimentación con animales.**

Grupos de tratamiento: grupo A - control positivo (infectado, no inmunizado); grupo E: 2 dosis de 200 µg de pPAL-LACK; grupo F - CaniLeish® (Virbac). Cada grupo incluía 10 perros Beagle sanos de un año (5 machos y 5 hembras cada uno).

**20 II Preparación de inóculo infeccioso e infección experimental.**

El procedimiento seguido fue exactamente el mismo que se detalla en 3.1 y 3.2 anteriores.

**25 III. Determinación de los niveles de citocinas mediante transcripción inversa qPCR****1. Extracción de ARN.**

La aspiración con aguja fina (aproximadamente 5 µl) del ganglio linfático poplíteo se resuspendió en 1 ml de reactivo TRIzol (Life Technologies) y la extracción de ARN se realizó siguiendo las instrucciones especificadas por el fabricante.

**2. Cuantificación y evaluación de la calidad del ARN.** Se siguió el procedimiento descrito en 3.4.3. pero usando el kit de ensayo Qubit RNA BR (Life Technologies) en lugar del kit de ADN. Ejecutar un gel de agarosa al 2% a 5 V/cm hasta que el frente del tinte alcance el fondo del gel. El peine, la celda de electroforesis y la bandeja deben tratarse previamente con peróxido de hidrógeno comercial durante 30 minutos y el tampón de transferencia debe prepararse con agua libre de ARNasa. Examinar las bandas 18S y 28S.

**3. Transcripción inversa.**

- i. Mezclar 1 µg de ARN resuspendido en agua libre de ARNasa con 1,5 µl de tampón 5X Sill RT (Life Technologies), 1 µl de cebadores hexámeros aleatorios de 3 µg/µl (Life Technologies), 1 µl del inhibidor RNase out (Life Technologies) y agua libre de ARNasa hasta completar un volumen final de 16,8 µl.
- ii. Calentar la mezcla a 70°C durante 10 minutos y enfriar inmediatamente hasta 4°C.
- iii. Añadir lo siguiente a la mezcla de reacción: 6 µl de tampón 5X Sill RT (Life Technologies), 1,7 µl de cada dNTP 10 mM, 1,5 µl de DTT 0,1 M, 3 µl de transcriptasa inversa SuperScript III 200 U/µl (Life Technologies) y 1 µl de RNase out.
- iv. Incubar a 46°C durante 3 h.
- v. Añadir 7 µl de NaOH 0,5 M.
- vi. Incubar a 70°C durante 20 min.
- vii. Añadir 7 µl de HCl 0,5 M.
- viii. Purificar con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

**4. Cuantificación de ADNc.** Se siguió el procedimiento descrito en 3.4.3.

**5. RT-PCR cuantitativa en tiempo real mediante el método de sondas *TaqMan***

**65 Nota:** Se prepararon todas las mezclas y los reactivos se mantuvieron en hielo durante el proceso. El recipiente se

descontaminó de ADN y nucleasa.

i. En el área de manipulación de muestras, se prepararon diluciones 1/5 en serie de ADNc a partir de una disolución a una concentración de 2,5 ng/μl.

ii) En el área limpia para el almacenamiento y manejo de los reactivos, la mezcla de reacción maestra (*mezcla maestra*) se preparó para todas las reacciones que debían realizarse, incluidas las diluciones y las réplicas biológicas y técnicas más un remanente adecuado de acuerdo con las pérdidas por pipeteo. Cada mezcla de reacción tenía un volumen final de 10 μl y consistía en los siguientes componentes, excluyendo la muestra:

Mezcla maestra de PCR <i>TaqMan Fast Universal</i> (2X)	5,00 μl (1X)
<i>Ensayo de expresión génica TaqMan</i> (sonda y cebadores, 20X)	0,5 μl (1X)
Agua libre de nucleasa ( <i>Life Technologies</i> )	2,5 μl

Las referencias comerciales de los *ensayos de expresión génica TaqMan* fueron:

IFN gamma de perro	n.º de cat. # 4448892 Cf02622936_m1
IL10 de perro	n.º de cat. # 4448892 Cf02741697_g1
TNF alfa de perro	n.º de cat. # 4448892 Ensayo n.º Cf02624261
CAPZB (beta actina)	n.º de cat. 4448893 Ensayo n.º Cf02635224

iii) Usando la pipeta multicanal, se añadieron 8,0 μl de la *mezcla de reacción* por pocillo en una placa de 384 pocillos, que se preparó en el área limpia para el almacenamiento y manejo de reactivos.

iv. La placa se movió al área de preparación de la muestra y se añadieron 2 μl de muestra por pocillo.

v. Las reacciones de qPCR se ejecutaron en un sistema de PCR en tiempo real 7900HT usando el software SDS 4.1. (*Life Technologies*) siguiendo el procedimiento especificado por el fabricante. Las condiciones del ciclo térmico fueron: 95°C durante 5 min; 40 x [95°C por 30"; 60°C durante 1 min, adquisición de datos].

## 6. Análisis

Nota: todo el proceso se realizó con *Microsoft Excel*. Había una plantilla disponible para hacer esto, por lo que los valores de Ct y, una vez realizada la regresión lineal, el valor de la pendiente de la línea se ingresó en los cuadros correspondientes, de modo que una vez hecho esto, los resultados se obtuvieron automáticamente.

i. Cálculo de las medias aritméticas de las réplicas realizadas a partir de cada dilución, la desviación o incertidumbre cuasi-estándar (desviación estándar, DE) y el coeficiente de variación (CV).

$$CV (\%) = (DE_{\text{dilución}} / Ct_{\text{medio de dilución}}) \times 100$$

ii) Eliminación de los puntos cuyo CV es superior al 20% (se consideraron resultados atípicos).

iii) Cálculo de la eficiencia de amplificación de forma independiente para cada muestra biológica y para cada tríada de cebadores y sonda a partir de los datos de las réplicas técnicas correspondientes y las diluciones en serie. Se representó el valor de Ct frente al logaritmo de la masa de plantilla total añadida a la mezcla de reacción (μg) y se realizó una regresión lineal. El valor del coeficiente de regresión ( $r^2$ ) debe estar lo más cerca posible de 1. La eficiencia se determinó por el valor de la pendiente de la línea.

iv. Cálculo de la eficiencia.

$$\text{Eficiencia} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

v. Cálculo de la cantidad corregida con la eficiencia para cada uno de los valores.

$$\text{Cantidad} = \text{Eficiencia}^{-Ct}$$

vi. Cálculo de la media y DE de la cantidad para las réplicas técnicas de una dilución y condición dada.

vii. Normalización (por condición y dilución). Se consideró una cantidad de CAPZB (beta-actina).

a) Los valores de cantidad para minicírculos (mc) se dividieron entre los del gen de referencia

(GOR).

b) Cálculo de la  $DE_{\text{cantidad normalizada}}$ :

$$DE_{\text{cantidad normalizada}} = \text{Cantidad normalizada} \cdot [(DE_{\text{mc}}/\text{Cantidad}_{\text{mc}})^2 + (DE_{\text{GOR}}/\text{Cantidad}_{\text{GOR}})^2]^{1/2}$$

#### IV. Determinación de la carga de parásitos y los niveles de IgG

Se realizó como se describe en el ejemplo 1, 3.4.4 y 3.5.3.

#### Ejemplo 5.2 RESULTADOS

##### I. Carga de parásitos

Este segundo experimento (ciego) muestra que la carga de parásitos es menor en perros vacunados con pPAL-LACK (grupo E, figura 18; figura 19B) que en el grupo de control positivo (grupo A, figura 18; figura 19A) y perros vacunados con CaniLeish® (grupo F, figura 18; figura 19C). Este hecho respalda que la protección contra el parásito se ha mejorado considerablemente en comparación con la vacuna comercial CaniLeish®.

##### II. Determinación de niveles de expresión de citocinas

Al final del experimento, los niveles de expresión de IFN $\gamma$  en los ganglios linfáticos son considerablemente más altos en el grupo E que en el grupo F y el grupo A (figura 20), lo que respalda una respuesta protectora Th1 considerablemente más alta en el grupo vacunado con pPAL-LACK (grupo E) que en los vacunados con CaniLeish®. El aumento de IL10 es más temprano en el caso del grupo de control positivo (grupo A) que en los grupos vacunados E y F (figura 21). Los niveles relativos de TNF alfa son mucho más altos en el caso del grupo E vacunado con pPAL-LACK, lo cual es evidencia adicional del aumento de la respuesta Th1 a diferencia del grupo de control positivo y el grupo vacunado con CaniLeish®.

##### III. Determinación de los niveles de IgG total, IgG1 e IgG2

Todos los grupos se infectaron correctamente con el parásito de acuerdo con el análisis de carga de parásitos mencionado anteriormente y el análisis de la respuesta humoral (figuras 23-25). De manera interesante, los niveles de IgG1 son mucho más altos en el caso de la vacuna CaniLeish® que en el grupo de control positivo y el grupo experimental vacunado con pPAL-LACK. Este hallazgo respalda que CaniLeish® desencadena una respuesta humoral en lugar de una respuesta celular a diferencia de pPAL-LACK. Una respuesta humoral aumentada es un marcador de susceptibilidad a la enfermedad.

##### Lista de secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

<120> NUEVO ADYUVANTE MOLECULAR Y VACUNA

<130> 901 474

<150> Documento EP 15 382 273.9

<151> 22-05-2015

<160> 27

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 210

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> posiciones 700 a 909 del gen fabI de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(210)

<400> 1

ES 2 747 748 T3

```

aaaagcttgc cgctccatgc tgaatccggg ttctgccctg ctgacccttt cctaccttgg      60
cgctgagcgc gctatcccga actacaacgt tatgggtctg gcaaaagcgt ctctggaagc      120
gaacgtgcbc tatatggcga acgcgatggg tccggaaggt gtgcggtgta acgccatctc      180
tgctggtccg atccgtactc tggcggcttc      210

```

<210> 2

<211> 69

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido codificado dentro de SEC ID N°: 1

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(69)

15

<400> 2

```

Lys Ala Cys Arg Ser Met Leu Asn Pro Gly Ser Ala Leu Leu Thr Leu
1           5           10           15

```

```

Ser Tyr Leu Gly Ala Glu Arg Ala Ile Pro Asn Tyr Asn Val Met Gly
          20           25           30

```

```

Leu Ala Lys Ala Ser Leu Glu Ala Asn Val Arg Tyr Met Ala Asn Ala
          35           40           45
Met Gly Pro Glu Gly Val Arg Val Asn Ala Ile Ser Ala Gly Pro Ile
          50           55           60

```

```

Arg Thr Leu Ala Ala
65

```

20

<210> 3

<211> 780

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> gen fabl de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*

<220>

<221> misc\_feature

30

<222> (1)..(780)

<400> 3

ES 2 747 748 T3

```

atgggttttc tttccggtaa ggcattctg gtaaccggtg ttgccagcaa actatccatc      60
gcctacggta tcgctcaggc gatgcaccgc gaaggagctg aactggcatt cacctaccag      120
aacgacaaac tgaaggccg cgtagaagaa tttgccgctc aattgggttc tgacatcggt      180
ctgcagtgcg atgttgacga agatgccagc atcgacacca tgttcgctga actggggaaa      240
gtttggccga aatttgacgg tttcgtacac tctattggtt ttgcacctgg cgatcagctg      300
gatggtgact atgttaacgc cgttaccctg gaaggcttca aaattgccca cgacatcagc      360
tcctacagct tcgttgcaat ggcaaaagct tgccgctcca tgctgaatcc gggttctgcc      420
ctgctgacct tttcctacct tggcgctgag cgcgctatcc cgaactaaa cgttatgggt      480
ctggcaaaag cgtctctgga agcgaacgtg cgctatatgg cgaacgcgat ggggccggaa      540
ggtgtgcgtg ttaacgccat ctctgctggt ccgatccgta ctctggcggc ttccggtatc      600
aaagacttcc gcaaaatgct ggctcattgc gaagccgta ccccgattcg ccgtaccggt      660
actattgaag atgtgggtaa ctctgcggca ttctgtgct ccgatctctc tgccggtatc      720
tccggtgaag tagtccacgt tgacggcggg ttcagcatcg ctgcaatgaa cgaactcgaa      780

```

<210> 4

<211> 262

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> polipéptido codificado por el gen *fabI* de la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (262)

15

<400> 4

ES 2 747 748 T3

Met Gly Phe Leu Ser Gly Lys Arg Ile Leu Val Thr Gly Val Ala Ser  
 1 5 10 15

Lys Leu Ser Ile Ala Tyr Gly Ile Ala Gln Ala Met His Arg Glu Gly  
 20 25 30

Ala Glu Leu Ala Phe Thr Tyr Gln Asn Asp Lys Leu Lys Gly Arg Val  
 35 40 45

Glu Glu Phe Ala Ala Gln Leu Gly Ser Asp Ile Val Leu Gln Cys Asp  
 50 55 60

Val Ala Glu Asp Ala Ser Ile Asp Thr Met Phe Ala Glu Leu Gly Lys  
 65 70 75 80

Val Trp Pro Lys Phe Asp Gly Phe Val His Ser Ile Gly Phe Ala Pro  
 85 90 95

Gly Asp Gln Leu Asp Gly Asp Tyr Val Asn Ala Val Thr Arg Glu Gly  
 100 105 110

Phe Lys Ile Ala His Asp Ile Ser Ser Tyr Ser Phe Val Ala Met Ala  
 115 120 125

Lys Ala Cys Arg Ser Met Leu Asn Pro Gly Ser Ala Leu Leu Thr Leu  
 130 135 140

Ser Tyr Leu Gly Ala Glu Arg Ala Ile Pro Asn Tyr Asn Val Met Gly  
 145 150 155 160

Leu Ala Lys Ala Ser Leu Glu Ala Asn Val Arg Tyr Met Ala Asn Ala  
 165 170 175

Met Gly Pro Glu Gly Val Arg Val Asn Ala Ile Ser Ala Gly Pro Ile  
 180 185 190

Arg Thr Leu Ala Ala Ser Gly Ile Lys Asp Phe Arg Lys Met Leu Ala  
 195 200 205

His Cys Glu Ala Val Thr Pro Ile Arg Arg Thr Val Thr Ile Glu Asp  
 210 215 220

Val Gly Asn Ser Ala Ala Phe Leu Cys Ser Asp Leu Ser Ala Gly Ile  
 225 230 235 240  
 Ser Gly Glu Val Val His Val Asp Gly Gly Phe Ser Ile Ala Ala Met  
 245 250 255

Asn Glu Leu Glu Leu Lys  
 260

5 <210> 5  
 <211> 942  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

ES 2 747 748 T3

<223> GenBank: U49695.1

<220>

<221> misc\_feature

5 <222> (1)..(942)

<220>

<221> misc\_feature

10 <222> (1)..(942)

<223> gen LACK

<400> 5

```

accatgaact acgaggggtca cctgaagggc caccgcggat gggtcacctc cctggcctgc      60
ccgcagcagg cgggggtcgta catcaaggtg gtgtcgacgt cgcgcgatgg cacggccatc      120
tcgtggaag ccaacccccga cggccacagc gtggacagcg actacggtct gccgagccac      180
cgcctcgagg gccacaccgg ctctgtgtcg tgtgtgtcgc tggcccacgc caccgactac      240
gcgctgaccg cgtcctggga cggctccatc cgcatgtggg acctgcgcaa tggccagtgc      300
cagcgcgaagt tcctgaagca caccaaggac gtgctcgcgg tcgccttctc gccggacgac      360
cgcctgatcg tgtccgcggg cgcgcacaac gtgatccgcg tgtggaacgt ggcgggcgag      420
tgcatgcacg agttcctgcg cgacggccac gaggactggg tgagcagcat ctgtttctcg      480
ccgtcgctgg agcatccgat cgtggtgtcc ggcagctggg acaacacat caaggtatgg      540
aacgtgaacg ggggcaagtg tgagcgcacg ctcaagggcc acagcaacta cgtgtccacg      600
gtgacggtgt cgcagacagg gtcgctgtgc gcgtccggcg gcaaggacgg cgcggcgctg      660
ctgtgggacc tgagcaccgg cgagcagctg ttcaagatca acgtggagt ccccatcaac      720
cagatcgctt tctcgcccaa cgccttctgg atgtgcgtcg cgacggagag gtctctgtcc      780
gtgtacgacc tggagagcaa ggctgtgatt gcggagctga cgcggacgg cgcgaagccg      840
tccgagtgca tctccattgc ctggtccgcc gacggcaaca ctctgtactc cggtcacaag      900
gacaacctga tccgcgtgtg gtccatctcc gacgccgagt aa                          942

```

15

<210> 6

<211> 312

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> antigeno LACK

<220>

25 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(312)

<400> 6

ES 2 747 748 T3

Met Asn Tyr Glu Gly His Leu Lys Gly His Arg Gly Trp Val Thr Ser  
 1 5 10 15

Leu Ala Cys Pro Gln Gln Ala Gly Ser Tyr Ile Lys Val Val Ser Thr  
 20 25 30

Ser Arg Asp Gly Thr Ala Ile Ser Trp Lys Ala Asn Pro Asp Arg His  
 35 40 45

Ser Val Asp Ser Asp Tyr Gly Leu Pro Ser His Arg Leu Glu Gly His  
 50 55 60

Thr Gly Phe Val Ser Cys Val Ser Leu Ala His Ala Thr Asp Tyr Ala  
 65 70 75 80

Leu Thr Ala Ser Trp Asp Arg Ser Ile Arg Met Trp Asp Leu Arg Asn  
 85 90 95

Gly Gln Cys Gln Arg Lys Phe Leu Lys His Thr Lys Asp Val Leu Ala  
 100 105 110

Val Ala Phe Ser Pro Asp Asp Arg Leu Ile Val Ser Ala Gly Arg Asp  
 115 120 125

Asn Val Ile Arg Val Trp Asn Val Ala Gly Glu Cys Met His Glu Phe  
 130 135 140

Leu Arg Asp Gly His Glu Asp Trp Val Ser Ser Ile Cys Phe Ser Pro  
 145 150 155 160

Ser Leu Glu His Pro Ile Val Val Ser Gly Ser Trp Asp Asn Thr Ile  
 165 170 175

Lys Val Trp Asn Val Asn Gly Gly Lys Cys Glu Arg Thr Leu Lys Gly  
 180 185 190

His Ser Asn Tyr Val Ser Thr Val Thr Val Ser Pro Asp Gly Ser Leu  
 195 200 205

ES 2 747 748 T3

Cys Ala Ser Gly Gly Lys Asp Gly Ala Ala Leu Leu Trp Asp Leu Ser  
 210 215 220

Thr Gly Glu Gln Leu Phe Lys Ile Asn Val Glu Ser Pro Ile Asn Gln  
 225 230 235 240

