

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 508**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2016 PCT/EP2016/073893**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.04.2017 WO17060360**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2016 E 16779055 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3359183**

54 Título: **Estructuras artificiales de polieptópos para uso en inmunoterapia**

30 Prioridad:

06.10.2015 EP 15306567

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

04.03.2021

73 Titular/es:

**INVECTYS (100.0%)
28 rue du Docteur Roux
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**LANGLADE DEMOYEN, PIERRE;
HUET, THIERRY;
WAIN-HOBSON, SIMON y
KOSTRZAK, ANNA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 809 508 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

Estructuras artificiales de poliepítopos para uso en inmunoterapia

La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia y la vacunación.

Antecedentes de la invención

5 La inmunoterapia basada en linfocitos T eficaz contra el cáncer debe incluir respuestas tanto de linfocitos T CD8 como CD4 reactivos frente a tumores que reconocen antígenos específicos de tumores. Los linfocitos T CD8 citotóxicos (CTLs) se consideran que son los principales actores de la respuesta inmune mediada por células, ya que muestran actividad citotóxica contra células tumorales que expresan antígenos asociados a tumores (TAAs). Sin embargo, esa respuesta inmune es eficaz solo si los linfocitos T CD4 cooperadores 1 (Th1) se estimulan de forma
10 concomitante. Estos linfocitos CD4 son decisivos para la inducción y el mantenimiento de los linfocitos T CD8 contra tumores, al proporcionar ayuda a través de múltiples interacciones y dirigir la respuesta antitumoral general (Shedlock y Shen, 2003). En consecuencia, cada vez se ha enfocado más la atención en identificar epítopos del MHC de clase I y II a partir de múltiples TAAs (Cheever MA, et al., 2009). Durante los últimos años, la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) se ha convertido en el primer antígeno tumoral común y se investiga activamente como una diana universal para la inmunoterapia contra el cáncer. La transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) es la subunidad catalítica de la enzima telomerasa que sintetiza ADN telomérico en los extremos cromosómicos. La hTERT se sobreexpresa en más del 85% de los tumores humanos procedentes de diversos fenotipos de cáncer, con poca o ninguna expresión en las células somáticas normales (Shay y Bacchetti, 1997).

20 Los ensayos clínicos con formulaciones de vacunas contra péptidos de la hTERT dirigidas principalmente a epítopos de CD8 han ilustrado que una respuesta inmune específica contra hTERT se puede inducir de manera segura en pacientes con cáncer y tener un impacto notable en los resultados clínicos a corto plazo (Bernhardt et al., 2006; Bolonaki et al., 2007). Sin embargo, este enfoque terapéutico no logró inducir beneficios clínicos a largo plazo debido a la ausencia de una respuesta inmune sostenida. La respuesta de memoria obtenida con las vacunas de péptidos de hTERT dirigidas a epítopos de CD8 y especialmente con péptidos cortos, era muy baja y no era constante. Esos resultados subóptimos se pueden explicar en parte por un bajo nivel o la ausencia de ayuda de linfocitos T CD4.

Todavía existe la necesidad de vacunas terapéuticas efectivas contra agentes infecciosos o tumores, especialmente aquellos que expresan antígenos débilmente inmunogénicos.

Compendio de la invención

30 Los inventores han desarrollado ahora una estrategia de vacuna de ADN que no muestra los inconvenientes de la vacunación con péptidos (incluso péptidos largos), restringida a ciertos epítopos de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT). En particular, la vacunación con ADN evita procedimientos costosos y complicados para la producción y purificación de proteínas. Las estructuras artificiales de la invención inducen tanto linfocitos T CTLs como cooperadores CD4, independientemente de la restricción del HLA del paciente, a la vez que son seguras e inducen una mejor respuesta inmune cuantitativa y cualitativa.

Un objeto de la invención es un vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN que codifica al menos dos epítopos de CD4 de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

40 De acuerdo con una primera realización, se proporciona una mezcla de vectores de expresión de ADN que comprende i) al menos un vector de expresión de ADN que codifica dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT y ii) al menos un vector de expresión de ADN que codifica dicho al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un vector de expresión de ADN, que codifica dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT y dicho al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

45 Otro objeto de la invención es un kit que comprende

- a. un primer recipiente que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT y
- b. un segundo recipiente que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica dicho epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

50 Dichos vector de expresión de ADN, mezcla de vectores de expresión de ADN o kit, son útiles para tratar un tumor o una infección en un paciente.

Leyendas de las Figuras

Figura 1: Mapa del plásmido pUCPbasic

La Tabla 1 a continuación muestra las leyendas detalladas.

Gen	Ubicación (bases)
Promotor de CMV	232-819
Promotor de T7	863-882
UCP basic (4 epítomos de la clase II de TERT humana)	923-1225
Marcador V5	1226-1267
BGH pA (secuencia de poliadenilación de BGH)	1317-1541
f1 ori (origen de f1)	1587-2015
promotor temprano de SV40 y origen	2020-2363
Gen de neomicina	2425-3219
SV40 pA (señal de poliadenilación temprana de SV40)	3393-3523
origen de pUC (cadena complementaria)	3906-4576
Gen de ampicilina (cadena complementaria)	4721-5581

Figura 2: Mapa del plásmido pUCP2(4x)

5 La Tabla 2 a continuación muestra las leyendas detalladas.

Gen	Ubicación (bases)
Promotor de CMV	232-819
Promotor de T7	863-882
UCP2(4x) (epítomo de la clase II del HLA-DRB1 de TERT humana repetido cuatro veces)	923-1225
Marcador V5	1226-1267
BGH pA (secuencia de poliadenilación de BGH)	1317-1541
f1 ori (origen de f1)	1587-2015
promotor temprano de SV40 y origen	2020-2363
Gen de neomicina	2425-3219
SV40 pA (señal de poliadenilación temprana de SV40)	3393-3523
origen de pUC (cadena complementaria)	3906-4576

Gen	Ubicación (bases)
Gen de ampicilina (cadena complementaria)	4721-5581

Figura 3: Mapa del plásmido pDE7

La Tabla 3 a continuación muestra las leyendas detalladas.