Ile Ala Phe Ser Pro Asn Arg Phe Trp Met Cys Val Ala Thr Glu Arg  
 245 250 255

Ser Leu Ser Val Tyr Asp Leu Glu Ser Lys Ala Val Ile Ala Glu Leu  
 260 265 270

Thr Pro Asp Gly Ala Lys Pro Ser Glu Cys Ile Ser Ile Ala Trp Ser  
 275 280 285

Ala Asp Gly Asn Thr Leu Tyr Ser Gly His Lys Asp Asn Leu Ile Arg  
 290 295 300

Val Trp Ser Ile Ser Asp Ala Glu  
 305 310

<210> 7  
 <211> 312  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 10 <223> promotor del gen FabI  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(312)

15 <400> 7  
 gtgctggaga atattcggca aggtctgaac cgtcccagcc atcgccatga aagggttagg 60  
 ggctgtatga gcctgtttgt tgctggggta acaatatttg cacaatacgg tcccctcgcc 120  
 cctctgggga gagggttagg gtgagggaa aagcgcctcc cctgccgag cctgctccgg 180  
 tcggacctgg caactatagc tactcacagc caggttgatt ataataaccg tttatctggt 240  
 cgtactgttt actaaaacga cgaatcgct gattttcagg cacaacaagc atcaacaata 300  
 aggattaaag ct 312

<210> 8  
 <211> 32  
 20 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 25 <223> Pacl-fabl-promotor-Fw  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(32)

30 <400> 8  
 tactggatta attaagtgct ggagaatatt cg 32

<210> 9  
 <211> 37

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Pacl-fabl-Rv	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(37)	
10	<400> 9	
	tactggatta attaattatt tcagtcgag ttcgttc	37
	<210> 10	
15	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Pacl-pCIbla-1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(35)	
25	<400> 10	
	tactggatta attaaccgcg tatggtgcac tctca	35
	<210> 11	
30	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Pacl-pCIbla-2	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(34)	
40	<400> 11	
	tactggatta attaacgctg gcaagtgtag cggt	34
	<210> 12	
45	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> BamHI-pCI- bla-1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(31)	
55	<400> 12	
	gtacaggatc ccatgtgtca gaggtttca c	31
	<210> 13	
60	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> BamHI-pCI- bla-2	

# ES 2 747 748 T3

	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(32)	
5	<400> 13 gtacaggatc cgcagaagtg gtcctgcaac tt	32
	<210> 14	
	<211> 21	
10	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> pClseq1	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
20	<400> 14 tcaatattgg ccattagcca t	21
	<210> 15	
	<211> 21	
25	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> 106-LACK-pClseq	
30	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(21)	
35	<400> 15 ccacgagatg gccgtgcat c	21
	<210> 16	
	<211> 20	
40	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LACK-Fw	
45	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(20)	
50	<400> 16 atgaactacg agggtcacct	20
	<210> 17	
	<211> 19	
55	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> LACK-Rv	
60	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(19)	
65	<400> 17 ttactcggcg tcggagatg	19

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> pClseq2  
  
 10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
  
 <400> 18  
 15 gttaaggat tttggtcatg a 21  
  
 <210> 19  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> pClseq3  
  
 25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(21)  
  
 <400> 19  
 30 tcatgaccaa aatcccttaa c 21  
  
 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Xbal-pClseq4  
  
 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(18)  
  
 <400> 20  
 45 tctagagtcg acccgggc 18  
  
 <210> 21  
 <211> 1101  
 <212> ADN  
 50 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> gen fabI y su promotor  
  
 55 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1) .. (1101)  
  
 <400> 21

ES 2 747 748 T3

```

gtgctggaga atattcggca aggtctgaac cgtcccagcc atcgccatga aagggttagg      60
ggctgtatga gcctgtttgt tgctggggta acaatatttg cacaatacgg tcccctcgcc      120
cctctgggga gagggtagg gtgaggggaa aagcgcccc cctgccgag cctgctccgg      180
tcggacctgg caactatagc tactcacagc caggttgatt ataataaccg tttatctggt      240
cgtactgttt actaaaacga cgaatcgctt gattttcagg cacaacaagc atcaacaata      300
aggattaaag ctatgggttt tctttccggt aagcgcttc tggtaacggg tgttgccagc      360
aaactatcca tcgcctacgg tatcgctcag gcgatgcacc gcgaaggagc tgaactggca      420
ttcacctacc agaacgacaa actgaaaggc cgcgtagaag aatttgccgc tcaattgggt      480
tctgacatcg ttctgcagtg cgatgttgca gaagatgcca gcatcgacac catgttcgct      540
gaactgggga aagtttgcc gaaatttgac ggtttcgtac actctattgg ttttgacct      600
ggcgatcagc tggatggtga ctatgttaac gccgttacc gtgaaggctt caaaattgcc      660
cacgacatca gctcctacag cttcgttgca atggcaaaag cttgccgctc catgctgaat      720
ccgggttctg ccctgctgac cttttcctac cttggcgctg agcgcgctat cccgaactac      780
aacgttatgg gtctggcaaa agcgtctctg gaagcgaacg tgcgctatat ggcgaacgag      840
atgggtccgg aaggtgtgcg tgtaaacgcc atctctgctg gtccgatccg tactctggcg      900
gcttccggta tcaaagactt ccgcaaaatg ctggctcatt gcgaagccgt taccctgatt      960
cgccgtaccg ttactattga agatgtgggt aactctgcgg cattcctgtg ctccgatctc     1020
tctgccggtg tctccggtga agtagtccac gttgacggcg gtttcagcat cgctgcaatg     1080
aacgaactcg aactgaaata a                                     1101

```

5 <210> 22  
 <211> 5694  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> pCI-bla-fabI-LACK

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(5694)

<400> 22

# ES 2 747 748 T3

tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
ccacttgga gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg ccccctattg acgtcaatga	420
cggtaaattg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac	540
caatggcggt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg	660
cgatcgcgg ccccgttgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtgga ggtctatata	720
agcagagctc gtttagtgaa cgcgcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac	780
agttaaattg ctaacgcagt cagtgcttct gacacaacag tctogaactt aagctgcagt	840
gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa	900
ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact	960
cttgcgtttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac	1020

ES 2 747 748 T3

aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080  
 ataggctagc ctcgagaatt caccatgaac tacgagggtc acctgaaggg ccaccgcgga 1140  
 tgggtcacct ccctggcctg cccgcagcag gcggggctgt acatcaaggt ggtgtcgacg 1200  
 tcgcgcatg gcacggccat ctcgtggaaa gccaaccccg accgccacag cgtggacagc 1260  
 gactacggtc tgccgagcca ccgcctcgag ggccacaccg gcttcgtgtc gtgtgtgtcg 1320  
 ctggcccacg ccaccgacta cgcgctgacc gcgtcctggg accgctccat ccgcatgtgg 1380  
 gacctgcgca atggccagtg ccagcgcaag ttctgaagc acaccaagga cgtgctcgcc 1440  
 gtcgccttct cgcgggacga ccgcctgacg gtgtccggg gccgcgaaa cgtgatccgc 1500  
 gtgtggaacg tggcgggcca gtgcatgcac gagttcctgc gcgacggcca cgaggactgg 1560  
 gtgagcagca tctgtttctc gccgtcgctg gagcatccga tcgtggtgtc cggcagctgg 1620  
 gacaacacca tcaaggtatg gaacgtgaac gggggcaagt gtgagcgcac gctcaagggc 1680  
 cacagcaact acgtgtccac ggtgacggtg tcgccagacg ggtcgctgtg cgcgtccggc 1740  
 ggcaaggacg gcgcggcgct gctgtgggac ctgagcaccg gcgagcagct gttcaagatc 1800  
 aacgtggagt cgcctatcaa ccagatcgcc ttctcgcca accgcttctg gatgtgctc 1860  
 gcgacggaga ggtctctgtc cgtgtacgac ctggagagca aggtgtgat tgcggagctg 1920  
 acccgggacg gcgcgaagcc gtccgagtg atctccattg cctgggtccgc cgcaggcaac 1980  
 actctgtact ccggtcaciaa ggacaacctg atccgctgtt ggtccatctc cgcgcggag 2040  
 taactagagt cgaccggggc ggccgcttcc ctttagtgag ggttaatgct tcgagcagac 2100  
 atgataagat acattgatga gtttgacaaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc 2160  
 tttatgtgtg aaattgtga tgctattgct ttatgtgtaa ccattataag ctgcaataaa 2220  
 caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag 2280  
 gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa tccgataagg atcgatccgg 2340  
 gctggcgtaa tagcgaagag gccgcaccg atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga 2400  
 atggcgaatg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 2460  
 cagcgtgacc gctacacttg ccagcgttaa ttaagtgtg gagaatattc ggcaaggtct 2520  
 gaaccgtccc agccatcgcc atgaaagggg taggggctgt atgagcctgt ttgttgctgg 2580  
 ggtaaacaata tttgcacaat acgggtcccct cgccccctg gggagagggg tagggtgagg 2640  
 ggaaaagcgc cccccctgcc gcagcctgct ccggctcgac ctggcaacta tagctactca 2700  
 cagccaggtt gattataata accgtttatc tgttcgtact gtttactaaa acgacgaatc 2760  
 gcctgatttt caggcacaac aagcatcaac aataaggatt aaagctatgg gttttcttc 2820  
 cggtaagcgc attctggtaa ccgggtgttc cagcaacta tccatcgctt acggtatcgc 2880  
 tcagcgcatg caccgcgaag gagctgaact ggcattcacc taccagaacg acaaaactgaa 2940

ES 2 747 748 T3

aggccgcgta gaagaatttg ccgctcaatt gggttctgac atcgttctgc agtgcgatgt	3000
tgacagaagat gccagcatcg acaccatggt cgctgaactg gggaaagttt ggccgaaatt	3060
tgacggtttc gtacactcta ttggttttgc acctggcgat cagctggatg gtgactatgt	3120
taacgcggtt acccgtgaag gcttcaaaat tgcccacgac atcagctcct acagcttctg	3180
tgcaatggca aaagcttgcc gctccatgct gaatccgggt tctgccctgc tgaccctttc	3240
ctaccttgcc gctgagcgcg ctatcccga ctacaacgtt atgggtctgg caaaagcgtc	3300
tctggaagcg aacgtgcgct atatggcgaa cgcgatgggt ccggaagggt tgcgtgttaa	3360
cgccatctct gctggtcoga tccgtactct ggcggcttcc ggtatcaaag acttccgcaa	3420
aatgctggct cattgcgaag ccgttaccct gattcgcggt accgttacta ttgaagatgt	3480
gggtaactct gcggcattcc tgtgctcoga tctctctgcc ggtatctccg gtgaagtagt	3540
ccacgttgac ggcggtttca gcatcgctgc aatgaacgaa ctcgaactga aataattaat	3600
taaccgcgta ccgcgatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa	3660
gccagccccg acaccgcga acaccgcgtg acgcgccctg acgggcttgt ctgctccccg	3720
catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac	3780
cgatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctatct ttataggtta	3840
atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt cagggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg	3900
gaaccctat ttgtttatct ttctaaatac attcaaatac gtatccgctc atgagacaat	3960
aacctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc	4020
gtgtcgcctt tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct caccagaaa	4080
cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac	4140
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt tttccaatga	4200
tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggattatcc ccgtattgac gccgggcaag	4260
agcaactcgg tcgccgata cactattctc agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca	4320
cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca	4380
tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa	4440
ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg gaaccggagc	4500
tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat gcctgtagca atggcaacaa	4560
cgttgcgcaa actattaact gggaactac ttactctagc ttcccgcaa caattaatag	4620
actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg ctcgccctt ccggctggct	4680
ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac	4740
tggggccaga tggttaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg agtcaggcaa	4800

ES 2 747 748 T3

```

ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc ctcaactgatt aagcattggt      4860
aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat      4920
ttaaaaggat ctagggtgaag atcctttttg ataatctcat gacccaaatc ccttaacgtg      4980
agttttcggt ccaactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc      5040
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcggtagg      5100
tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag      5160
cgcagatacc aaatactgtc cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact      5220
ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctggt accagtggct gctgccagtg      5280
gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc      5340
ggtcgggctg aacggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg      5400
aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac gttcccga gggagaaagg      5460
cggacaggtg tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag      5520
ggggaaaacg ctggtatcct tatagtctcg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc      5580
gatttttgtg atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct      5640
ttttacgggt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat ggctcgacag atct          5694

```

```

<210> 23
<211> 4828
5 <212> ADN
  <213> Secuencia artificial

```

```

<220>
10 <223> pPAL-LACK

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (1) .. (4828)

```

```

15 <400> 23
   tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta      60
   ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc      120
   aatatgaccg ccatgttggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg      180
   gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc      240
   gcctggctga ccgccaacg acccccgcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat      300
   agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc      360
   ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcc cccctattg acgtcaatga      420
   cggtaaatgg ccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg      480
   gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatgggtg atgcggtttt ggcagtacac      540

```

ES 2 747 748 T3

caatgggctt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt 600  
 caatgggagt ttgttttggc accaaaaatca acgggacttt ccaaaatgtc gtaacaactg 660  
 cgatcgcgcc ccccggtgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata 720  
 agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgcggg agtttatcac 780  
 agttaaattg ctaacgcagt cagtgcctct gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt 840  
 gactctctta aggtagcctt gcagaagtgt gtcgtgaggg actgggcagg taagtatcaa 900  
 ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960  
 cttgcgcttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020  
 aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080  
 ataggctagc ctcgagaatt caccatgaac tacgaggggc acctgaaggg ccaccgcgga 1140  
 tgggtcacct ccctggcctg cccgcagcag gcggggctgt acatcaaggg ggtgtcgacg 1200  
 tcgcgcgatg gcacggccat ctcgtggaaa gccaaacccg accgccacag cgtggacagc 1260  
 gactacggtc tgccgagcca ccgcctcgag ggccacaccg gcttcgtgtc gtgtgtgtcg 1320  
 ctggcccacg ccaccgacta cgcgctgacc gcgtcctggg accgctccat ccgcatgtgg 1380  
 gacctgcgca atggccagtg ccagcgcaag ttctgaagc acaccaagga cgtgctcgcc 1440  
 gtcgccttct cgcgggacga ccgcctgacg gtgtccggg gcgcgcgaaa cgtgatccgc 1500  
 gtgtggaacg tggcgggcca gtgcatgcac gagttcctgc gcgacggcca cgaggactgg 1560  
 gtgagcagca tctgtttctc gccgtcgctg gagcatccga tcgtggtgtc cggcagctgg 1620  
 gacaacacca tcaaggtatg gaacgtgaac gggggcaagt gtgagcgcac gctcaagggc 1680  
 cacagcaact acgtgtccac ggtgacgggtg tcgccagacg ggtcgtgtg cgcgtccggc 1740  
 ggcaaggacg gcgcggcgct gctgtgggac ctgagcaccg gcgagcagct gttcaagatc 1800  
 aacgtggagt cgcctatcaa ccagatcgcc ttctcgcca accgcttctg gatgtgcgtc 1860  
 gcgacggaga ggtctctgtc cgtgtacgac ctggagagca aggtgtgat tgcggagctg 1920  
 acgccggacg gcgcgaagcc gtccgagtgc atctccattg cctgggtccg cgacggcaac 1980  
 actctgtact ccggtcacaa ggacaacctg atccgcgtgt ggtccatctc cgacgccgag 2040  
 taactagagt cgaccggggc ggccgcttcc ctttagtgag ggttaatgct tcgagcagac 2100  
 atgataagat acattgatga gtttgacaaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc 2160  
 tttatgtgtg aaattgtgta tgctattgct ttatgtgtaa ccattataag ctgcaataaa 2220  
 caagttaaca acaacaattg cattcatttt atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag 2280  
 gttttttaa gcaagtaaaa cctctacaaa tgtggtaaaa tccgataagg atcgatccgg 2340  
 gctggcgtaa tagcgaagag gccgcaccg atgccttcc ccaacagttg cgcagcctga 2400  
 atggcgaatg gacgcgccct gtagcggcgc attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg 2460

ES 2 747 748 T3

cagcgtgacc gctacacttg ccagcgtaa ttaagtctg gagaatattc ggcaaggtct 2520  
 gaaccgtccc agccatcgcc atgaaagggt taggggctgt atgagcctgt ttgttgctgg 2580  
 ggtaacaata tttgcacaat acggtcccct cgcccctctg gggagagggt tagggtgagg 2640  
 ggaaaagcgc cccccctgcc gcagcctgct ccggtcggac ctggcaacta tagctactca 2700  
 cagccaggtt gattataata accgtttatc tgttcgtact gtttactaaa acgacgaatc 2760  
 gcctgatttt caggcacaac aagcatcaac aataaggatt aaagctatgg gttttctttc 2820  
 cggtaagcgc attctggtaa ccggtgttgc cagcaacta tccatcgctc acggtatcgc 2880  
 tcaggcgatg caccgcgaag gagctgaact ggcattcacc taccagaacg acaaactgaa 2940  
 aggccgcgta gaagaatttg ccgctcaatt gggttctgac atcgttctgc agtgcgatgt 3000  
 tgcagaagat gccagcatcg acaccatggt cgctgaactg gggaaagtth ggccgaaatt 3060  
 tgacggtttc gtacactcta ttggttttgc acctggcgat cagctggatg gtgactatgt 3120  
 taacgccgtt acccgtgaag gttcaaaat tgcccacgac atcagctcct acagcttctg 3180  
 tgcaatggca aaagcttgcc gctccatgct gaatccgggt tctgccctgc tgaccctttc 3240  
 ctaccttggc gctgagcgcg ctatcccga ctacaacgtt atgggtctgg caaaagcgtc 3300  
 tctggaagcg aacgtgctc atatggcgaa cgcgatgggt ccggaaggtg tgcgtgtaa 3360  
 cgccatctct gctggtccga tccgtactct ggcggttcc ggtatcaaag acttccgcaa 3420  
 aatgtggct cattgcgaag ccgttaccct gattcgccgt accgttacta ttgaagatgt 3480  
 gggtaactct gcggcattcc tgtgctccga tctctctgcc ggtatctccg gtgaagtagt 3540  
 ccacgttgac ggcggtttca gcatcgctgc aatgaacgaa ctogaactga aataattaat 3600  
 taaccgcgta tggtgactc tcagtacaat ctgctctgat gccgcatagt taagccagcc 3660  
 ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggt tgtctgctcc cggcatccgc 3720  
 ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctcatgtgtc agaggttttc acaagttgca 3780  
 ggaccacttc tgcgctcggc ccttccggct ggctggttta ttgctgataa atctggagcc 3840  
 ggtgagcgtg ggtctcgcgg tatcattgca gcactggggc cagatggtaa gccctcccgt 3900  
 atcgtagtta tctacacgac ggggagtcag gcaactatgg atgaacgaaa tagacagatc 3960  
 gctgagatag gtgcctcact gattaagcat tggtaactgt cagaccaagt ttactcatat 4020  
 atactttaga ttgatttaaa acttcatttt taatttaaaa ggatctaggt gaagatcctt 4080  
 tttgataatc tcatgaccaa aatcccctaa cgtgagtttt cgttccactg agcgtcagac 4140  
 cccgtagaaa agatcaaagg atcttcttga gatccttttt ttctgcgctg aatctgctgc 4200  
 ttgcaaacaa aaaaaccacc gctaccagcg gtgggttgtt tgccggatca agagctacca 4260  
 actctttttc cgaaggtaac tggcttcagc agagcgcaga taccaaatac tgtccttcta 4320

ES 2 747 748 T3

	gtgtagccgt agttaggccca ccacttcaag aactctgtag caccgcctac atacctcgct	4380
	ctgctaatacc tgttaccagt ggctgctgcc agtggcgata agtcgtgtct taccgggttg	4440
	gactcaagac gatagttacc ggataaggcg cagcggtcgg gctgaacggg gggttcgtgc	4500
	acacagccca gcttggagcg aacgacctac accgaactga gatacctaca gcgtgagcta	4560
	tgagaaagcg ccacgcttcc cgaagggaga aaggcggaca ggtatccggt aagcggcagg	4620
	gtcggaaacag gagagcgcac gagggagctt ccagggggaa acgcctggta tctttatagt	4680
	cctgtcgggt ttcgccacct ctgacttgag cgtcgatttt tgtgatgctc gtcagggggg	4740
	cggagcctat ggaaaaacgc cagcaacgcg gcctttttac ggttcctggc cttttgctgg	4800
	ccttttgctc acatggctcg acagatct	4828
	<210> 24	
	<211> 3899	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> pPAL	
10	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(3899)	
15	<400> 24	
	tcaatattgg ccattagcca tattattcat tggttatata gcataaatca atattggcta	60
	ttggccattg catacgttgt atctatatca taatatgtac atttatattg gctcatgtcc	120
	aatatgaccg ccattgtggc attgattatt gactagttat taatagtaat caattacggg	180
	gtcattagtt catagcccat atatggagtt ccgcgttaca taacttacgg taaatggccc	240
	gcctggctga ccgccaacg acccccggcc attgacgtca ataatgacgt atgttcccat	300
	agtaacgccca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc	360
	ccacttgcca gtacatcaag tgtatcatat gccaaagtcg cccctattg acgtcaatga	420
	cggtaaatgg cccgcctggc attatgccca gtacatgacc ttacgggact ttcctacttg	480
	gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtg atgcggtttt ggcagtacac	540
	caatgggagt ggatagcggg ttgactcacg gggatttcca agtctccacc ccattgacgt	600
	caatgggagt ttgttttggc accaaaatca acgggacttt ccaaaatgac gtaacaactg	660
	cgatcgcccg ccccggtgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacgggtggga ggtctatata	720
	agcagagctc gtttagtgaa ccgtcagatc actagaagct ttattgaggc agtttatcac	780
	agttaaattg ctaacgcagt cagtgccttc gacacaacag tctcgaactt aagctgcagt	840
	gactctctta aggtagcctt gcagaagttg gtcgtgaggc actgggcagg taagtatcaa	900

ES 2 747 748 T3

ggttacaaga caggtttaag gagaccaata gaaactgggc ttgtcgagac agagaagact 960  
 cttgcgtttc tgataggcac ctattggtct tactgacatc cactttgcct ttctctccac 1020  
 aggtgtccac tcccagttca attacagctc ttaaggctag agtacttaat acgactcact 1080  
 ataggctagc ctcgagaatt cacgcgtggg acctctagag tcgacccggg cggccgcttc 1140  
 cctttagtaga ggggttaatgc ttcgagcaga catgataaga tacattgatg agtttgaca 1200  
 aaccacaact agaatgcagt gaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc 1260  
 tttatttga accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt 1320  
 tatgtttcag gttcaggggg agatgtggga ggttttttaa agcaagtaaa acctctaaa 1380  
 atgtggtaaa atccgataag gatcgatccg ggctggcgtg atagcgaaga ggcccgcacc 1440  
 gatcgccctt cccaacagtt gcgcagcctg aatggcgaat ggacgcgccc tgtagcggcg 1500  
 cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgtta 1560  
 attaagtgtc ggagaatatt cggcaaggtc tgaaccgtcc cagccatcgc catgaaaggg 1620  
 ttaggggctg tatgagcctg tttgttgctg gggtaacaat atttgacaaa tacggtcccc 1680  
 tcgcccctct ggggagaggg ttagggtag gggaaaagcg cccccctgc cgcagcctgc 1740  
 tccggtcga cctggcaact atagctactc acagccaggt tgattataat aaccgtttat 1800  
 ctgttcgtac tgtttactaa aacgacgaat cgctgattt tcaggcacia caagcatcaa 1860  
 caataaggat taaagctatg ggttttcttt ccggtaagcg cattctggtg accgggtgtg 1920  
 ccagcaaact atccatcgcc tacggtatcg ctccagcgtg gcaccgcgaa ggagctgaac 1980  
 tggcattcac ctaccagaac gacaaaactga aaggccgctg agaagaattt gccgctcaat 2040  
 tgggttctga catcgttctg cagtgcgatg ttgcagaaga tgccagcacc gacaccatgt 2100  
 tcgctgaact ggggaaagtt tggccgaaat ttgacggttt cgtacactct attgggtttg 2160  
 cacctggcga tcagctggat ggtgactatg ttaacgcctg taccctgaa ggcttcaaaa 2220  
 ttgcccacga catcagctcc tacagcttgc ttgcaatggc aaaagcttgc cgtccatgc 2280  
 tgaatccggg ttctgccctg ctgacccttt cctaccttgg cgtgagcgc gctatcccga 2340  
 actacaacgt tatgggtctg gcaaaaagct ctctggaagc gaacgtgcgc tatatggcga 2400  
 acgcgatggg tccggaagggt gtgctgtgta acgccatctc tgctggccg atccgtactc 2460  
 tggcgcttc cggtatcaaa gacttccgca aaatgctggc tcattgcgaa gccgttacc 2520  
 cgattcgccg taccgttact attgaagatg tgggtaactc tgccgcatc ctgtgctccg 2580  
 atctctctgc cggtatctcc ggtgaagtag tccacgttga cggcggtttc agcatcctg 2640  
 caatgaacga actcgaactg aaataattaa ttaaccgctg atggtgcaact ctccagtcaa 2700  
 tctgctctga tgccgcatag ttaagccagc cccgacaccc gccaacaccc gctgacgcgc 2760  
 cctgacgggc ttgtctgctc ccggcatccg cttacagaca agctgtgacc gtctccggga 2820

ES 2 747 748 T3

gctcatgtgt cagaggtttt cacaagttgc aggaccactt ctgcgctcgg cccttccggc 2880  
 tggctggttt attgctgata aatctggagc cggtagcgt gggctctcgg gtatcattgc 2940  
 agcactgggg ccagatggta agccctcccg tatcgtagtt atctacacga cggggagtca 3000  
 ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca 3060  
 ttggtaactg tcagaccaag tttactcata tatactttag attgatttaa aacttcattt 3120  
 ttaattttaa aggatctagg tgaagatcct ttttgataat ctcatgacca aaatccctta 3180  
 acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg 3240  
 agatcctttt tttctgcgcg taatctgctg cttgcaaaca aaaaaaccac cgctaccagc 3300  
 ggtggtttgt ttgccggatc aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag 3360  
 cagagcgcag ataccaaata ctgtccttct agtgtagccg tagttaggcc accacttcaa 3420  
 gaactctgta gcaccgccta catacctcgc tctgctaate ctggtaccag tggctgctgc 3480  
 cagtggcgat aagtogtgtc ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaaggc 3540  
 gcagcggtcg ggctgaacgg ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgaccta 3600  
 caccgaactg agatacctac agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaaggag 3660  
 aaaggcggac aggtatccgg taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgca cgagggagct 3720  
 tccaggggga aacgcctggt atctttatag tcctgtcggg tttcgccacc tctgacttga 3780  
 gcgtcgattt ttgtgatgct cgtcaggggg gcggagccta tggaaaaacg ccagcaacgc 3840  
 ggccttttta cggttcctgg ccttttgctg gccttttgct cacatggctc gacagatct 3899

<210> 25

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador directo de Leish-1

10

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

15

<400> 25

aactttctg gtctccggg tag

23

<210> 26

<211> 17

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador inverso de Leish-2

25

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(17)

30

<400> 26

acccccagtt tccgcc

17

<210> 27

<211> 18

35

<212> ADN

# ES 2 747 748 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda de Leish-P

5

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(18)

10

<400> 27

aaaaatgggt gcagaaat

18

**REIVINDICACIONES**

1. Secuencia de polinucleótidos que comprende:
  - 5 a. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 1 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 1; o
  - 10 b. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 2 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 2,

para su uso como un adyuvante de vacuna.
- 15 2. Secuencia de polinucleótidos para su uso según la reivindicación 1, en la que dicha secuencia de polinucleótidos comprende además una secuencia de ácidos nucleicos que codifica uno o más antígenos,
3. Secuencia de polinucleótidos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en la que dicho polinucleótido comprende:
  - 20 a) una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 3 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 3; o
  - 25 b) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 4 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 4.
4. Secuencia de polinucleótidos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dichas secuencias de ácidos nucleicos están operativamente ligadas a secuencias de control.
- 30 5. Secuencia de polinucleótidos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polinucleótido es un plásmido, en la que dicho plásmido es un ADN bacteriano circular o lineal.
6. Secuencia de polinucleótidos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el polinucleótido se caracteriza por la ausencia de genes de resistencia a antibiótico.
- 35 7. Secuencia de polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además:
  - 40 i. una secuencia de ácidos nucleicos que consiste en SEC ID N°: 5 o una secuencia con al menos el 85 % de identidad con la secuencia de ácidos nucleicos de SEC ID N°: 5; o
  - ii. una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID N°: 6 o una secuencia de aminoácidos con al menos el 90 % de identidad con SEC ID N°: 6.
- 45 8. Secuencia de polinucleótidos según la reivindicación 7, en la que el polinucleótido es el plásmido pPAL-LACK de SEC ID N°: 23.
9. Secuencia de polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, para su uso como un medicamento.
- 50 10. Composición farmacéutica que comprende una secuencia de polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende además un vehículo, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 55 11. Secuencia de polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8, o composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso un tratamiento terapéutico o profiláctico que induce o que potencia una respuesta inmunitaria del sujeto mamífero.
- 60 12. Secuencia de polinucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, secuencia de polinucleótidos según las reivindicaciones 7 u 8, o composición farmacéutica que los comprende, para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de leishmaniosis.
13. Secuencias de polinucleótidos o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en las que dicha leishmaniosis es leishmaniosis canina.
- 65 14. Secuencias de polinucleótidos o composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en las que la pauta de administración es una pauta de sensibilización-refuerzo

homóloga.

- 5 15. Método para la obtención de anticuerpos que comprende la inmunización de un mamífero distinto de un humano con el polinucleótido según las reivindicaciones 7 u 8, o composición farmacéutica según la reivindicación 10.