Gen	Ubicación (bases)
Promotor de CMV	232-819
Promotor de T7	863-882
DE7 (antígeno E7 no oncogénico de HPV 16)	923-1216
Marcador V5	1217-1258
BGH pA (secuencia de poliadenilación de BGH)	1308-1532
f1 ori (origen de f1)	1578-2006
promotor temprano de SV40 y origen	2011-2354
Gen de neomicina	2416-3210
SV40 pA (señal de poliadenilación temprana de SV40)	3384-3514
origen de pUC (cadena complementaria)	3897-4567
Gen de ampicilina (cadena complementaria)	4712-5572

5 Figura 4: Validación de las estructuras artificiales de ADN mediante cartografiado por restricción

Los vectores de expresión se verificaron mediante cartografiado por restricción. Sus modelos se corresponden con el mapa de restricción esperado.

Pista M: Escala de 1 kb (Eurogentec)

Pista 1: pUCPbasic (369, 5348 pb)

10 Pista 2: pUCP2(4x) (363, 5354 pb)

Pista 3: pDE7 (354, 5354 pb)

Figura 5: Expresión de polipéptidos/proteínas de UCPbasic, UCP2(4x) y DE7 *in vitro* en la línea celular HEK293T, determinada por transferencia Western

La expresión de proteínas se controló 48 h después de la transfección en células HEK293T.

15 (a) Ensayo directo de transferencia Western: polipéptidos/proteínas de pUCPbasic, pUCP2(4x), pDE7 y pcDNA3.1 detectados después de 20 segundos de absorción; la β -actina se utilizó como control de carga.

(b) Ensayo de transferencia Western después de la inmunoprecipitación de la proteína E7: los extractos de células completas preparados a partir de células transfectadas con pDE7 y pcDNA3.1 se inmunoprecipitaron con perlas de agarosa anti-V5. La proteína E7 se detectó después de 4 minutos de absorción.

20 Los marcadores del peso molecular (MW) se indican (kDa).

Figura 6: Los epítomos cooperadores de hTERT aumentan la respuesta de los linfocitos T CD8 contra el antígeno E7 de HPV16

Los ratones se inmunizaron conjuntamente con ADN que codificaba el antígeno E7 no oncogénico y con un plásmido de control vacío (pcDNA3.1), pUCP2(4x) o pUCPbasic, el día 0 y el día 21. Diez días después de la segunda inmunización (D31), se extirparon los bazo y se analizaron mediante un ensayo ELISpot con IFN- γ .

Mediana de la frecuencia de linfocitos T IFN- γ + restringidos a hTERT y HLA-DR1 de E7 (a, b, respectivamente) y HLA-A2 de E7 (c) en el bazo. 5-13: número de ratón. (d) Resultados sumados de ELISpot con IFN- γ de HLA-DR1 y HLA-A2. Las barras muestran medianas con un intervalo de manchas de IFN- γ .

Las líneas discontinuas horizontales negras indican el umbral de positividad del ELISpot. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo (prueba de t no emparejada).

Correlación entre las respuestas de linfocitos T HLA-DR1 para hTERT y linfocitos T HLA-A2 para E7 para las estructuras artificiales pUCP2(4x) + pDE7 (e) y pUCPbasic + pDE7 (f) determinada por la prueba del coeficiente de correlación de Pearson. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo.

Este estudio experimental se repitió en las mismas condiciones y se obtuvieron resultados similares.

Figura 7: Detección de producciones de citocinas Th1, Th2 y Th17 mediante un ensayo de unión a citocinas (CBA) en el material sobrenadante de cultivos de esplenocitos después de 24 horas de cultivo, en presencia de los cuatro péptidos HLA-DR1 de hTERT del grupo 1. Las concentraciones de citocinas en pg/mL se representan como media $\pm$ DE. Análisis estadístico: prueba no paramétrica de Mann-Whitney frente al grupo de control pDE7 + pcDNA3.1. Un valor de $p < 0,05$ se consideró significativo (*).

Figura 8: Muestra la secuencia de inserción de pUCPbasic.

Un transgén que codifica el polipéptido UCPbasic. Cuatro epítomos de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana CD4+ (hTERT; número de orden NM_198253), a saber, UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4, con secuencias flanqueantes naturales de 5 AA, se unen entre sí. Los 14 aminoácidos en la secuencia C-terminal codifican el marcador del epítipo V5. La primera línea es la secuencia de nucleótidos; la segunda línea es la secuencia de aminoácidos correspondiente. Las anotaciones se realizan arriba o debajo de las secuencias. □: codón de parada.

La secuencia se tradujo con el programa de traducción SHOWORF (EMBOSS Explorer).

1-6	sitio de restricción de <i>HindIII</i> para la subclonación
13-315	UCPbasic: UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4 (en negrita)
316-357	marcador del epítipo V5
358-363	dos codones de parada
364-369	sitio de restricción de <i>XhoI</i> para la subclonación

La secuencia de nucleótidos se muestra como SEQ ID NO: 21, la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra como SEQ ID NO: 22.

La Figura 9 muestra la secuencia de inserción de pUCP2(4x).

La secuencia transgénica pUCP2(4x) incluye el epítipo dominante UCP2 repetido cuatro veces KSVWSKLQSI-GIRQH (SEQ ID NO: 2, TERT 578-592, n° de orden NM_198253) con secuencias flanqueantes de 5 AA en cada lado. Los 14 aminoácidos en la secuencia C-terminal codifican el marcador del epítipo V5. La primera línea es la secuencia de nucleótidos; la segunda línea es la secuencia de aminoácidos correspondiente. Las anotaciones se realizan arriba o debajo de las secuencias. □: codón de parada.

La secuencia se tradujo con el programa de traducción SHOWORF (EMBOSS Explorer).

1-6	sitio de restricción de <i>HindIII</i> para la subclonación
13-315	UCP2(4x) - Unidad UCP2 (en negrita)
316-357	marcador del epítipo V5

358-363 dos codones de parada

364-369 sitio de restricción de *Xho*I para la subclonación

La secuencia de nucleótidos se muestra como SEQ ID NO: 23, la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra como SEQ ID NO: 24.

La Figura 10 muestra la secuencia de inserción de pDE7.

5 Transgén que codifica la proteína DE7. Se introdujeron cuatro mutaciones en el gen E7 de tipo silvestre del virus del papiloma humano tipo 16 (número de orden EU869317). Los 14 aminoácidos en la secuencia C-terminal codifican el marcador del epítipo V5. La primera línea es la secuencia de nucleótidos; la segunda línea es la secuencia de aminoácidos correspondiente. Las anotaciones se realizan arriba o debajo de las secuencias. □: codón de parada. Las bases cambiadas/mutadas se resaltan en negrita.

La secuencia se tradujo con el programa de traducción SHOWORF (EMBOSS Explorer).

1-6 sitio de restricción de *Hind*III para la subclonación

13-306 DE7

307-348 marcador del epítipo V5

349-354 dos codones de parada

355-360 sitio de restricción de *Xho*I para la subclonación

10 La secuencia de nucleótidos se muestra como SEQ ID NO: 25, la secuencia de aminoácidos correspondiente se muestra como SEQ ID NO: 26.

Descripción detallada de la invención

15 Los inventores proponen usar estructuras artificiales de ADN que codifican múltiples epítopos promiscuos (indiscriminados) de linfocitos T CD4 cooperadores procedentes de TERT, como potenciadores universales para inducir una respuesta inmune sostenida contra antígenos poco inmunogénicos.

20 Los inventores diseñaron dos estructuras artificiales de ADN sintético de poliepítopos de CD4 obtenidas a partir de hTERT, pUCPbasic y pUCP2(4x), que codificaban cuatro epítopos de CD4 diferentes (UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4, respectivamente SEQ ID NO: 1 a 4) y el epítipo promiscuo inmunodominante UCP2 repetido cuatro veces, respectivamente, con el fin de investigar si se puede proporcionar una ayuda para mejorar las respuestas de linfocitos T CD8 frente a E7. Una administración intradérmica (ID) seguida de electroporación de estas dos estructuras artificiales de ADN en ratones transgénicos HLA-A2/DR1, daba como resultado una fuerte respuesta de los linfocitos T CD4 específicos de hTERT que estaba polarizada preferentemente a Th1. Cuando se inyectaban junto con un ADN plasmídico que codificaba el antígeno E7 poco inmunogénico, la magnitud de la respuesta de los linfocitos T CD8 específicos de E7 aumentó drásticamente.

25 En base a esos resultados, los inventores llegaron a la conclusión de que (i) los epítopos de linfocitos T cooperadores CD4 codificados mediante estructuras artificiales de ADN sintético obtenidas a partir de hTERT, se procesan de manera eficaz y se presentan en un contexto de HLA-DR1 en un modelo de ratón transgénico HLA-A2/DR1 y que (ii) esta respuesta polarizada a Th1 CD4 para hTERT puede mejorar en gran medida las respuestas de CTLs contra diversos antígenos cancerígenos/oncovirales poco inmunogénicos o poliepítopos de la clase I anticancerígenos.

30 Definiciones

El complejo de la telomerasa consiste en un molde de ARN y componentes proteicos que incluyen una transcriptasa inversa, denominada "Transcriptasa inversa de la telomerasa" (TERT), que es el principal determinante de la actividad telomerasa. Se conoce la telomerasa humana de tipo silvestre (o hTERT) (número de orden de GeneBank NM_198253).

35 Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas", "sustancialmente homólogas" o "sustancialmente similares" cuando uno o varios residuos de aminoácidos se reemplazan por un residuo biológicamente similar o cuando más del 80% de los aminoácidos son idénticos, o más del 90%, preferiblemente más del 95%, son similares (funcionalmente idénticos). Preferiblemente, las secuencias similares u homólogas se identifican mediante alineación usando, por ejemplo, el programa de apilamiento GCG (Genetics Computer Group, Program Manual for the GCG Package, Versión 7, Madison, Wisconsin), o cualquiera de los programas conocidos en la técnica (BLAST, FASTA, etc.). Con
40 "sustituido" o "modificado", la presente invención incluye aquellos aminoácidos que han sido alterados o modificados

a partir de aminoácidos naturales.

La expresión "sustitución conservadora" tal y como se usa en el presente documento, indica el reemplazo de un residuo de aminoácido por otro, sin alterar la conformación y función general del péptido, que incluye, pero no se limita a, el reemplazo de un aminoácido por uno que tiene propiedades similares (como, por ejemplo, polaridad, potencial de enlace de hidrógeno, acidez, basicidad, forma, hidrofobicidad, aromaticidad y similares). Los aminoácidos con propiedades similares son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la arginina, la histidina y la lisina son aminoácidos hidrófilos básicos y se pueden intercambiar. De manera similar, la isoleucina, un aminoácido hidrófobo, se puede reemplazar por leucina, metionina o valina. Los aminoácidos hidrófilos neutros, que se pueden sustituir entre sí, incluyen asparagina, glutamina, serina y treonina.

La expresión "polinucleótido aislado" se define como un polinucleótido retirado del entorno en el que está presente de forma natural. Por ejemplo, una molécula de ADN natural presente en el genoma de una bacteria viva o como parte de una genoteca, no está aislada, pero la misma molécula separada de la parte restante del genoma bacteriano, como resultado, por ejemplo, de un evento de clonación (amplificación), está aislada. Típicamente, una molécula de ADN aislada está exenta de regiones de ADN (p. ej., regiones codificantes) a las que sigue de forma contigua en el extremo 5' o 3', en el genoma natural. Los polinucleótidos aislados de ese tipo pueden formar parte de un vector o una composición y aún se pueden definir como aislados en el sentido de que un vector o una composición de ese tipo no forma parte del entorno natural de ese polinucleótido.

El término "inmunogénico" significa que la composición o estructura artificial a la que se refiere, es capaz de inducir una respuesta inmune después de una administración. "Respuesta inmune" en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmune innata y adaptativa, que incluye una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune celular o una respuesta inmune humoral y celular, frente a un antígeno. Una "respuesta inmune humoral" se refiere a una que está mediada por anticuerpos. Una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T. Incluye la producción de citocinas, quimioquinas y moléculas similares producidas por linfocitos T activados, glóbulos blancos o ambos. Las respuestas inmunes se pueden determinar usando inmunoensayos convencionales y ensayos de neutralización para la detección de la respuesta inmune humoral, los cuales se conocen en la técnica.

En el contexto de la invención, la respuesta inmune preferiblemente incluye una estimulación o proliferación de linfocitos T CD8 citotóxicos y/o linfocitos T CD4 y se puede determinar usando inmunoensayos tales como el ensayo ELISpot, el ensayo de citotoxicidad *in vivo* o el ensayo de unión con secreción de citocinas.