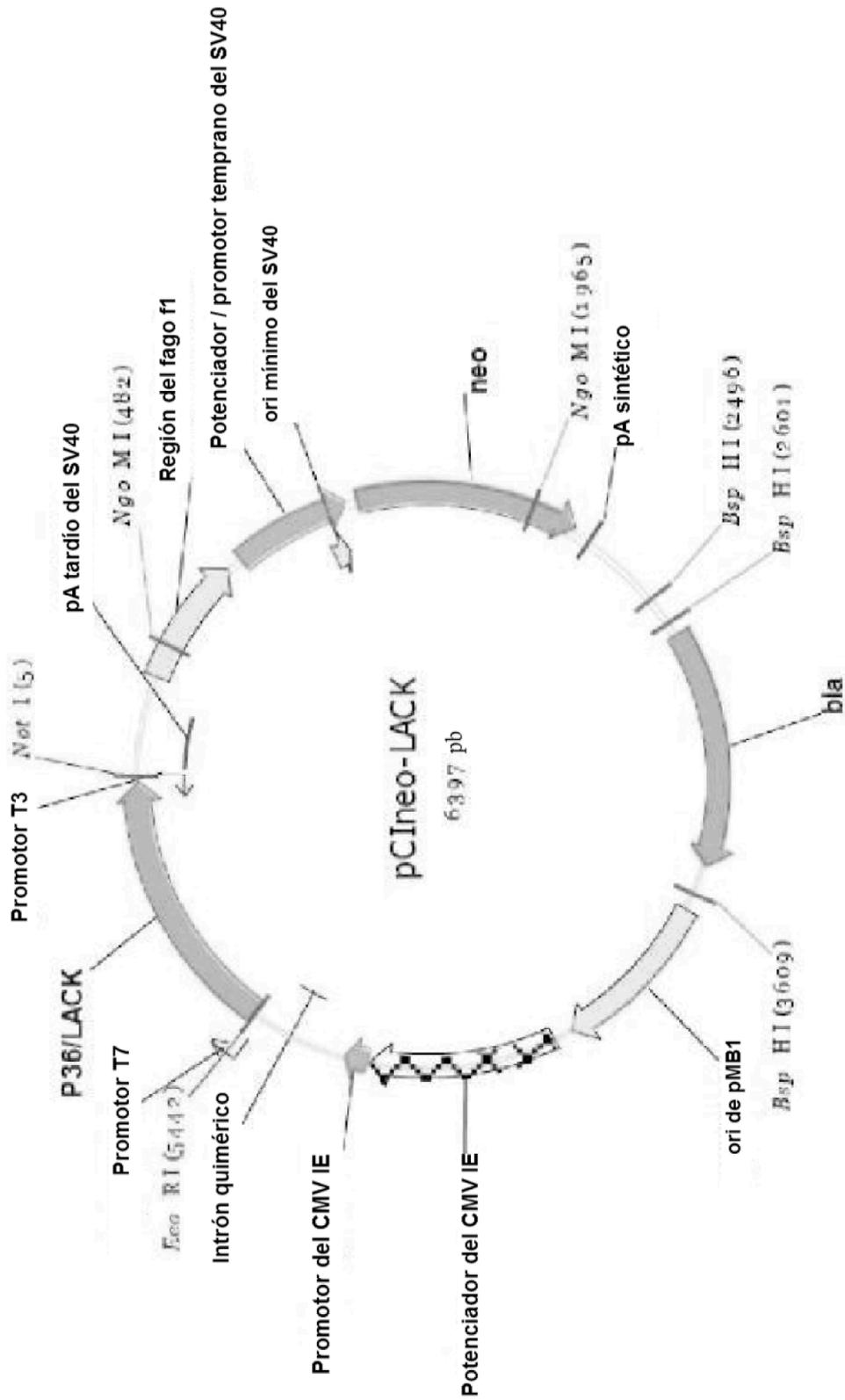


FIG. 1

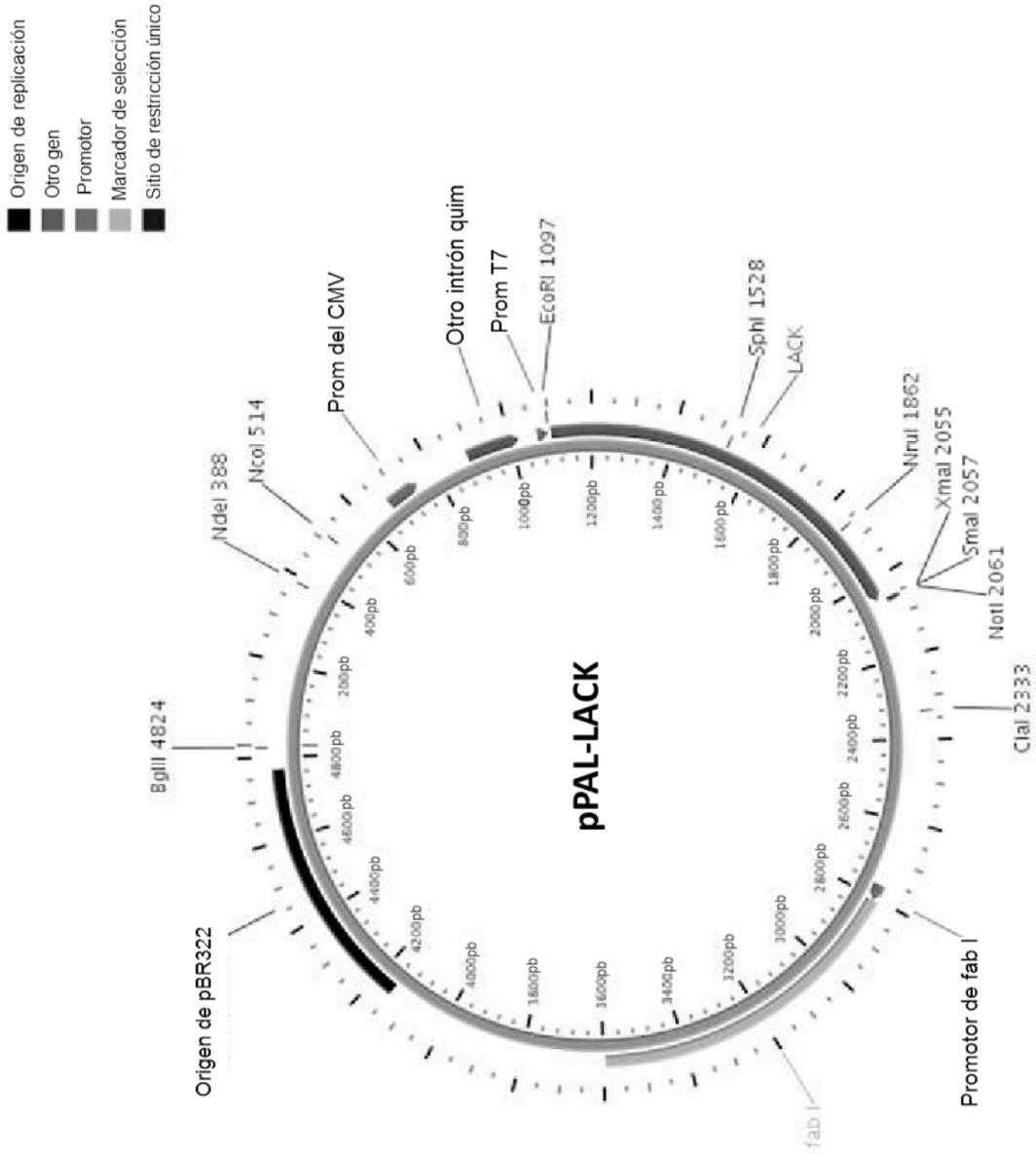


FIG. 2

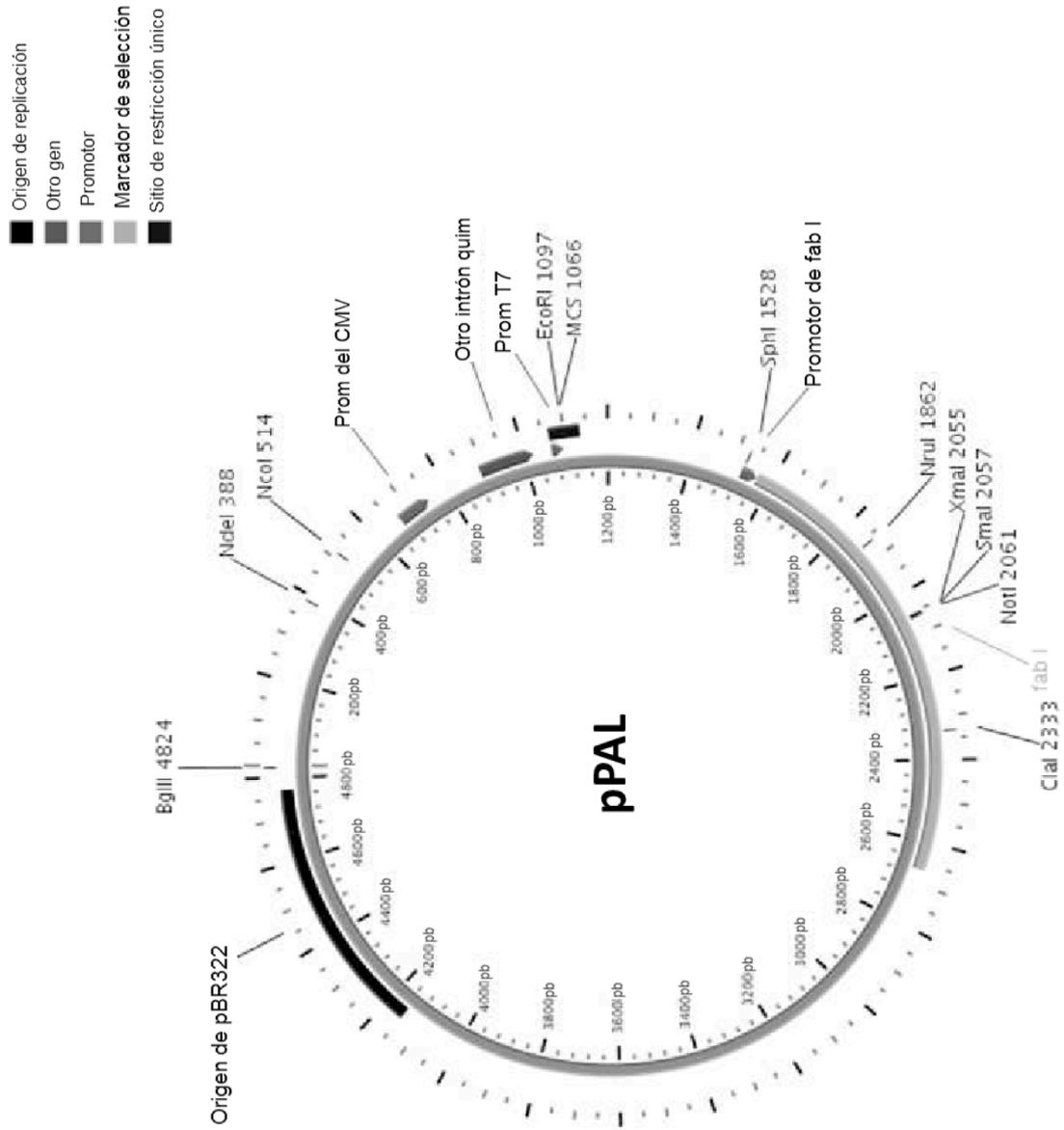
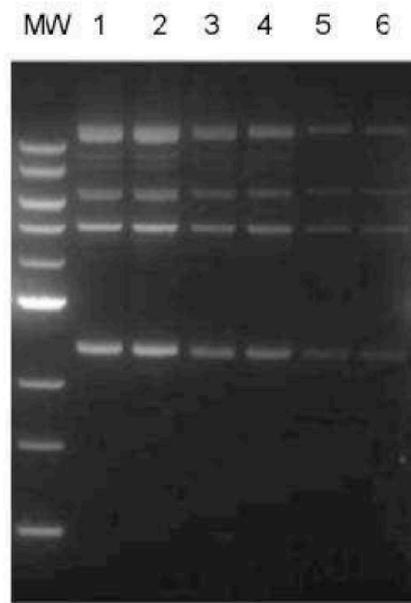


FIG. 3

A)



B)