Tal y como se usa en este documento, el término "tratamiento" o "terapia" o "inmunoterapia" se refiere a uno cualquiera entre el alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (p. ej., fallo en el progreso a estadios más avanzados) de un síntoma, así como un retraso en el progreso de la enfermedad o de un síntoma de la misma. Por lo tanto, el término incluye lograr una respuesta inmune antitumoral eficaz, observada en pacientes con cáncer.

Tal y como se usa en este documento, el término "prevención" o "prevenir" se refiere al alivio, mejora y/o eliminación, reducción y/o estabilización (p. ej., fallo en el progreso a estadios más avanzados) de un pródromo, es decir, cualquier alteración o síntoma temprano (o conjunto de síntomas) que puede indicar el inicio de una enfermedad antes de que aparezcan síntomas específicos.

Una célula que "sobrexprende la telomerasa" se refiere a una célula en un sujeto, que expresa telomerasa, p. ej., después de una mutación o infección, especialmente una infección con un oncovirus, aunque generalmente no lo hace en condiciones normales, o a una célula en un sujeto que expresa un mayor nivel de telomerasa (por ejemplo, después de una mutación o infección), en comparación con las condiciones normales. Preferiblemente, la célula que sobrexprende la telomerasa muestra un aumento de la expresión de al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% o más.

El "paciente" o "sujeto" es típicamente un sujeto mamífero, preferiblemente un sujeto humano, de cualquier edad, sexo o gravedad de la afección. Se incluyen mamíferos no humanos, incluidos gatos, perros, caballos, etc.

Las estructuras artificiales de ácido nucleico

En este documento se proporcionan estructuras artificiales de ácido nucleico que están diseñadas para permitir la vacunación en pacientes. En una primera realización, una mezcla de vectores de expresión de ADN codifica al menos dos, preferiblemente al menos tres, epítopos de CD4 de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario. En consecuencia, la mezcla puede comprender al menos un vector de expresión de ADN que codifica al menos dos epítopos de CD4 de TERT (también denominada "estructura artificial de poliepítopos"), junto con al menos un vector de expresión de ADN que codifica al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

En otra realización, un único vector de expresión de ADN codifica al menos dos epítopos de CD4 de TERT y al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

Las estructuras artificiales de ADN de la invención, que son preferiblemente ADN bicatenario, están en forma aislada. Las estructuras artificiales de ácido nucleico no son un ácido nucleico genómico natural, en particular, no com-

prenden intrones.

Los epítomos de CD4

El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN, codifica al menos 2, preferiblemente al menos 3, aún más preferiblemente al menos 4 epítomos de CD4 de TERT.

- 5 TERT es preferiblemente TERT humana, o TERT de otra especie, tal como TERT de gato o TERT de perro, cuando el sujeto que se va a tratar es un gato o un perro.

10 Sin embargo, ninguna de las estructuras artificiales de poliepítomos de la invención coincide con la secuencia que codifica la TERT de longitud completa, ni con las estructuras artificiales "aleatorias" descritas en el documento de solicitud de patente internacional WO2015/063117. Los epítomos de CD4 de TERT y las estructuras artificiales carecen de actividad catalítica telomerasa. Las estructuras artificiales de la invención codifican menos del 70% de los epítomos de CD4 de TERT, aún más preferiblemente, menos del 60%, menos del 50%, menos del 40%.

15 En una realización particular, la estructura artificial de poliepítomos codifica un polipéptido de menos de 160 aminoácidos, preferiblemente menos de 120, cuya secuencia comprende al menos dos, preferiblemente tres, aún más preferiblemente al menos cuatro epítomos de CD4 de TERT diferentes, en donde dichos epítomos están opcionalmente separados por un espaciador de aminoácidos.

El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN, codifica entre 2 y 30 epítomos de CD4 de TERT, preferiblemente entre 2 y 20, 3 y 18, 3 y 15, 3 y 12, 4 y 10, o aún más preferiblemente entre 4 y 8, epítomos de CD4 de TERT.

20 La expresión "epítomo de TERT" se refiere a cualquier fragmento de aminoácido de TERT que es un determinante antigénico, es decir, es reconocido por las células del sistema inmune y es inmunogénico, es decir, puede provocar una respuesta inmune.

25 La expresión "epítomo de CD4 de TERT" se refiere a un fragmento de TERT que es capaz de unirse a moléculas del HLA de clase II y presentarse a los linfocitos T CD4. Los epítomos de CD4 más útiles de TERT también se denominan "UCPs" o "péptidos universales contra el cáncer", lo que significa que se expresan en la mayoría de los tumores. Los UCPs codificados por las estructuras artificiales de la invención se pueden unir a una amplia gama de alelos del HLA de clase II, más particularmente a un alelo del HLA-DR pero también a alelos del HLA-DQ y HLA-DP. Los péptidos también se denominan "péptidos del HLA de clase II". Preferiblemente, puede ser reconocido específicamente por linfocitos T anti-TERT. Se han descrito diversas secuencias de epítomos inmunogénicos de TERT. Véase, por ejemplo, el documento de solicitud de patente internacional WO2013/135553.

30 Las secuencias de epítomos de CD4 codificadas por la estructura artificial de la invención son secuencias peptídicas de 15 a 20 aminoácidos que se obtienen a partir de TERT. Preferiblemente, los péptidos son péptidos de 15 a 17 aminoácidos que se obtienen a partir de TERT.

35 Los péptidos tal y como se definen en el presente documento se pueden presentar como un complejo con una pluralidad de moléculas del HLA de clase II en la superficie de células tumorales o de células presentadoras de antígeno, por lo que son útiles en una mayoría de los pacientes.

Los péptidos son capaces de generar una respuesta de linfocitos Th CD4, preferiblemente una respuesta de linfocitos Th1, dirigida contra la proteína telomerasa, y tienen un efecto cooperador sobre la actividad citotóxica de los linfocitos T CD8.

40 Cuatro epítomos de CD4 son de particular interés: UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4. Las secuencias de aminoácidos se presentan en la Tabla a continuación.

Tabla 4: Secuencias de UCPs

Péptidos	Secuencias
UCP1	PAAFRALVAQCLVCV (SEQ ID NO: 1)
UCP2	KSVWSKLQSIGIRQH (SEQ ID NO: 2)
UCP3	GTAFFVQMPAHGLFPW (SEQ ID NO: 3)
UCP4	SLCYSILKAKNAGMS (SEQ ID NO: 4)

Otros epítomos de CD4 incluyen péptidos sustancialmente homólogos que se obtienen a partir de SEQ ID NO: 1, 2, 3 o 4 a través de una o varias sustituciones. Preferiblemente, las sustituciones son conservadoras y/o mejoran la inmunogenicidad del péptido.

5 Ventajosamente, al menos uno de dichos epítomos de CD4 de TERT se selecciona a partir del grupo que consiste en UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4.

En una realización particular, al menos dos epítomos de CD4 codificados por el vector de expresión de ADN o la mezcla de vectores de expresión de ADN, son distintos entre sí. Por ejemplo, el vector o la mezcla de vectores, puede codificar una secuencia de poliepítomos que comprende UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4.

10 En otra realización particular, al menos dos epítomos de CD4 de TERT codificados por el vector de expresión de ADN o la mezcla de vectores de expresión de ADN, son idénticos y se repiten. Por ejemplo, el vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN, puede codificar una repetición de al menos dos, preferiblemente al menos tres, preferiblemente al menos cuatro, epítomos UCP2.

15 Las unidades polinucleotídicas que codifican los epítomos múltiples se pueden organizar en cualquier orden, consecutivamente, es decir, el extremo 3' de la primera unidad polinucleotídica está directamente unido al extremo 5' de la segunda unidad polinucleotídica (y así sucesivamente), dando como resultado un polinucleótido que codifica una secuencia peptídica compuesta exclusivamente por epítomos consecutivos. Los epítomos múltiples alternativamente pueden estar separados por un espaciador de un aminoácido o un espaciador peptídico, es decir, lo que significa que las diferentes unidades polinucleotídicas están separadas por uno o varios codones que codifican respectivamente uno o varios aminoácidos. Típicamente, los epítomos de CD4 de TERT pueden estar separados por aproximadamente cuatro a seis aminoácidos de Gly.

20 Un experto en la materia puede determinar el orden en que se organizan los epítomos, de acuerdo con los siguientes criterios: algunos órdenes pueden facilitar la transcripción y/o la traducción del polinucleótido, pueden facilitar el transporte del poliepítomo expresado resultante al retículo endoplásmico (RE), especialmente si la conformación tridimensional afecta a las propiedades, y pueden facilitar el procesamiento del poliepítomo en varios epítomos o análogos y evitar el procesamiento de epítomos solapantes.

25 La sección experimental ilustra la invención utilizando los poliepítomos UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4 (pUCPbasic) y UCP2 repetido 4 veces [pUCP2(4x)] como refuerzos. Sin embargo, varios otros epítomos del HLA-DR (clase II) de hTERT, que fueron identificados a lo largo de la secuencia proteica de hTERT mediante predicción *in silico*, también son excelentes candidatos para mejorar las respuestas de CTLs (Tabla 5).

30 Tabla 5: péptidos del HLA-DR de hTERT previstos por el algoritmo NetMHCII

Péptido	Secuencia	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR15	DRB3
TERT 44-58 (UCP1)	PAAFRALVAQCLVCV (SEQ ID NO:1)	4,5	5363,4	90,6	11,4	85,6	350	127
TERT 578-592 (UCP2)	KSVWSKLQSIGIRQH (SEQ ID NO:2)	7,1	7522,9	381,4	29,0	94,2	119,2	11328,6
TERT 916-930 (UCP3)	GTAFVQMPAHGLFPW (SEQ ID NO:3)	3,3	972,7	46,8	28,9	94,8	215,2	1733,2
TERT 1041-1055 (UCP4)	SLCYSILKAKNAGMS (SEQ ID NO:4)	4,8	2485,2	59,7	38,5	12	94,5	17806,4
SB1	SFLSSLRPSLTGAR (SEQ ID NO:5)	4,4	36,1	66,8	226	14,7	325,5	2962
SB2	SRPWMPGTPRRLPRL (SEQ ID NO:6)	9,5	14790	2113	16,1	394	2758	12187
SB3	RPLFLELLGNHAQCP (SEQ ID NO:7)	3,9	3619	19,6	587,4	67	62,6	101,35
SB4	AKFLHWLMSVYVVEL (SEQ ID NO:8)	4,2	5383	283,3	12,4	205	27,7	1365

Péptido	Secuencia	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR15	DRB3
SB5	VKALFSVLNYERARR (SEQ ID NO:9)	12,0	513	40,4	243	26,8	88	9416
SB6	ELYFVKVDVTGAYDT (SEQ ID NO:10)	10,5	47,2	25,1	320	124	1132	11,7
SB7	LQPYMRQFVAHLQET (SEQ ID NO:11)	9,7	1428	40,3	236	150	32,8	1428
SB8	FLRFMCHHAVRIRGK (SEQ ID NO:12)	9,5	1638	68,8	4,3	18,4	50,1	999
SB9	AFVQMPAHGLFPWCG (SEQ ID NO:13)	3,6	1512	94,7	64,4	199	471	3307
SB10	YSSYARTSIRASLTF (SEQ ID NO:14)	9,3	2596	40,3	109	20,5	1020	5395
SB11	NRGFKAGRNMRRKLF (SEQ ID NO:15)	7,5	105,7	94,8	1642	89,7	461,9	3066
SB12	NIYKILLQAYRFHA (SEQ ID NO:16)	5,7	322,2	83	282,6	13,2	4,1	1088,9
SB13	PTFFLRVISDTASLC (SEQ ID NO:17)	4,9	160,5	10,0	69,8	34,7	208,9	45,7
SB14	RVTYVPLLGLSLRTAQ (SEQ ID NO:18)	6,8	279,3	72,4	1875	41,4	159,4	8867
SB15	LGSLRTAQTQLSRKL (SEQ ID NO:19)	5,8	285,9	259	172,1	466	2100,1	11885
SB16	GTTLTALEAAANPAL (SEQ ID NO:20)	7,2	15029	39,1	295,6	962,9	3396	10799

Los candidatos a epítipo que se unen fuertemente (SB) se predijeron usando el algoritmo NetMHCII versión 2.2 (Nielsen y Lund, 2009). Las secuencias son las de hTERT de tipo silvestre (nº de orden NM_198253). La afinidad de los que se unen fuertemente se proporciona en nM. Umbral de los que se unen fuertemente <50 nM (**en negrita**). Umbral de los que se unen débilmente >500 nM.