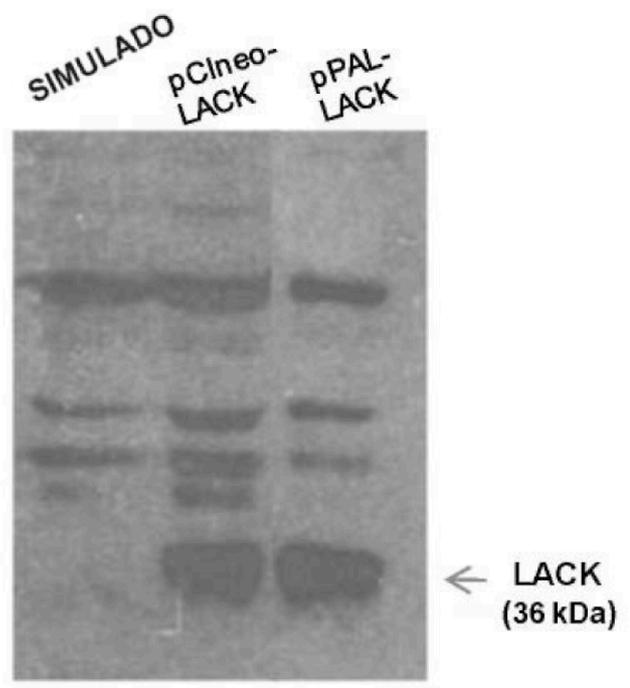


FIG. 4

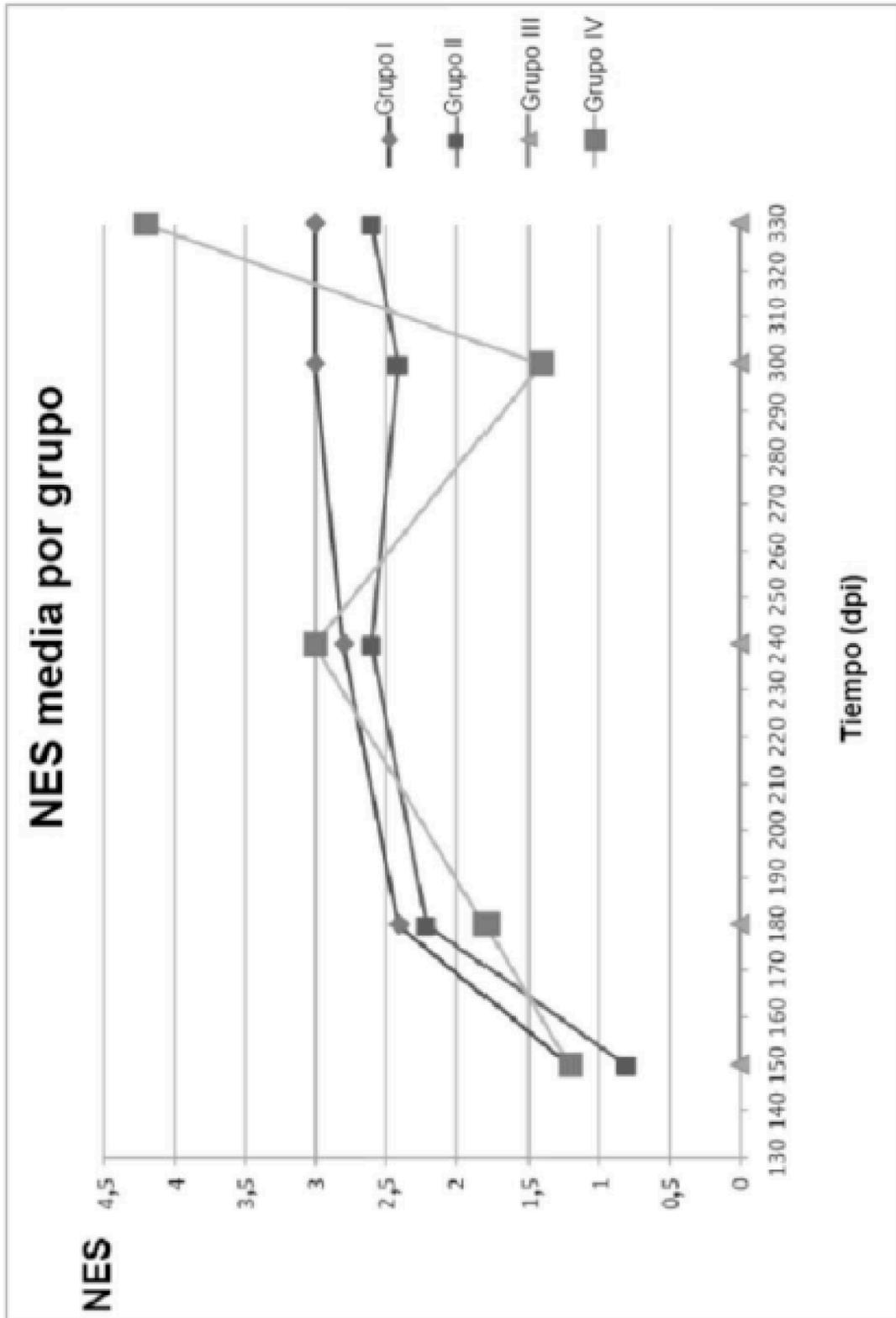


FIG. 5

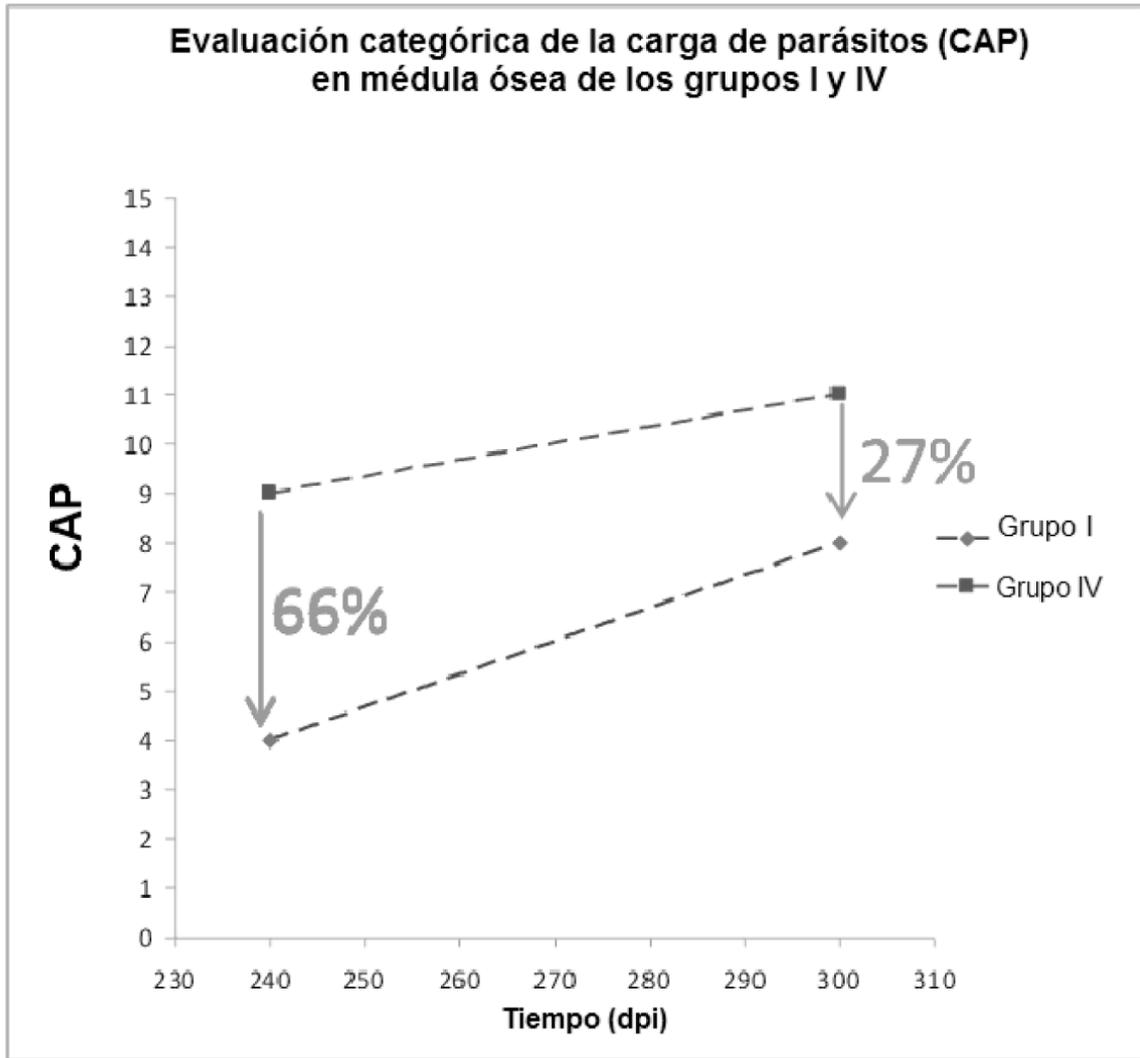


FIG. 6

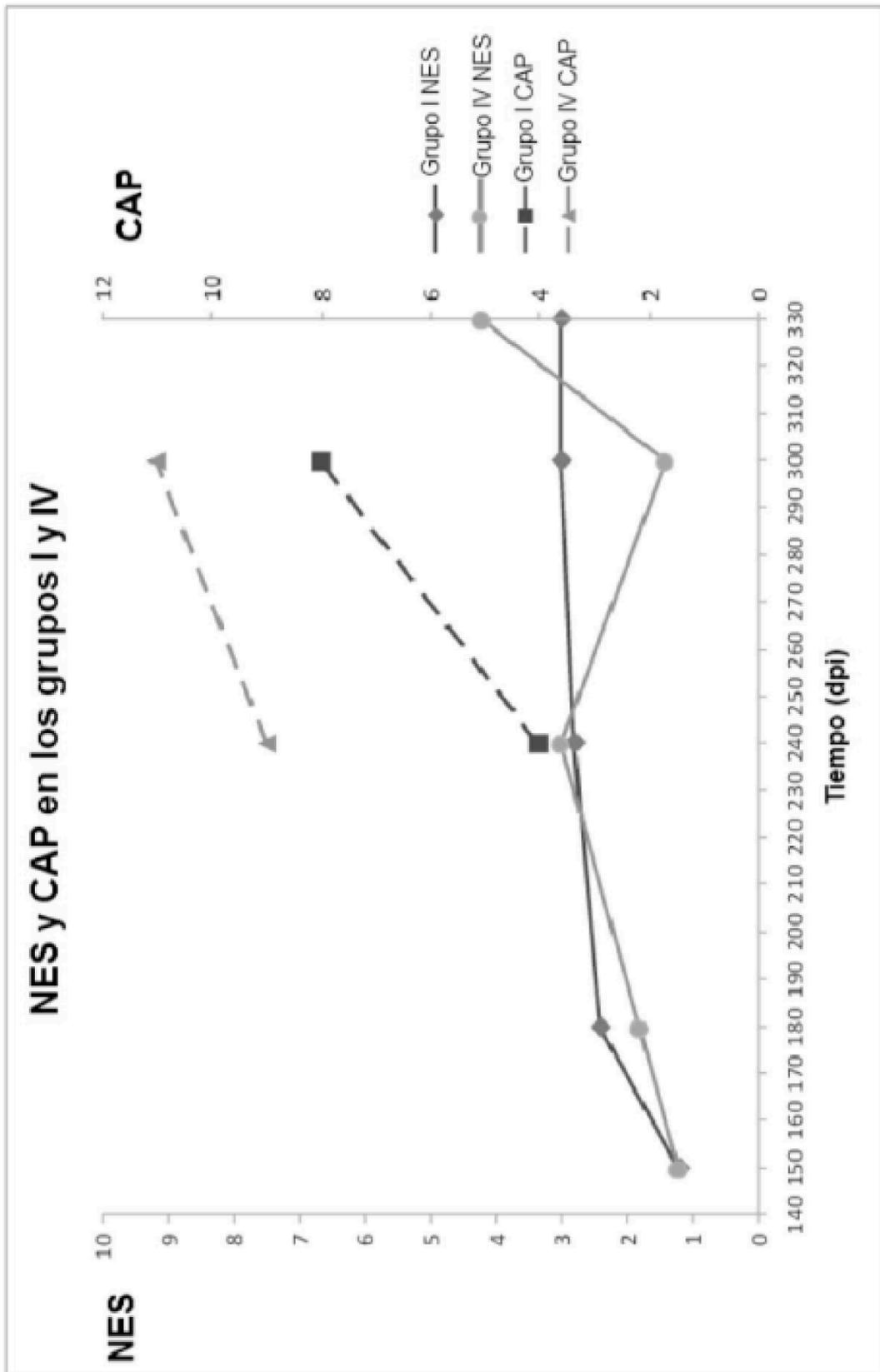


FIG. 7

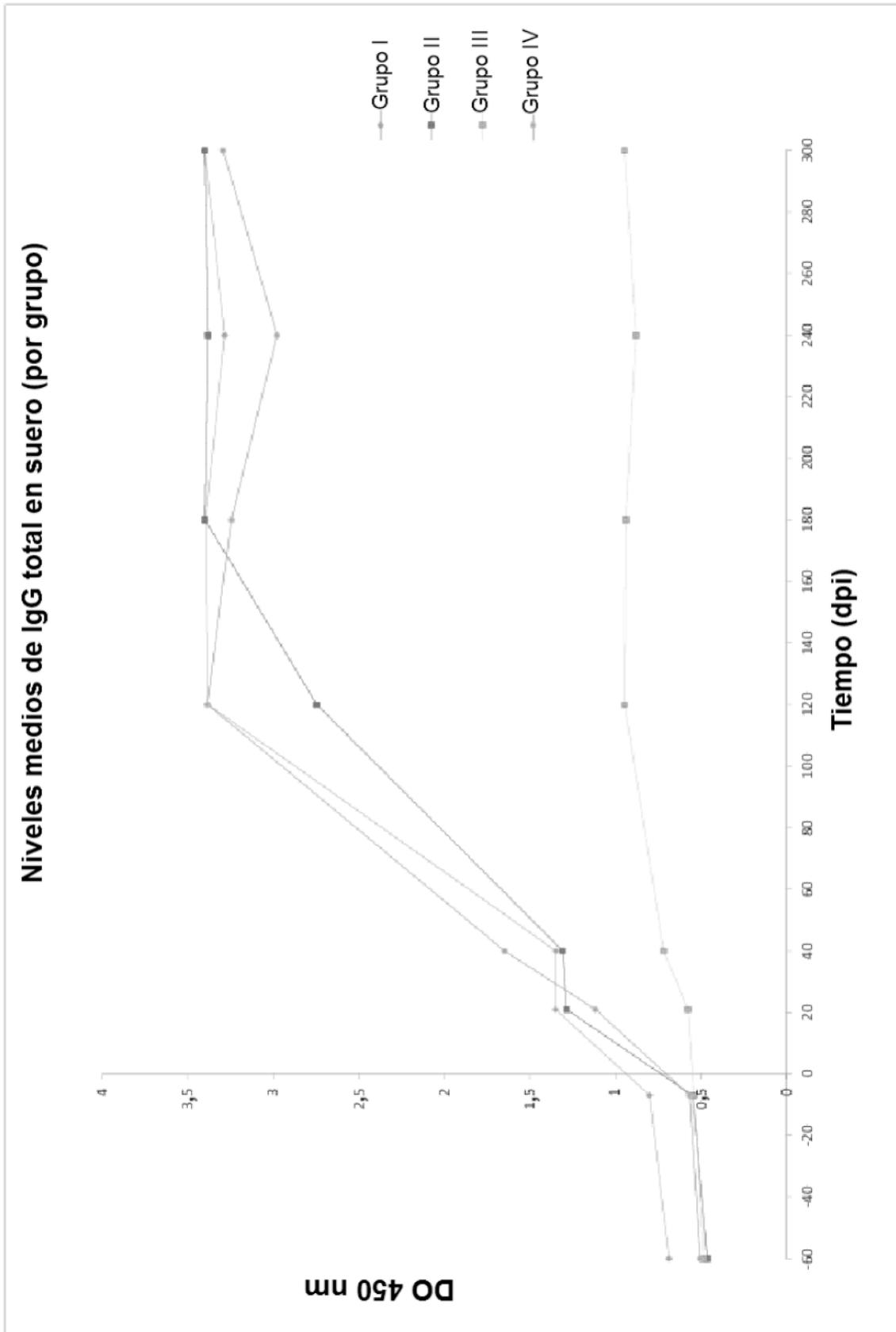


FIG. 8

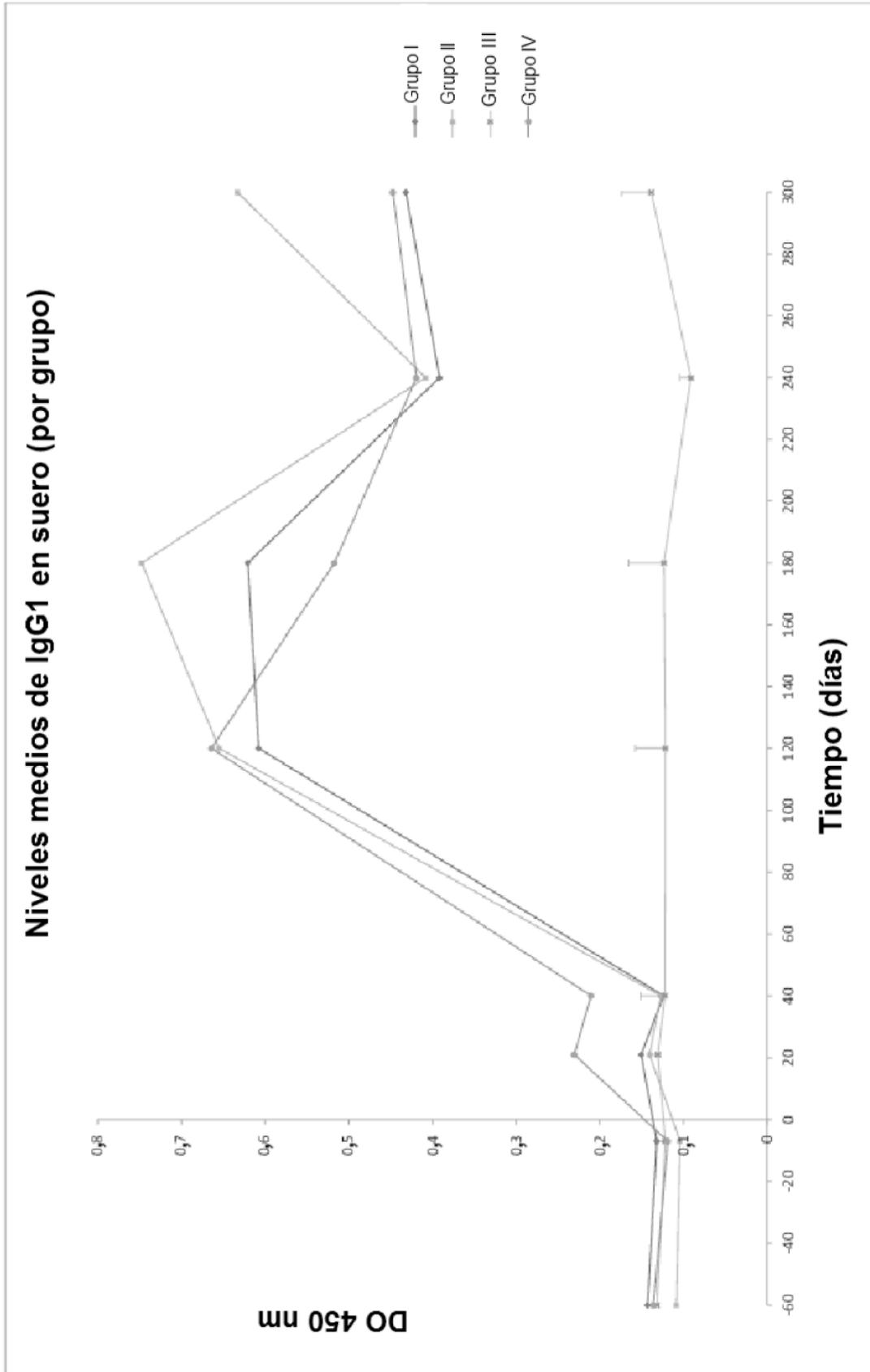


FIG. 9

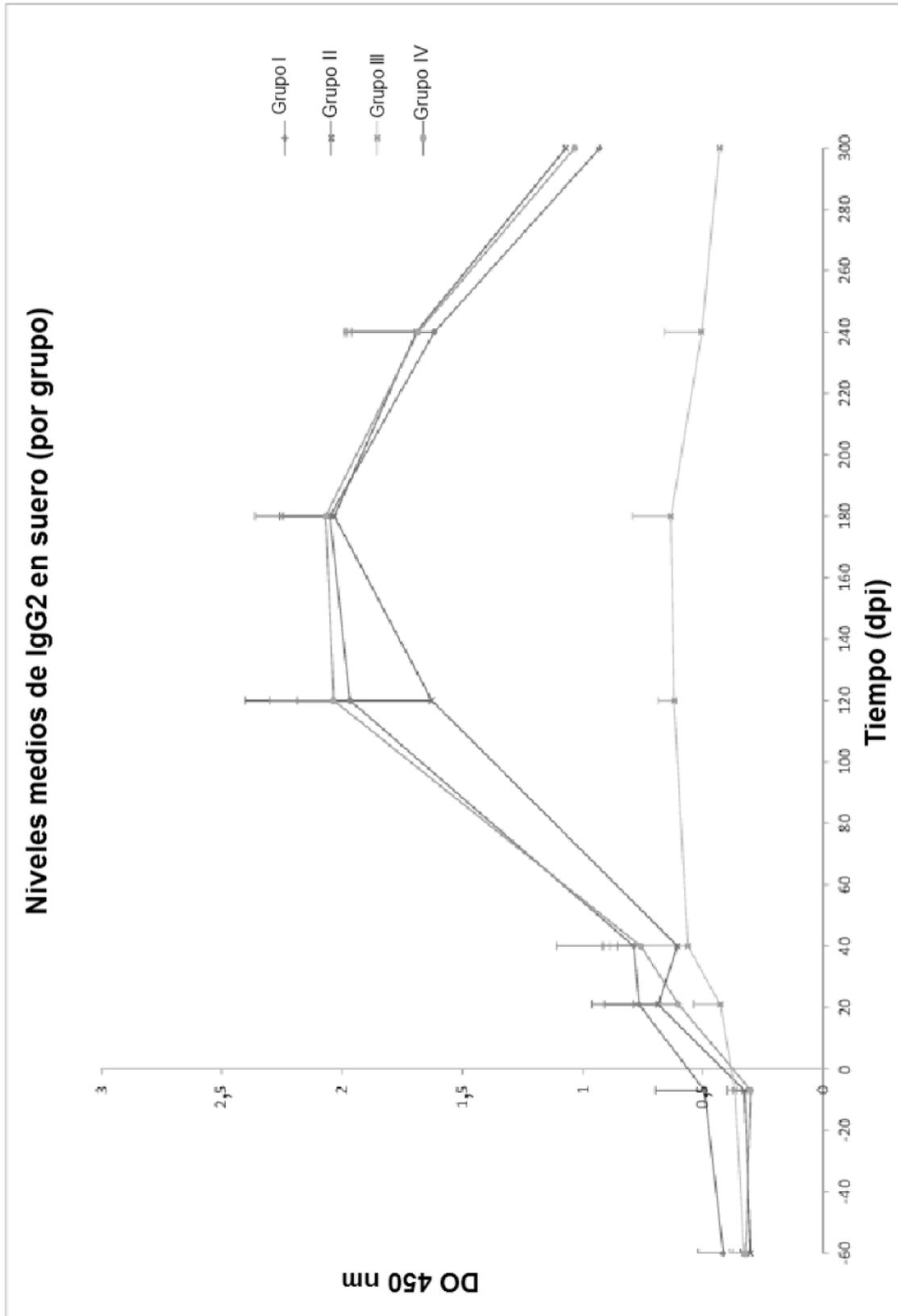


FIG. 10

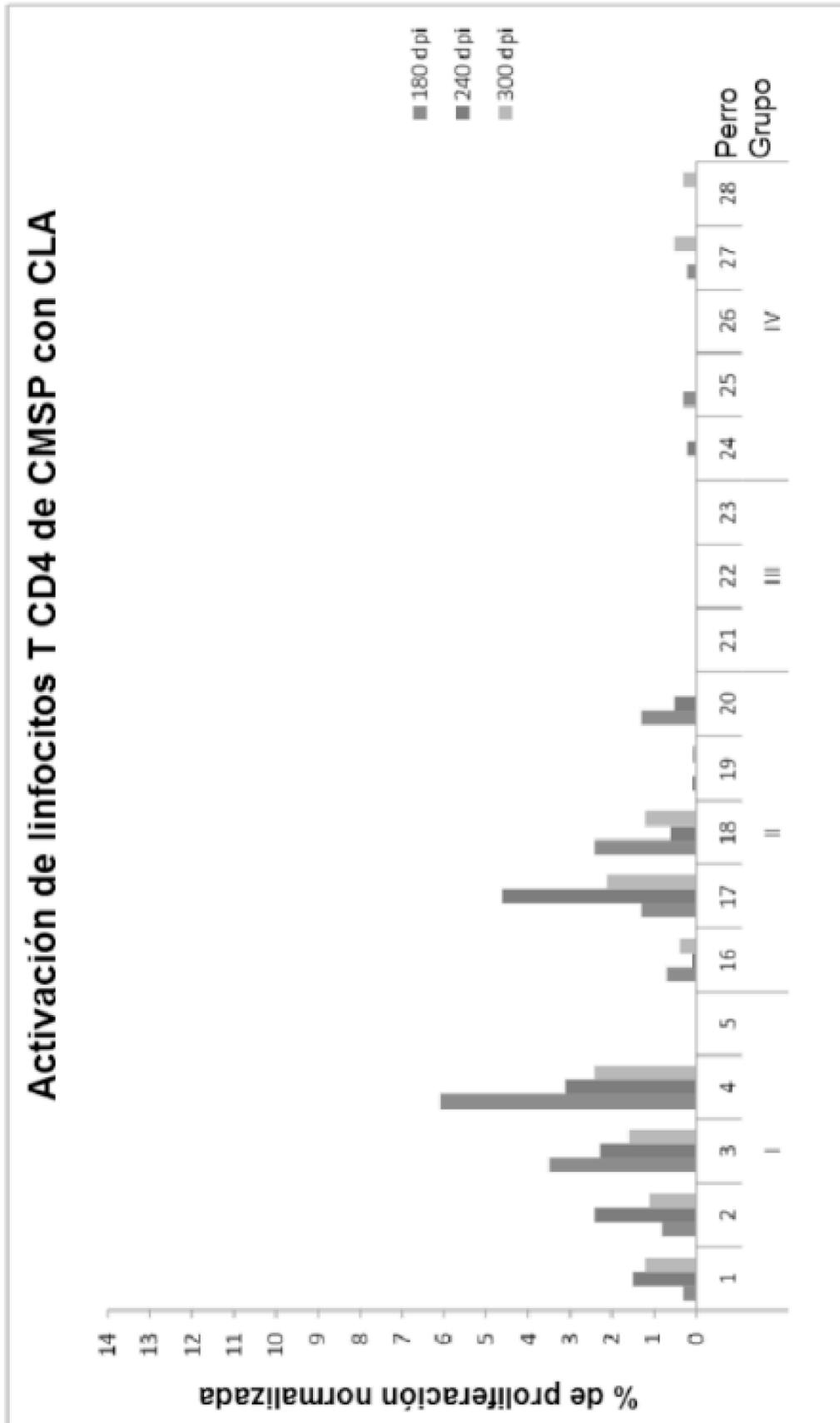