De acuerdo con la presente invención, la expresión "epítipo de CD4 de TERT" incluye cualquiera de las secuencias anteriores.

Los epítipos de CD8:

- 5 El epítipo de CD8 codificado por los vectores de la invención es un péptido que es capaz de activar una respuesta de linfocitos T CD8 contra un antígeno. Preferiblemente, dicho epítipo de CD8 es capaz de activar una respuesta antitumoral de CD8 o una respuesta de CD8 contra un antígeno vírico, bacteriano o parasitario. En una realización particular, el o los vectores codifican todo un antígeno o parte de un antígeno vírico, bacteriano o parasitario que comprende epítipos del MHC de clase I.
- 10 El o los vectores que comprenden dicho epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario codifican por tanto preferiblemente un antígeno de CD8 de longitud completa o sustancialmente completa, tumoral, vírico, bacteriano o parasitario, o fragmentos de epítipo de CD8 del mismo. Más ventajosamente, la presente invención hace uso de mutantes no oncogénicos de dichos antígenos de CD8. Ejemplos de péptidos de epítipos de CD8 se obtienen a partir de los siguientes antígenos: tirosinasa, alfafetoproteína, antígeno carcinoembrionario (CEA), CA-125, MUC-1,

antígeno tumoral epitelial, antígeno asociado a melanoma, P1A, MART-1/Melan-A y gp 100/pMe117, así como la proteína relacionada con tirosinasa pg75 y MUM-1, HER2/neu, proteínas del virus del papiloma humano E6 y E7, survivina, Gnt-V, beta-catenina, CDK4, p15, MAGE1, MAGE3, BAGE, GAGE, PSMA, TARP, STEAP, HTLV-1 Tax y WT1.

- 5 Ejemplos de péptidos de epítomos de CD8 incluyen, pero no se limitan a: gp100.154, NA17-A.nt38 y Melan-A/MART-1.27, CEA.571, Tyrosinase.368-N, p53.65, Her2/neu.369-377, gp100.209, gp100.280, gp100.476, Tyrosinase.368-D, MAGE-3.271 y Her2/neu.654, gp100.457, Melan-A/MART-1.32, p53.149, p53.264, Sur1M2 y HPV E7.86.

- 10 En una realización particular, dicho epítipo de CD8 es un mutante no oncogénico del antígeno E7 de HPV. Ese antígeno muestra varios epítomos de clase I y carece de epítomos de alta afinidad hacia determinantes del HLA de MHC de clase II. Por lo tanto, los enfoques de vacunas de ADN dirigidas solo a E7 siempre han dado resultados decepcionantes (Chen et al., 2000). La presente invención mejora la respuesta inmune contra ese antígeno, que es particularmente útil en el tratamiento del cáncer de cuello uterino.

Vectores y administración

- 15 Los vectores de expresión usados en la presente invención pueden proporcionar una expresión *in vitro* y/o *in vivo* (por ejemplo, en una célula hospedadora adecuada, un organismo hospedador y/o un sistema de expresión). Típicamente comprenden una secuencia de polinucleótidos como se ha definido anteriormente, y secuencias reguladoras (tales como uno o varios promotores, potenciadores, terminadores adecuados, etc.) que permiten la expresión (por ejemplo, transcripción y traducción) del producto proteico en la célula hospedadora o el organismo hospedador.

- 20 Los vectores de acuerdo con la invención pueden estar en forma de un vector, tal como, por ejemplo, un plásmido, un cósmido, un YAC, un vector viral o un transposón.

- 25 En un aspecto preferido pero no limitante, un vector de la invención comprende i) al menos un ácido nucleico como se ha descrito anteriormente; conectado funcionalmente a ii) uno o varios elementos reguladores, tales como un promotor y opcionalmente un terminador adecuado; y opcionalmente también iii) uno o varios elementos adicionales de estructuras artificiales genéticas tales como secuencias 3'-UTR o 5'-UTR, secuencias líderes, marcadores de selección, marcadores de expresión/genes informadores y/o elementos que pueden facilitar o aumentar (la eficacia de) la transformación o integración.

- 30 En realizaciones particulares, el o los vectores utilizados en la invención pueden comprender insertos adicionales que codifican adyuvantes moleculares (citocinas, quimiocinas o moléculas coestimuladoras), secuencias cortas de ADN que promueven la presentación del antígeno del MHC, p. ej., IMX313, tecnología IMAXIO (oligomerización del antígeno), complementos que ayudan al antígeno a penetrar en un compartimento celular específico (por ejemplo, LAMP-1) o que pueden actuar como adyuvantes para estimular o dirigir la respuesta inmune.

En una realización particular, la estructura artificial genética se puede preparar digiriendo el polímero de ácido nucleico con una endonucleasa de restricción y clonando en un plásmido que contiene un promotor tal como el promotor de SV40, el promotor de citomegalovirus (CMV) o el promotor del virus del sarcoma de Rous (RSV).

- 35 Otros vectores incluyen vectores retrovirales, vectores de lentivirus, vectores de adenovirus, vectores del virus vacinia, vectores del virus de la viruela, vectores del virus de sarampión y vectores asociados a adenovirus.

En una realización particular, se proporciona un kit que comprende

- 40 a. un primer recipiente que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica dichos al menos dos epítomos de CD4 de TERT y
b. un segundo recipiente que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.

- 45 El kit puede proporcionar además al menos un recipiente adicional que contiene al menos otro vector de expresión de ADN que codifica al menos otro epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario. Esos kits pueden ser particularmente útiles en un contexto de vacunación contra una pluralidad de antígenos tumorales, víricos, bacterianos o parasitarios diferentes. Esos antígenos se pueden obtener a partir de la misma proteína, o a partir de diferentes proteínas, pueden ser expresados por el mismo tumor o diferentes tipos de tumor, o por el mismo agente vírico, bacteriano o parasitario o por diferentes tipos.

- 50 El vector de expresión de ADN que codifica dichos al menos dos epítomos de CD4 de TERT y el vector de expresión de ADN que codifica al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario, si se proporcionan en recipientes distintos, se administran preferiblemente de manera simultánea o sustancialmente simultánea. En una realización particular, se inyectan tópicamente uno cerca del otro.

En una realización particular, los recipientes o las especies se pueden mezclar de manera extemporánea o por adelantado antes de la administración al sujeto.

Se pueden preparar composiciones que comprenden dicho(s) vector(es). Las composiciones son inmunogénicas. Pueden comprender un vehículo o excipientes que son adecuados para la administración en seres humanos o mamíferos (es decir, no tóxicos y, si es necesario, estériles). Esos excipientes incluyen diluyentes líquidos, semisólidos o sólidos que sirven como vehículos farmacéuticos, agentes isotónicos, estabilizadores o cualquier adyuvante. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizadores incluyen albúmina, entre otros. En la composición de la vacuna se puede usar cualquier adyuvante conocido en la técnica, incluidos adyuvantes a base de aceite tales como el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund, adyuvantes a base de micolato, lipopolisacárido bacteriano (LPS), peptidoglucanos, proteoglicanos, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (como el miglitol), aceites vegetales (como el aceite de arachis), polioles de Pluronic®.

Los vectores o la composición se pueden administrar directamente o se pueden incluir en liposomas o recubrir partículas de oro coloidal antes de la administración. Las técnicas para incluir vacunas de ADN en liposomas se conocen en la técnica, por ejemplo, a partir de Murray, 1991. De manera similar, las técnicas para recubrir partículas de oro con ADN desnudo se indican en Yang, 1992, y en Adolph, 1996 se encuentran técnicas para la expresión de proteínas usando vectores víricos.

Las composiciones de vacuna se administran preferiblemente por vía intradérmica, subcutánea, intramuscular, dentro de los tumores o en cualquier tipo de órganos linfoides y se administran en una cantidad eficaz para estimular una respuesta inmune en el organismo hospedador. Está disponible una variedad de técnicas, como la electroporación (p. ej., utilizando Cliniporator, IGEA, BTX, Harvard Apparatus), enfoques sin agujas, como el bombardeo de partículas (p. ej., el dispositivo PMED de Pfizer) y el suministro a alta presión (p. ej., dispositivos Biojector, Bioject Medical Technologies), parches dérmicos (p. ej., DermaVir, Genetic Immunity), formulación de una vacuna de ADN en micropartículas o liposomas (p. ej., la formulación en el compuesto lipídico Vaxfectin, Vical).

En una realización preferida, la administración comprende una etapa de electroporación, también indicada en esta memoria con el término "electrotransferencia", además de la etapa de inyección (como se describe en Mir 2008, Sardesai y Weiner 2011). En una realización más ventajosa, el protocolo de electrotransferencia es como se describe en el documento de solicitud de patente internacional WO2015/063112.

Si bien se entenderá que la cantidad de material necesario dependerá de la inmunogenicidad de cada estructura artificial individual y no se puede predecir *a priori*, el proceso para determinar la dosificación apropiada para cualquier estructura artificial dada, es sencillo. Específicamente, una serie de dosificaciones de tamaño creciente, comenzando en aproximadamente 5 a 30 µg, o preferiblemente 20-25 µg, hasta desde aproximadamente 500 µg a aproximadamente 5 mg, preferiblemente hasta 500-1500 µg, 500-1200 µg o 500-1000 µg, por ejemplo, se administra a las especies correspondientes y se observa la respuesta inmune resultante, por ejemplo, mediante la detección de la respuesta inmune celular a través de un ensayo Elispot con IFNγ (como se describe en la sección experimental), mediante la detección de respuestas de CTLs utilizando un ensayo de lisis *in vivo* o un ensayo de liberación de cromo o detectando la respuesta de Ths (linfocito T cooperador) utilizando un ensayo de liberación de citocinas.

En una realización preferida, el régimen de vacunación comprende de una a tres inyecciones, preferiblemente repetidas tres o cuatro semanas después.

En una realización particular, la pauta de vacunación puede estar compuesta por una o dos inyecciones seguidas tres o cuatro semanas después, por al menos un ciclo de tres a cinco inyecciones. En otra realización, una primera dosis consiste en una a tres inyecciones, seguida por al menos una dosis de refuerzo cada año, o cada dos años, por ejemplo.

Estos son solo ejemplos, y cualquier otro régimen de vacunación está incluido en esta memoria.

Usos terapéuticos

Se describe un método para tratar un tumor o una infección en un paciente que lo necesita, cuyo método comprende administrar a dicho paciente los vectores o la mezcla de vectores descritos en este documento.

Los vectores utilizados en la presente invención inducen especialmente linfocitos T CD4 polarizados a Th1 con avidez elevada, que mejoran significativamente las respuestas de CTLs contra antígenos débilmente inmunogénicos.

Los vectores o la mezcla de vectores tal y como se ha descrito anteriormente, es útil en un método para prevenir o tratar un tumor en un paciente.

Se describe un método para prevenir o tratar un tumor en un paciente, cuyo método comprende administrar una cantidad eficaz de dicho ácido nucleico o composición inmunogénica a un paciente que lo necesite. Dicho ácido nucleico o composición inmunogénica se administra en una cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune en el paciente.

El tumor puede ser cualquier proliferación no deseada de células, en particular un tumor benigno o un tumor ma-

ligno, especialmente un cáncer.

El cáncer puede estar en cualquier estadio de desarrollo, incluido el estadio metastásico. El cáncer puede ser crónico o no crónico (agudo).

En otra realización, la descripción también se refiere a una vacuna útil para prevenir un tumor.

5 En una realización particular, el tumor es un cáncer sólido o un carcinoma. Los ejemplos incluyen melanoma, tumor cerebral tal como glioblastoma, neuroblastoma y astrocitoma y carcinomas de la vejiga, mama, cuello uterino, colon, pulmón, especialmente cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), cáncer de páncreas, próstata, cabeza y cuello o cáncer de estómago.

10 En otra realización, el tumor puede ser un tumor líquido, p. ej., un tumor hematopoyético o leucemia, tal como una leucemia linfocítica crónica o aguda, leucemia mieloide crónica o aguda, linfoma que incluye la enfermedad de Hodgkin, mieloma múltiple, mieloma maligno. Preferiblemente, el paciente que se va a tratar se ha sometido o está a punto de someterse a una terapia convencional, lo más preferiblemente una terapia convencional de primera línea.