FIG. 11

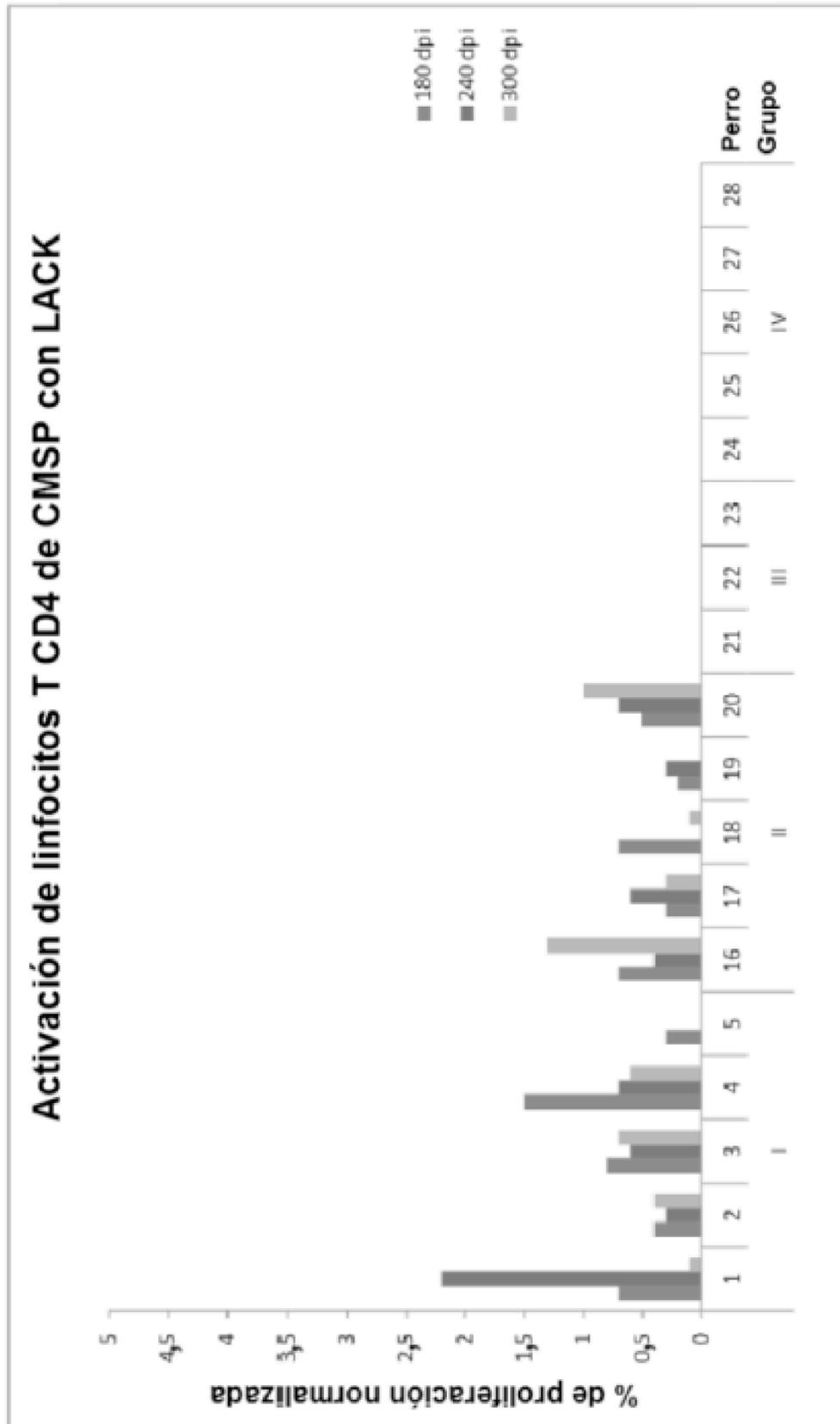


FIG. 12

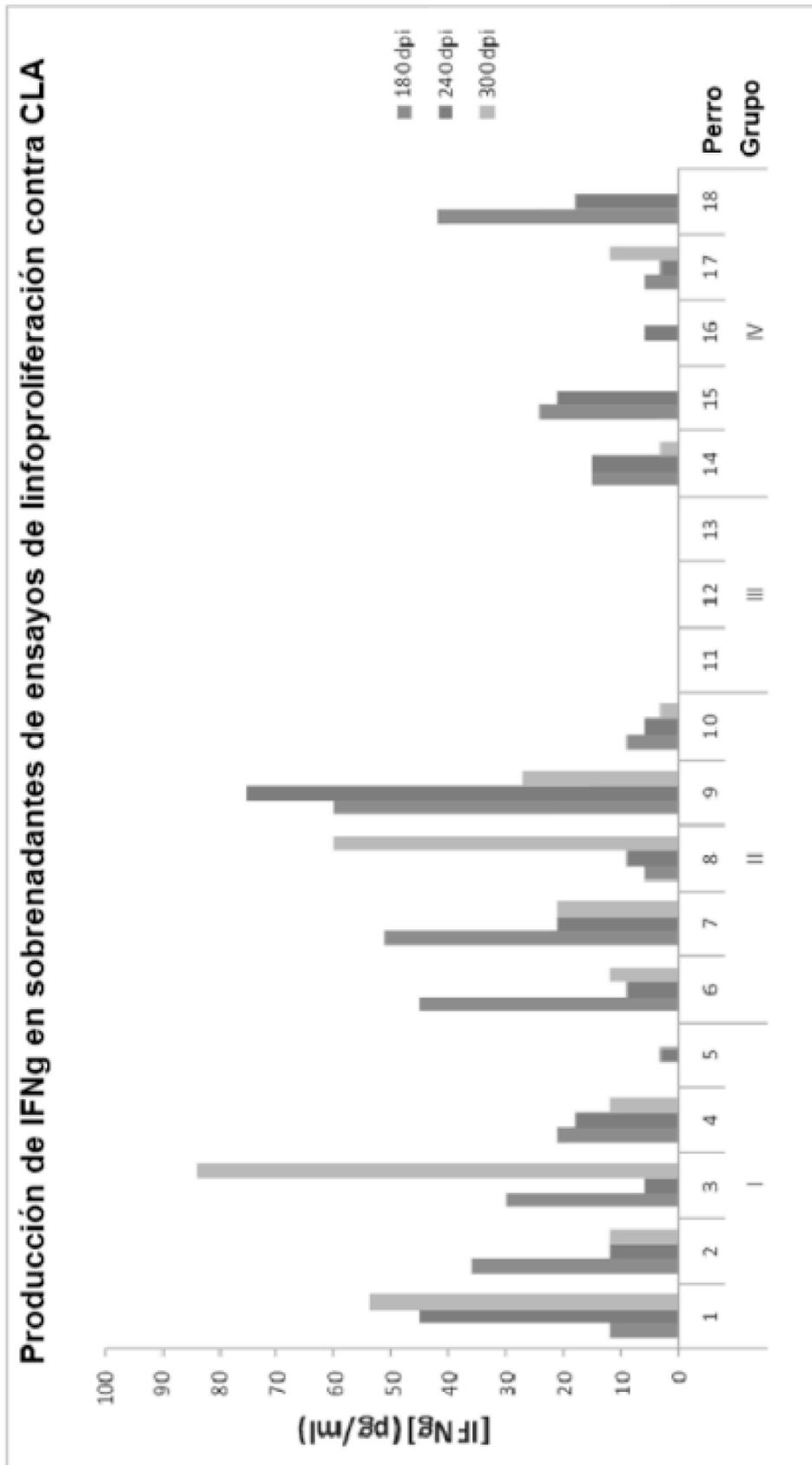


FIG. 13

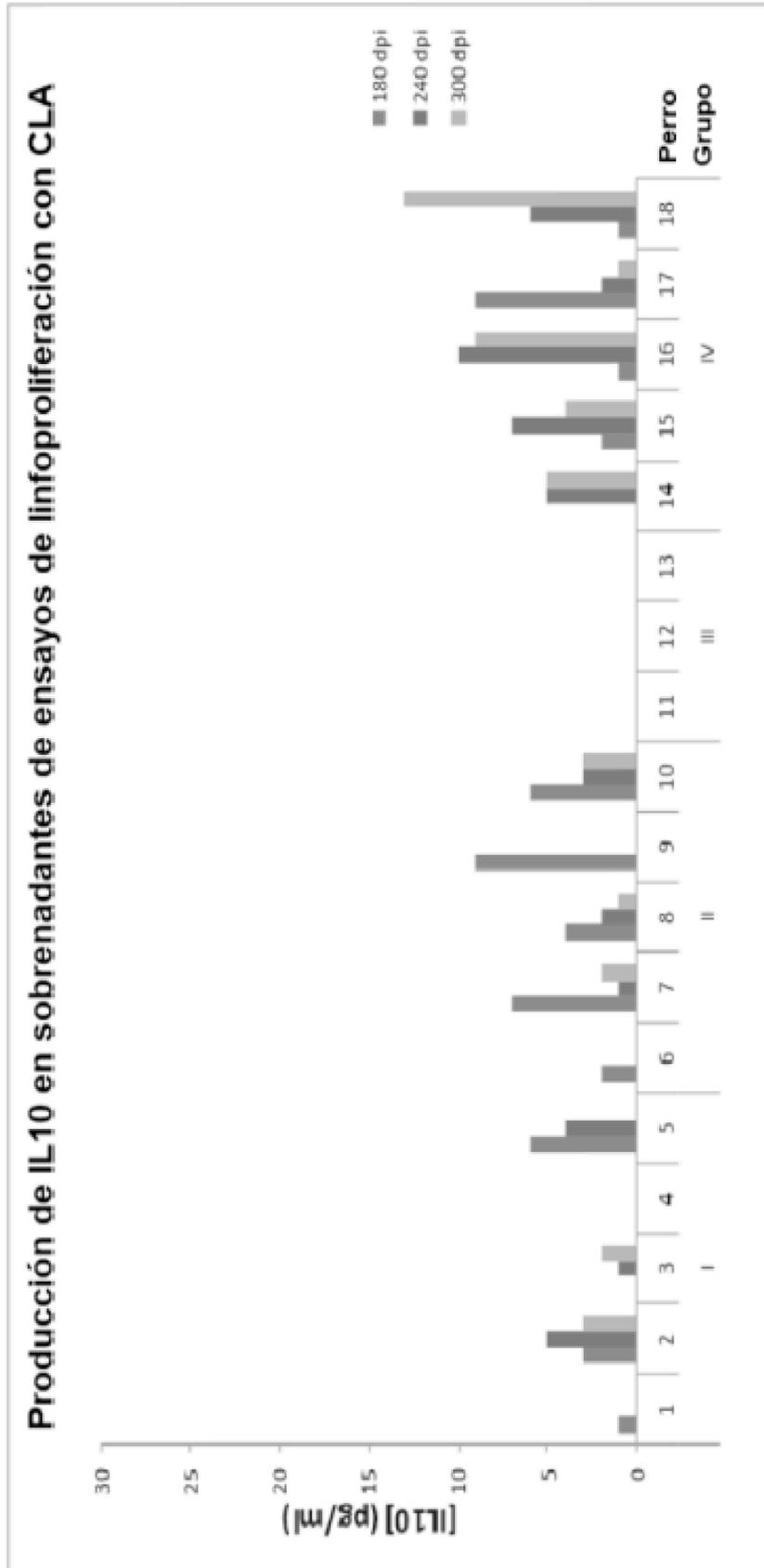


FIG. 14

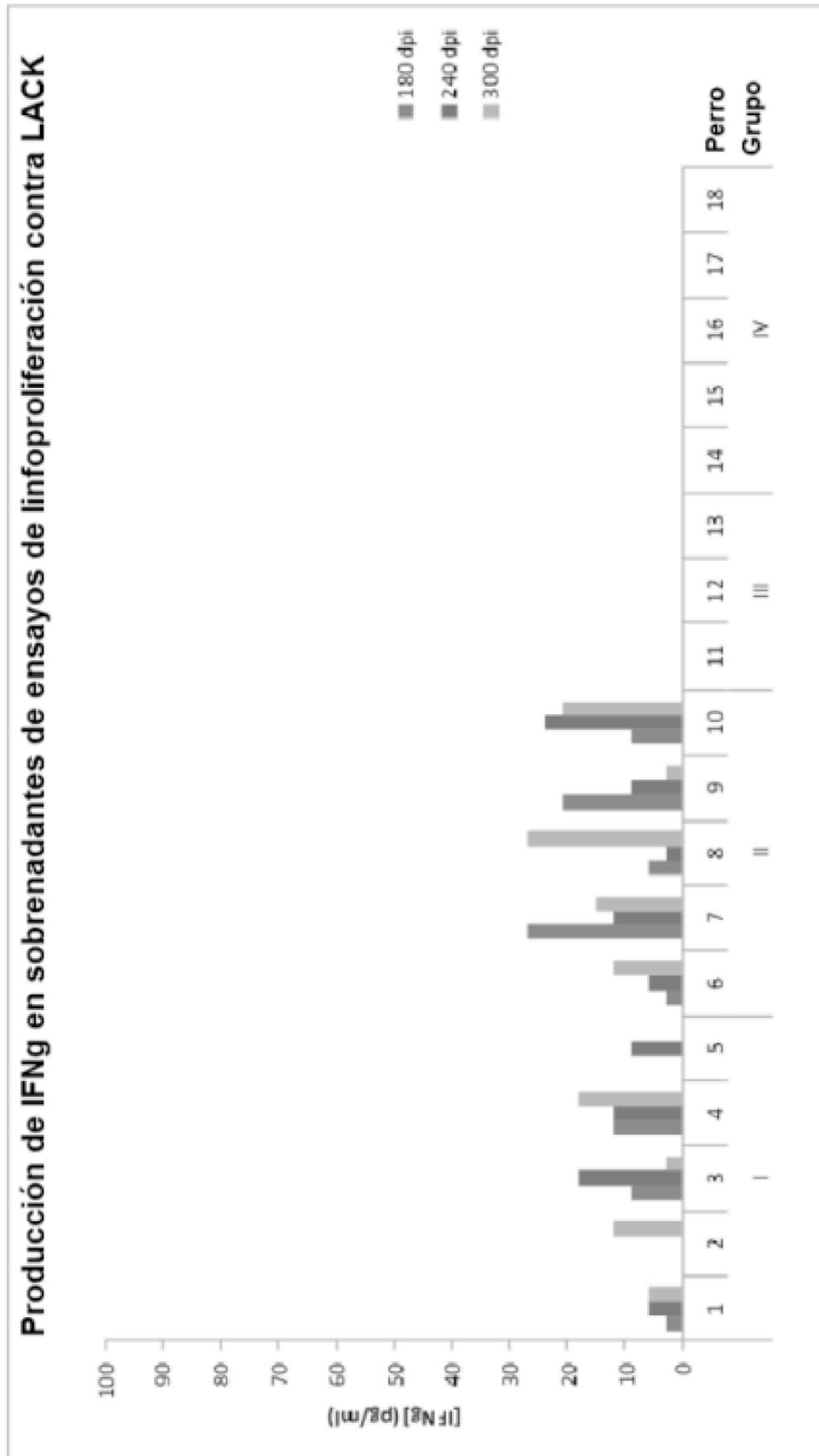


FIG. 15

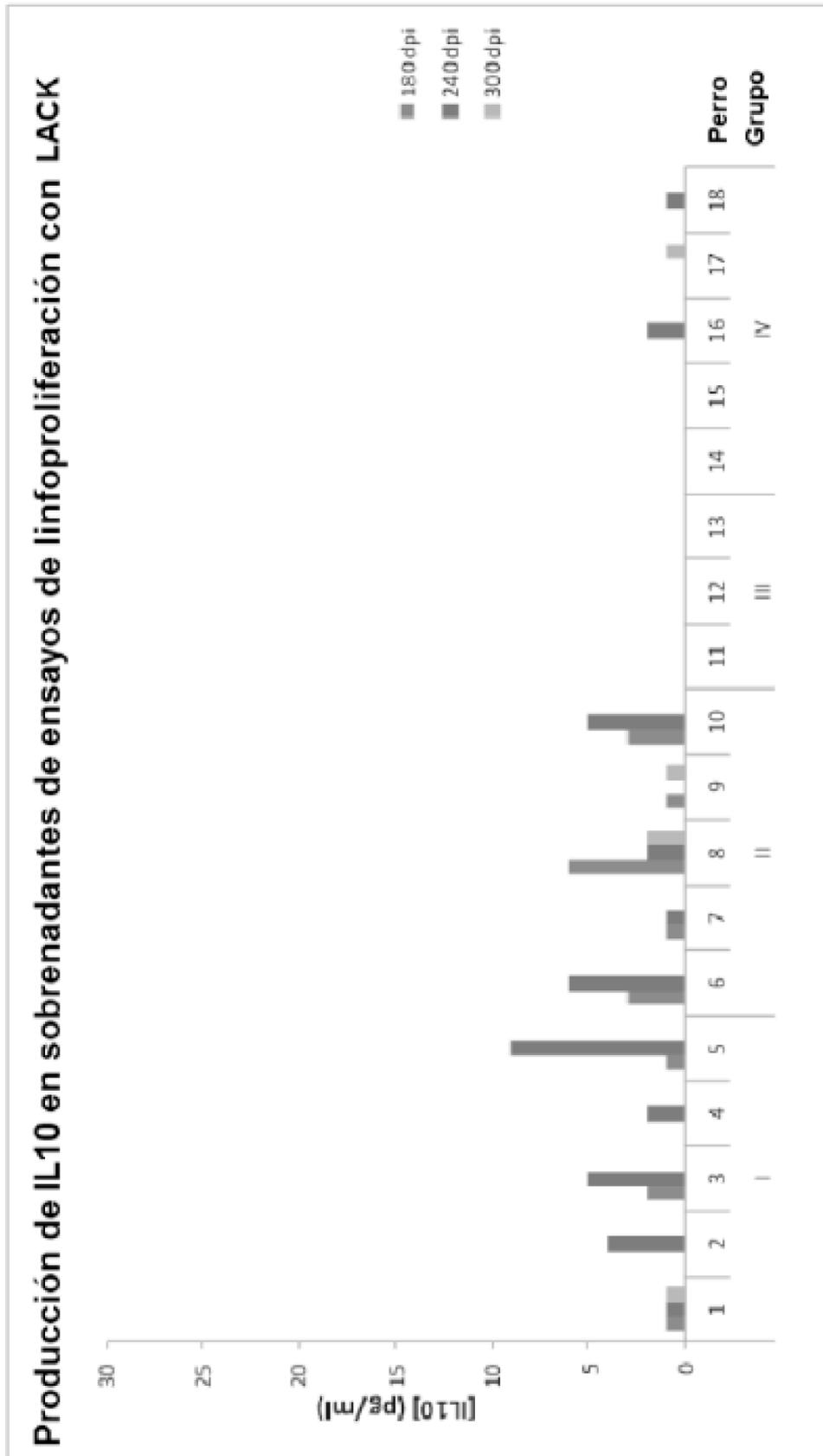


FIG. 16

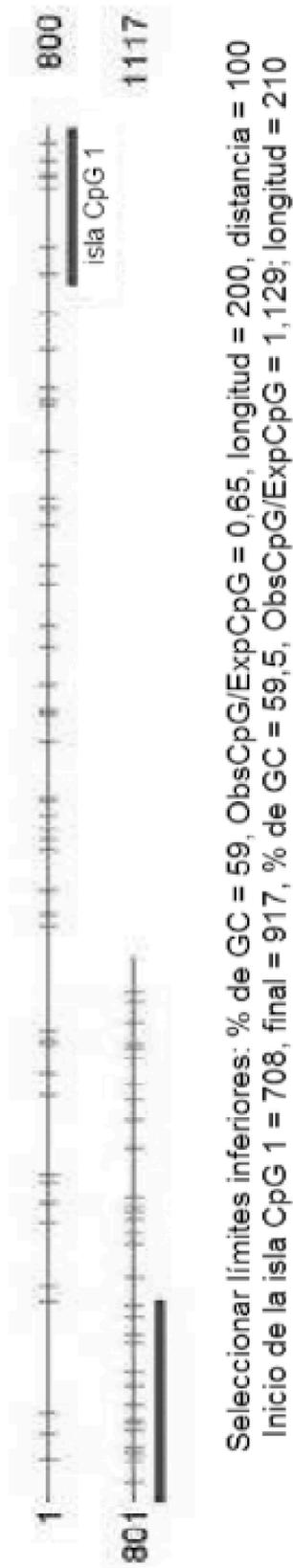


FIG. 17

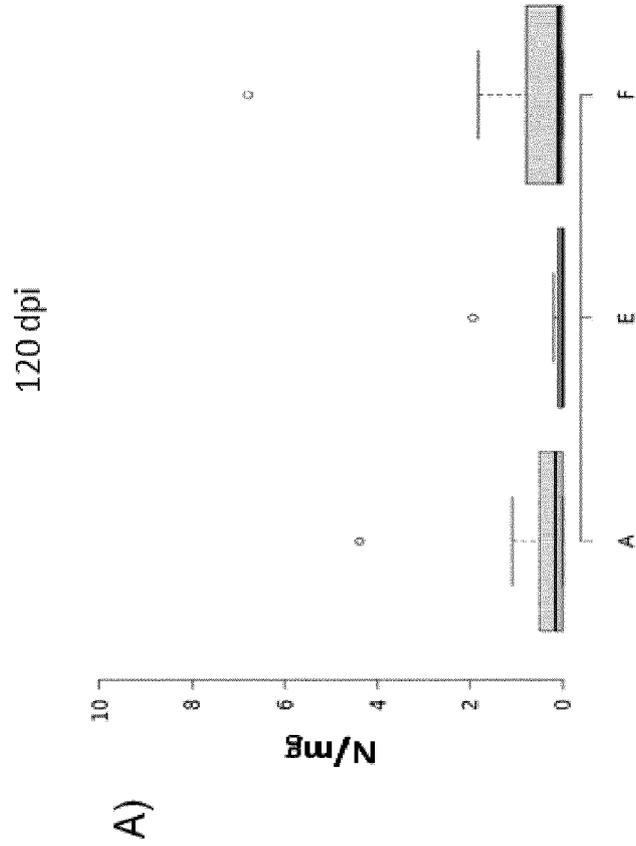
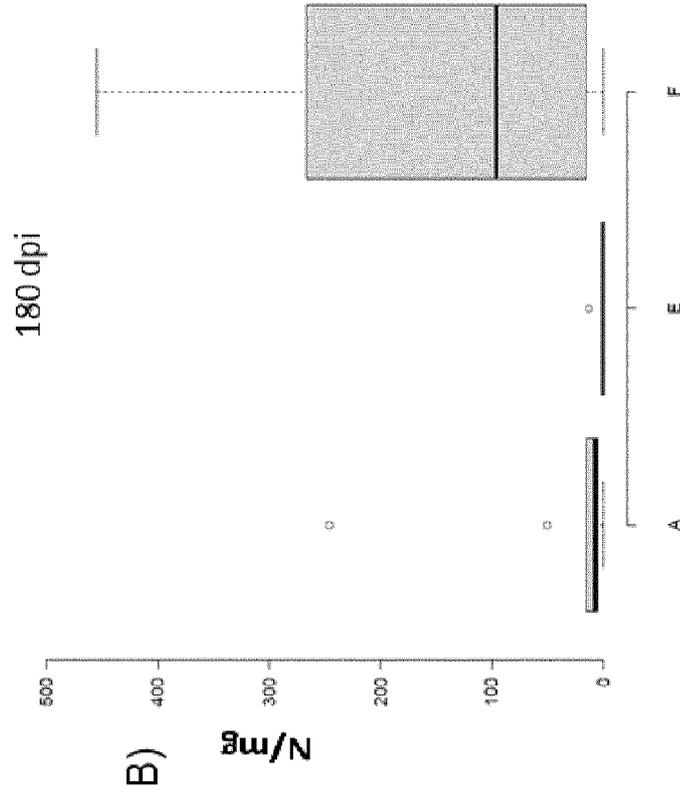


FIG. 18

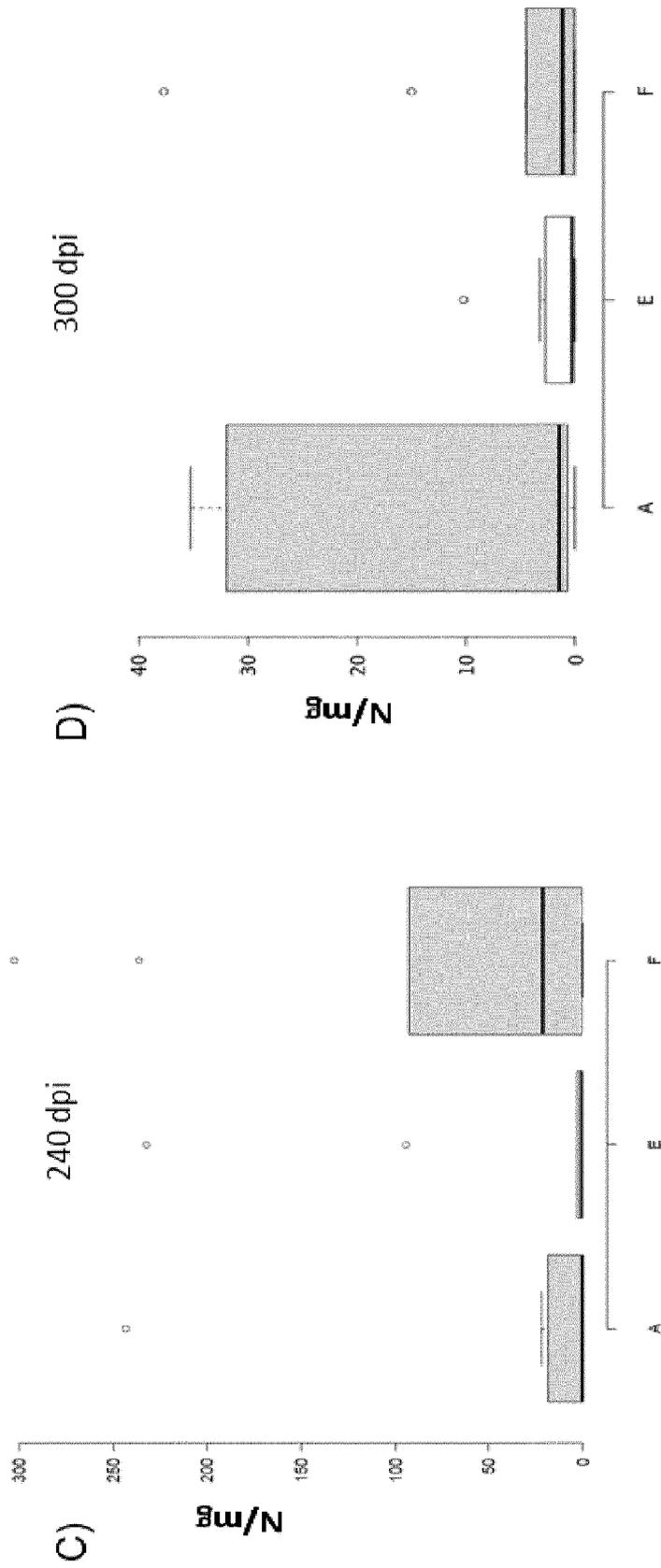


FIG. 18 (Cont.)

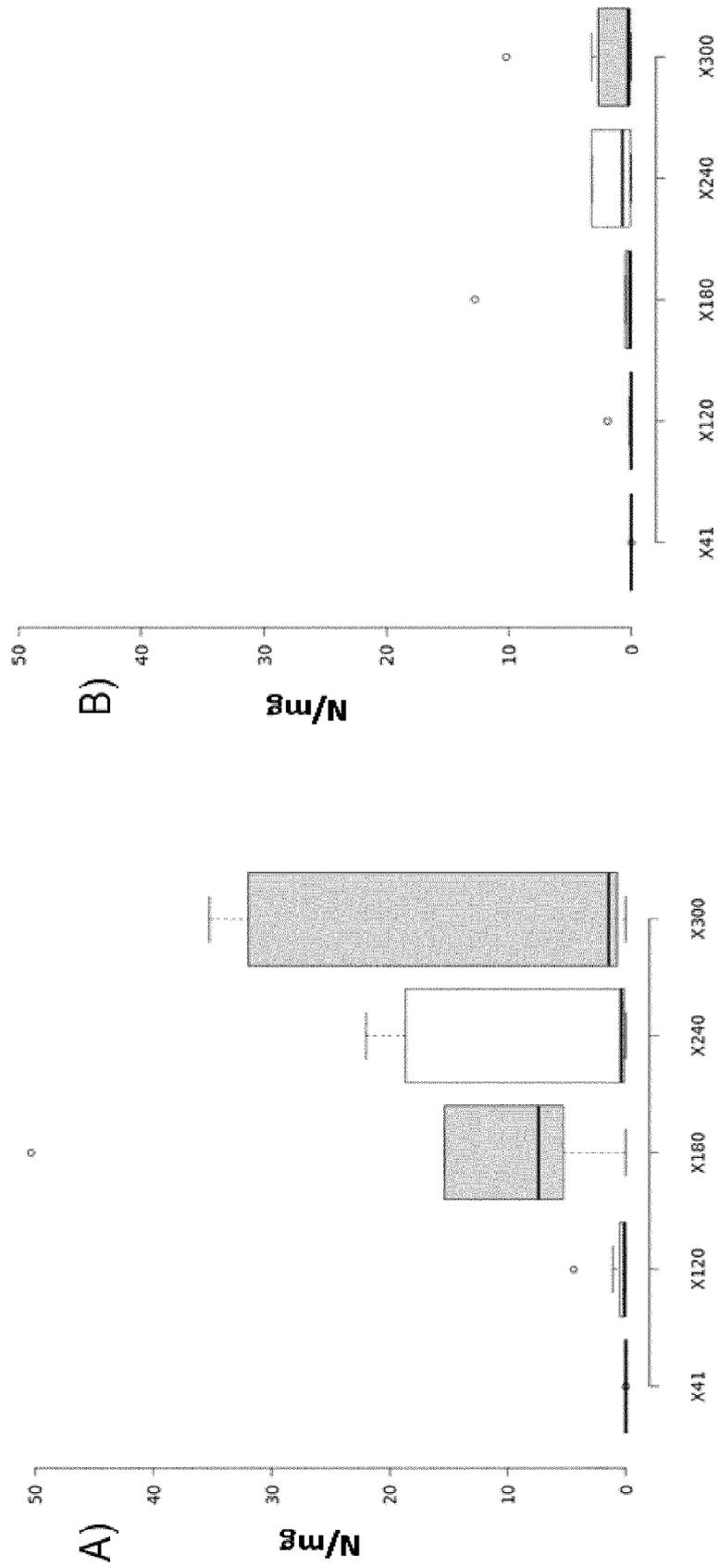


FIG. 19

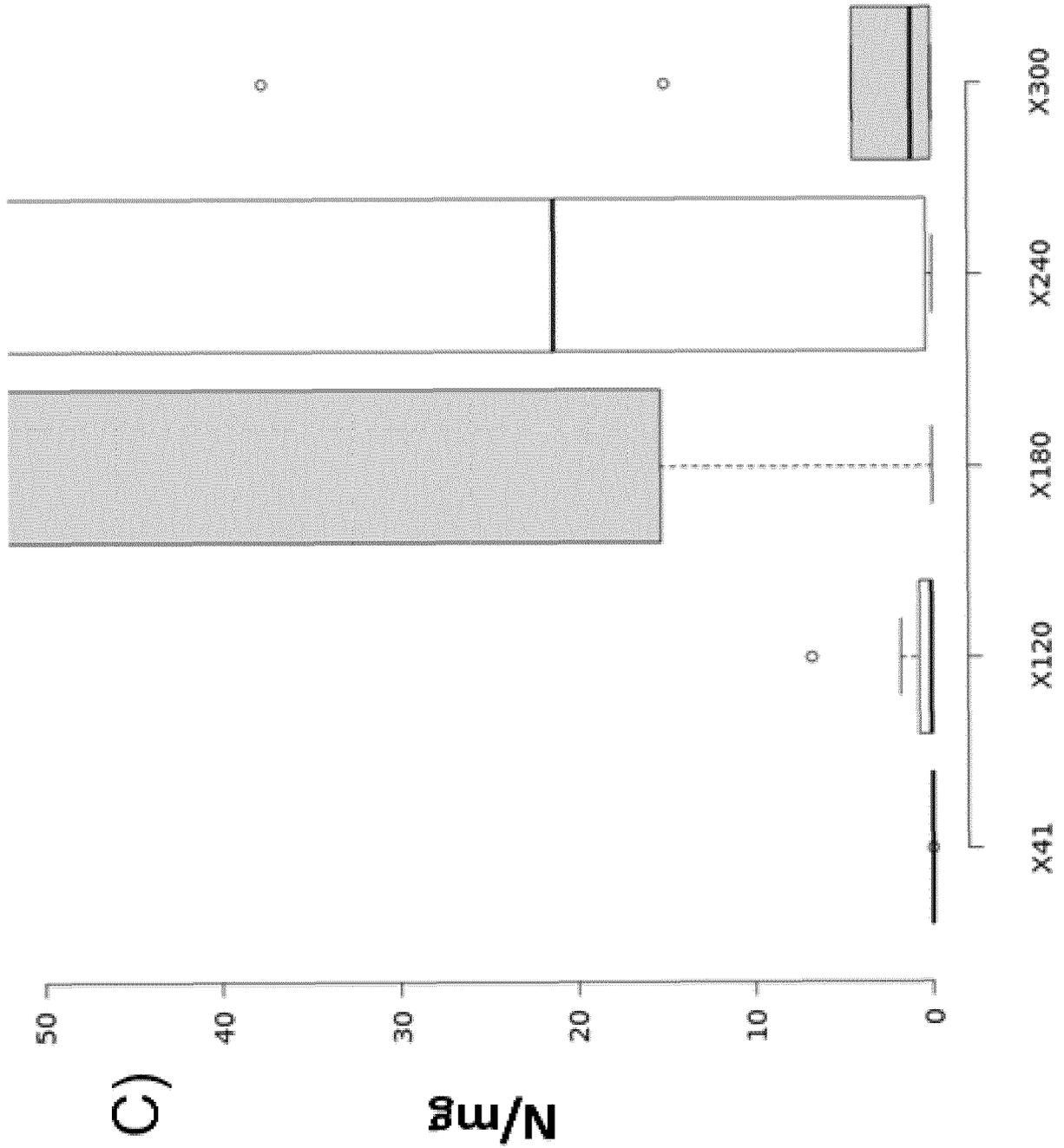
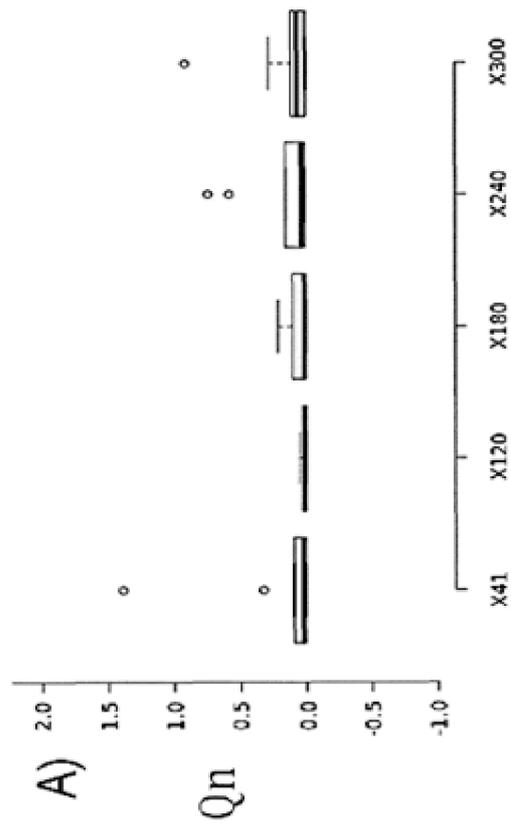


FIG. 19 (Cont.)



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.10	0.05	0.21	0.15	0.28
3 <sup>er</sup> cuartil	0.10	0.03	0.10	0.15	0.11
Mediana	0.03	0.01	0.01	0.04	0.05
1 <sup>er</sup> cuartil	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00
Bigote inferior	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

FIG. 20

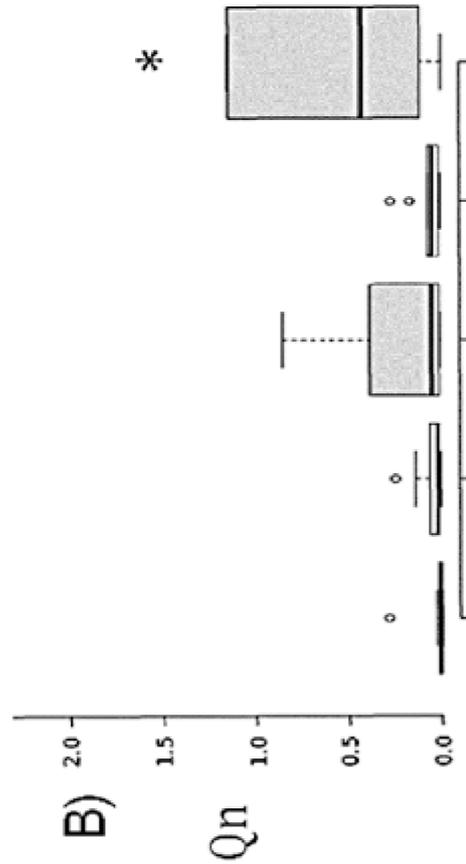
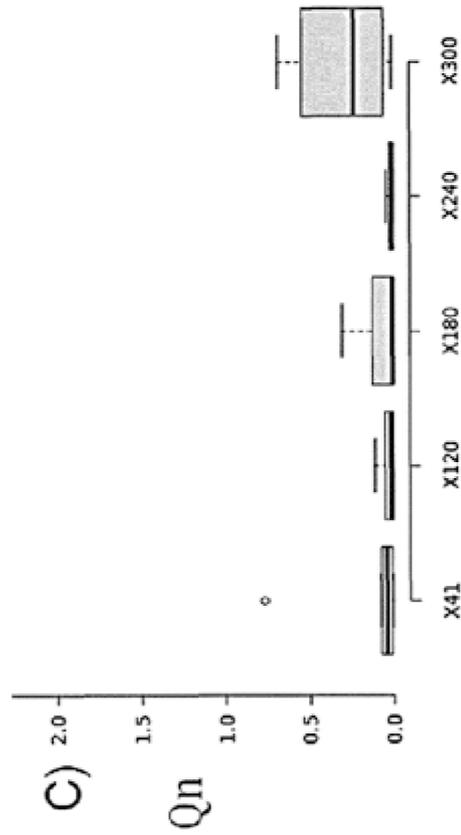


FIG. 20 (Cont.)

Estadística de diagrama de cajas

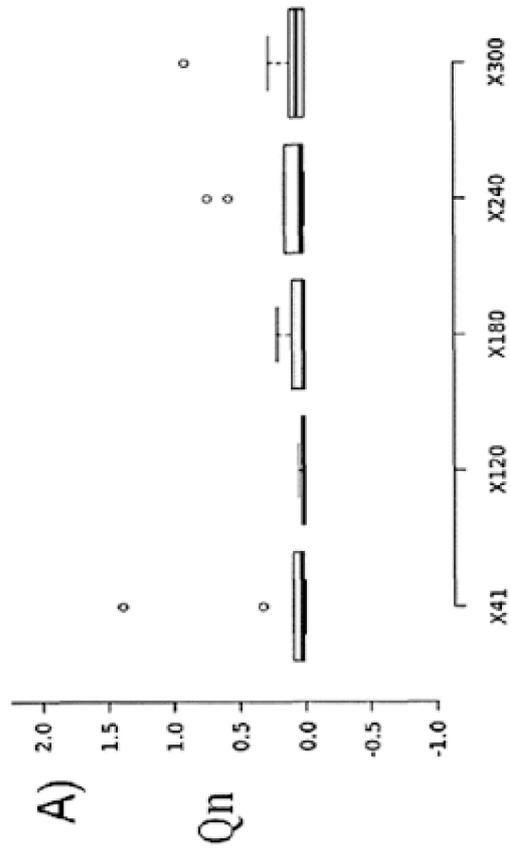
	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.03	0.14	0.86	0.07	1.15
3 <sup>er</sup> cuartil	0.02	0.06	0.39	0.07	1.15
Mediana	0.01	0.02	0.05	0.05	0.43
1 <sup>er</sup> cuartil	0.00	0.01	0.01	0.02	0.11
Bigote inferior	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	9.00	10.00



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.08	0.11	0.31	0.04	0.69
3 <sup>er</sup> cuartil	0.07	0.05	0.12	0.02	0.54
Mediana	0.04	0.01	0.00	0.00	0.23
1 <sup>er</sup> cuartil	0.01	0.00	0.00	0.00	0.05
Bigote inferior	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

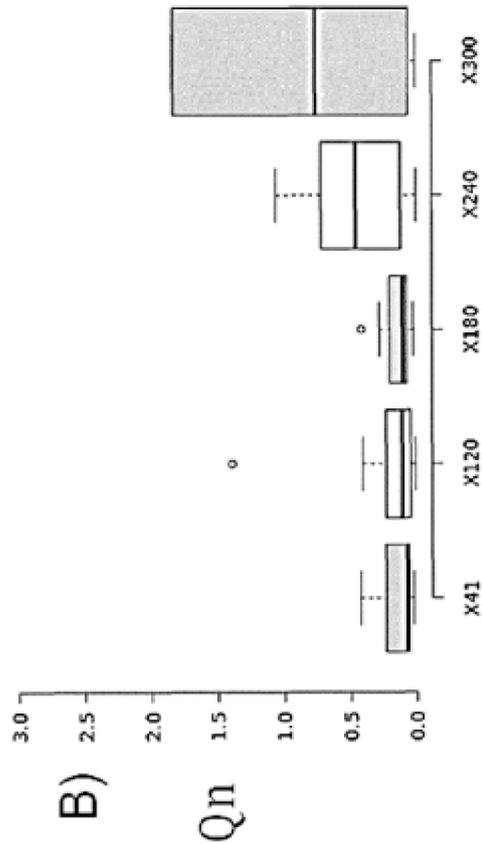
FIG. 20 (Cont.)



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.10	0.05	0.21	0.15	0.28
3 <sup>er</sup> cuartil	0.10	0.03	0.10	0.15	0.11
Mediana	0.03	0.01	0.01	0.04	0.06
1 <sup>er</sup> cuartil	0.01	0.00	0.01	0.01	0.00
Bigote inferior	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

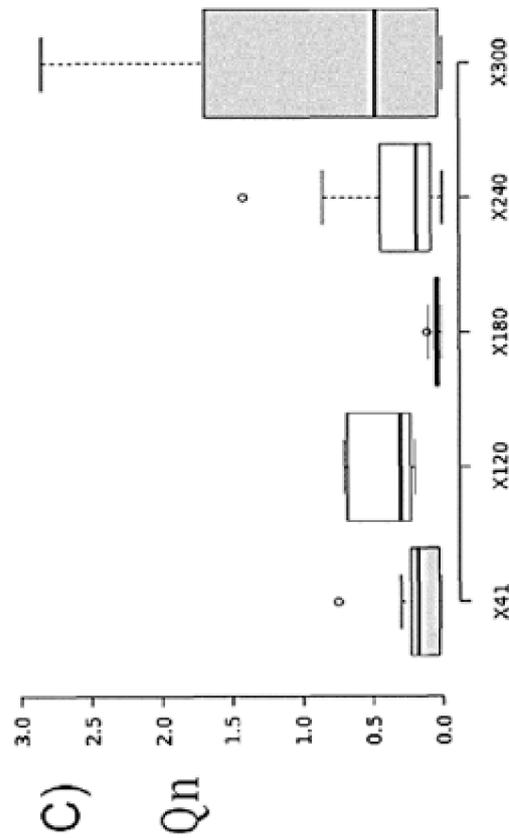
FIG. 21



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.43	0.49	0.28	1.06	1.83
3 <sup>er</sup> cuartil	0.23	0.23	0.20	0.72	1.83
Mediana	0.07	0.11	0.10	0.46	0.76
1 <sup>er</sup> cuartil	0.05	0.04	0.07	0.12	0.06
Bigote inferior	0.02	0.01	0.02	0.00	0.01
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

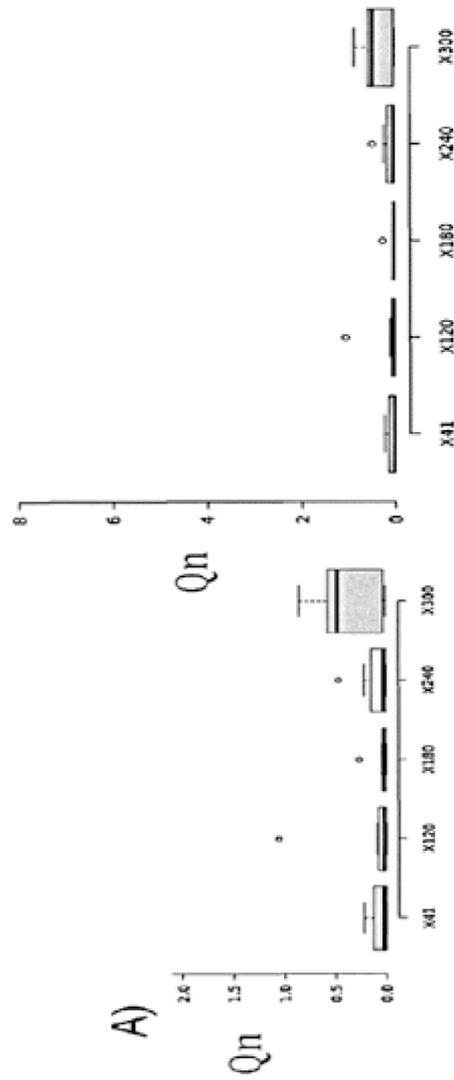
FIG. 21 (Cont.)



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.30	0.70	0.10	0.85	2.85
3 <sup>er</sup> cuartil	0.23	0.68	0.05	0.44	1.69
Mediana	0.17	0.30	0.04	0.18	0.48
1 <sup>er</sup> cuartil	0.03	0.23	0.02	0.08	0.03
Bigote inferior	0.02	0.20	0.01	0.00	0.00
N <sup>o</sup> de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

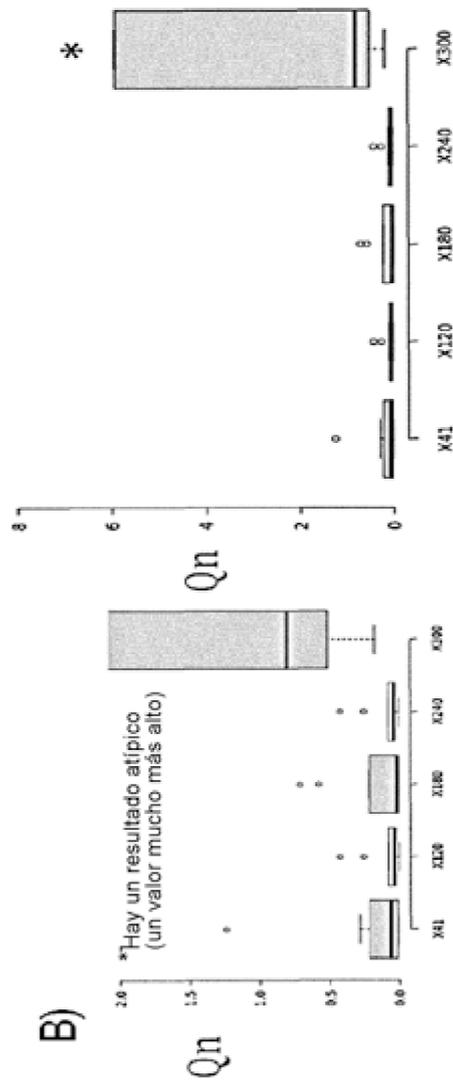
FIG. 21 (Cont.)



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.22	0.09	0.04	0.22	0.86
3 <sup>er</sup> cuartil	0.13	0.07	0.04	0.15	0.57
Mediana	0.02	0.02	0.02	0.03	0.48
1 <sup>er</sup> cuartil	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02
Bigote inferior	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

B)



Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.28	0.88	0.22	0.88	5.92
3 <sup>er</sup> cuartil	0.22	0.88	0.22	0.88	5.92
Mediana	0.05	0.04	0.02	0.04	0.81
1 <sup>er</sup> cuartil	0.01	0.03	0.01	0.03	0.51
Bigote inferior	0.01	0.00	0.00	0.00	0.18
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

Estadística de diagrama de cajas

	X41	X120	X180	X240	X300
Bigote superior	0.16	0.10	0.08	0.05	0.08
3 <sup>er</sup> cuartil	0.15	0.05	0.08	0.05	0.61
Mediana	0.05	0.03	0.02	0.02	0.26
1 <sup>er</sup> cuartil	0.03	0.01	0.01	0.00	0.02
Bigote inferior	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
N.º de puntos de datos	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00

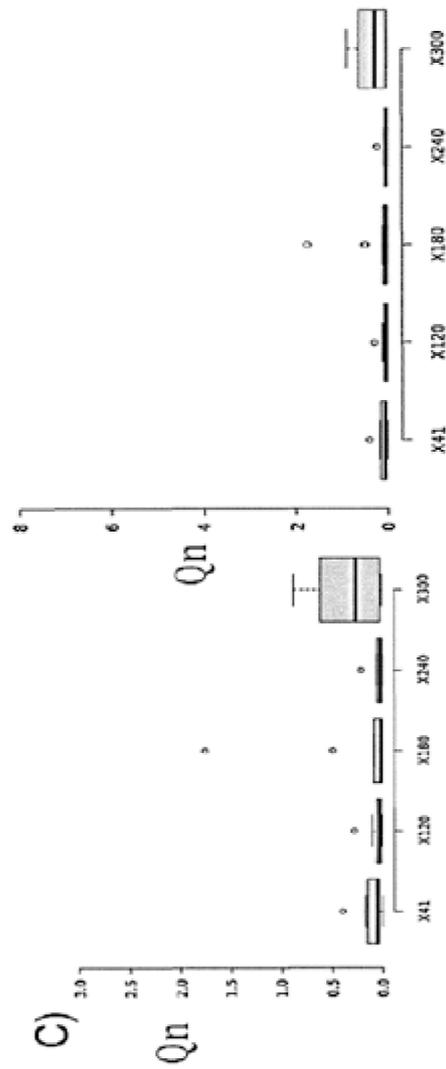


FIG. 22 (Cont.)

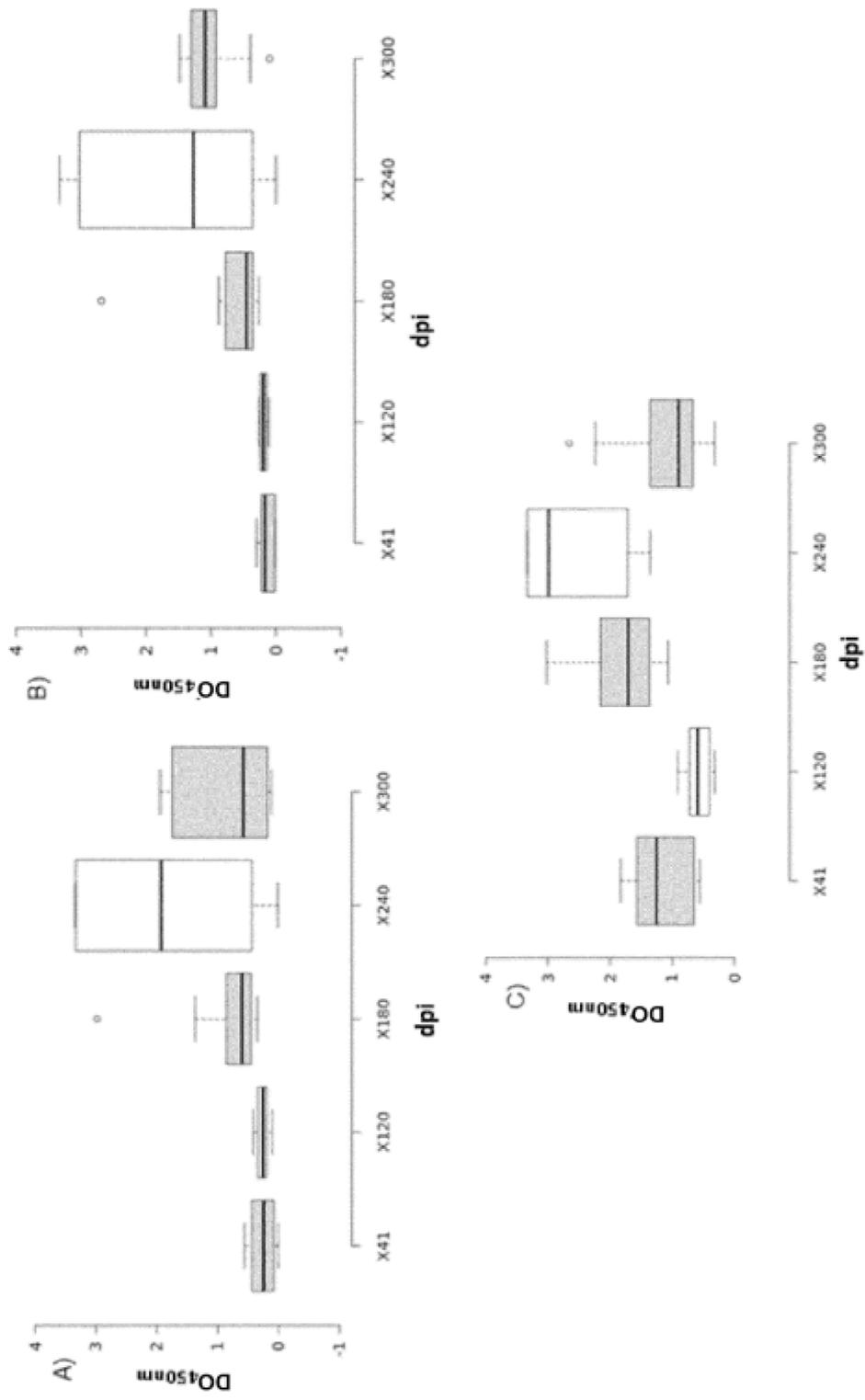


FIG. 23

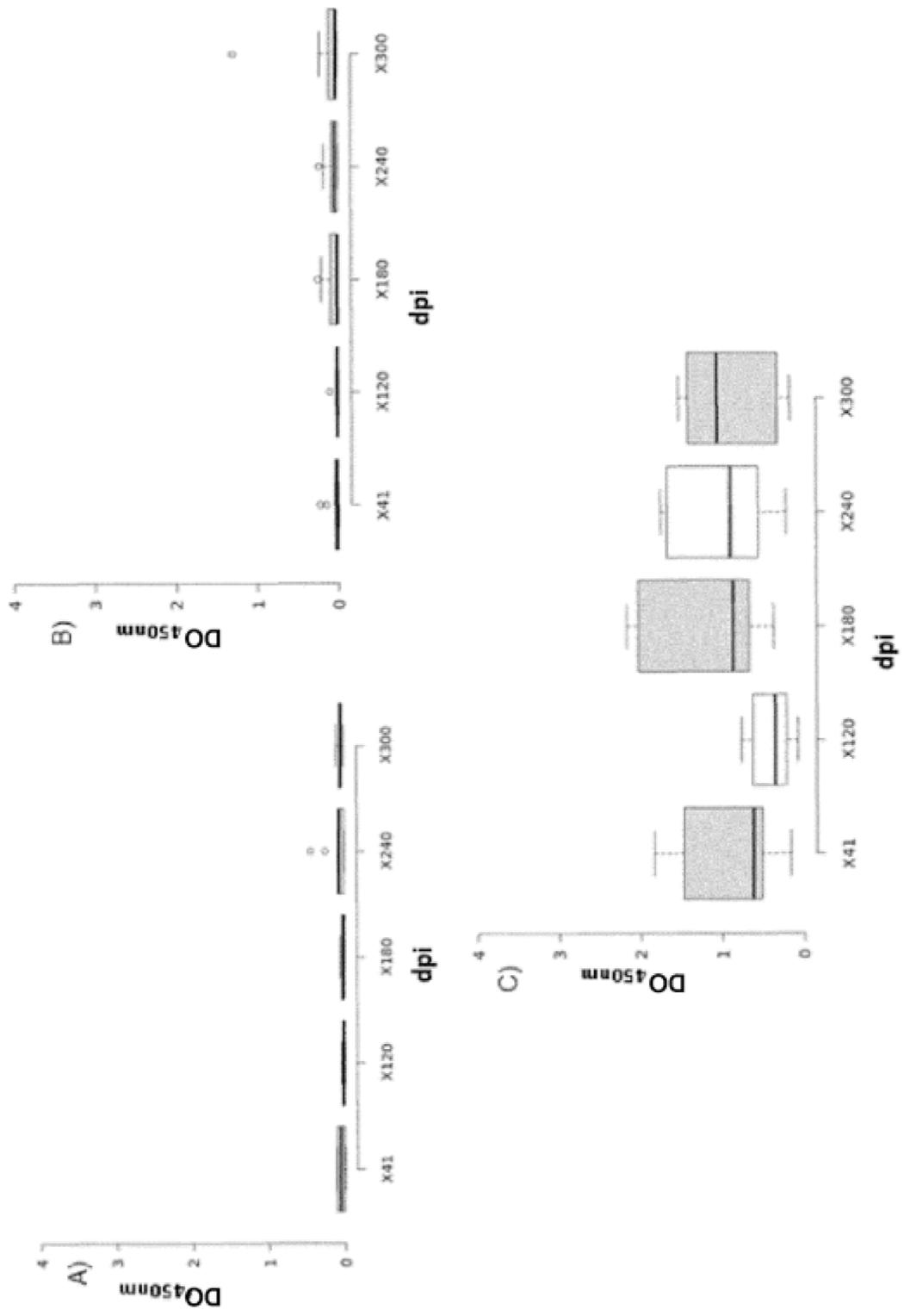


FIG. 24

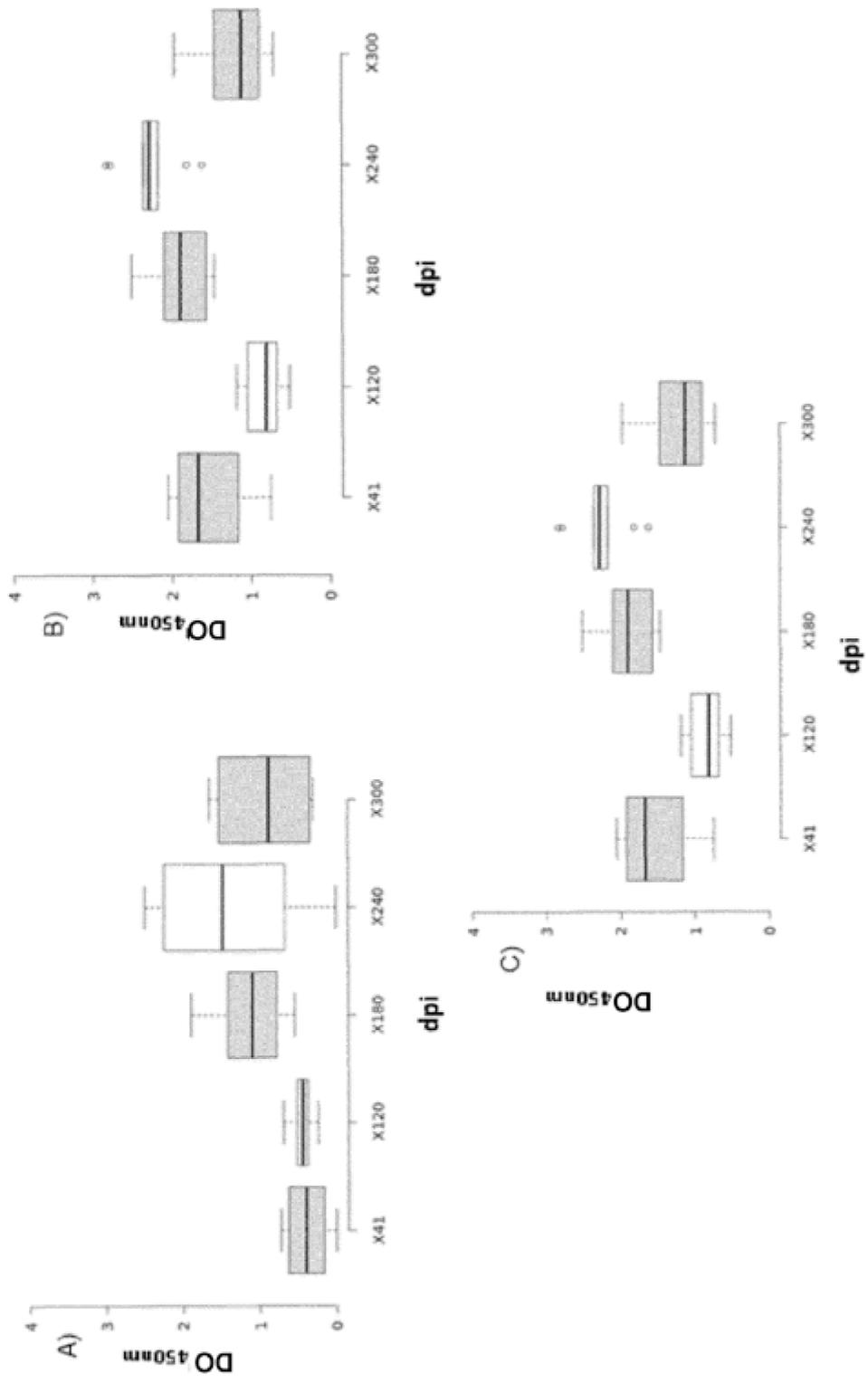


FIG. 25