15 En una realización particular, el tratamiento se puede combinar con una terapia convencional, que incluye quimioterapia, radioterapia o cirugía. Las combinaciones con moléculas inmunomoduladoras adyuvantes tales como GM-CSF o una citocina como IL-2 o IL-12, también podrían ser útiles.

En otra realización, el paciente puede estar infectado con un virus, un parásito o una bacteria. Los ejemplos de virus incluyen virus del papiloma, virus del herpes simple, virus de la hepatitis, adenovirus, mixovirus tal como la gripe, paramixovirus, poxvirus tal como la variolovacuna, lentivirus tal como el VIH.

Los Ejemplos y las Figuras ilustran la invención sin limitar su alcance.

20 Ejemplos

EJEMPLO 1: Inducción de una respuesta contra el antígeno E7 de HPV16 después de una administración conjunta de plásmidos de ADN

25 Se demostró que los epítomos de CD4 de hTERT universales codificados por diversas estructuras artificiales de ADN desempeñaban un papel cooperador en la inducción de una respuesta de CTLs contra el antígeno E7 de HPV16, después de una administración conjunta de plásmidos de ADN mediante inyección intradérmica combinada con electroporación. Ratones transgénicos HLA-A2/DR1 se inmunizaron con estructuras artificiales de ADN que codificaban epítomos de CD4 obtenidos a partir de hTERT (a saber, UCP por "Universal Cancer Peptides") en presencia de un plásmido que codificaba un mutante no oncogénico del antígeno E7 de HPV16. Diez días después de una segunda inmunización con plásmidos (refuerzo), se evaluó la frecuencia de las respuestas inmunitarias de los linfocitos T CD4 y CD8 en el bazo de los animales mediante un ensayo ELISpot con IFN-γ. Los subconjuntos de linfocitos T funcionalmente polarizados se identificaron en función de sus patrones distintivos de secreción de citocinas, utilizando un ensayo CBA.

Abreviaturas

35 HLA-A2/DR1: ratones HLA-A*0201/HLA-DRB1*0101 transgénicos, H2 de clase I/clase II KO, CBA: matriz de esferas citométricas, CTL: linfocito T citotóxico, ADN: ácido desoxirribonucleico, EP: electroporación, HLA: antígeno leucocitario humano, HPV16: virus del papiloma humano de tipo 16, hTERT: TERT humana, ID: intradérmico, IL: interleucina, IFN-γ: interferón gamma, MHC: complejo principal de histocompatibilidad, TAA: antígeno asociado a tumores, TERT: transcriptasa inversa de la telomerasa, TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa, RT: temperatura ambiente, wt: tipo silvestre, UCP: péptido universal del cáncer

40 Materiales y métodos

Vectores de ADN plasmídico

pUCPbasic

45 pUCPbasic es un vector de expresión plasmídico de 5717 pb que codifica epítomos de la clase II obtenidos a partir de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT), a saber, UCP1, UCP2, UCP3 y UCP4 (101 AA), ligados con un marcador V5 de 14 AA (Figura 1, Figura 8), correspondiente a un polipéptido de aproximadamente 12,7 kDa de peso molecular. La secuencia de inserción de hTERT se compone de cuatro fragmentos: AA 2-26, AA 27-51, AA 52-76, AA 77-101 correspondientes respectivamente a hTERT de tipo silvestre (nº de orden NM_198253): AA 39-63 de hTERT, AA 573-597 de hTERT, AA 911-935 de hTERT y AA 1036-1060 de hTERT, que incluye epítomos de UCP-1-4 de clase II y sus secuencias flanqueantes de 5 AA. Estos fragmentos contienen cuatro epítomos bien caracterizados CD4+ de hTERT de 15 meros (TERT 44-58 PAAFRALVAQCCLVCV (SEQ ID NO: 1), TERT 578-592 KSVWSKLQSIGIRQH (SEQ ID NO: 2), TERT 916-930 GTAFVQMPAHGLFPW (SEQ ID NO:3), TERT 1041-1055 SLCYSILKAKNAGMS (SEQ ID NO: 4) y dos epítomos internos CD8+ de la telomerasa de 9 meros (Godet et al. 2012; Suso et al. 2011).

pUCP2(4x)

5 pUCP2(4x) es un vector de expresión plasmídico de 5717 pb que codifica el epítipo de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana CD4+ 578-592 (KSVWSKLQSIGIRQH, (SEQ ID NO: 2), nº de orden NM_198253) con secuencias flanqueantes de 5 AA en cada lado. Esta unidad de epítipo de UCP2 se repite cuatro veces y se une con un marcador de epítipo V5 de 14 AA (Figura 2, Figura 9), que se corresponde con un polipéptido de aproximadamente 12,7 kDa de peso molecular.

pDE7

10 pDE7 es un vector de expresión plasmídico de 5708 pb que codifica una variante no oncogénica de E7 de HPV16 (98 AA) (Wieking et al., 2012) unida con un marcador de epítipo V5 de 14 AA (Figura 3, Figura 10), que se corresponde con una proteína de aproximadamente 14-15 kDa de peso molecular. Para disminuir el riesgo asociado con la entrega del E7 de HPV oncogénico, se mutaron cuatro regiones oncogénicas conocidas dentro de E7 (Munger et al., 2004). Las mutaciones introducidas en E7 evitan su capacidad de unirse/inactivar pRb y para asociarse con Mi2β que potencia el crecimiento celular (Brehm et al., 1999).

Síntesis génica y clonación

15 Los genes se sintetizaron mediante un procedimiento de ensamblaje de oligonucleótidos de 40 meros solapantes (GeneCust, Luxemburgo) e incluían sitios de restricción únicos flanqueantes *HindIII*/*XhoI*. Los genes sintéticos se clonaron entre los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* del vector de expresión pcDNA3.1(+) (Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.). pcDNA3.1(+) es un vector de 5,4 kb obtenido a partir de pcDNA3.0 que se había diseñado para tener un nivel elevado de expresiones estables y transitorias en células de mamífero. Ese vector contiene el promotor inmediato-temprano de citomegalovirus humano (CMV-IE) y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (BHG-poliA) como secuencia de terminación.

20

Producción de plásmidos exentos de endotoxinas

25 Los plásmidos fueron transformados y se produjeron en células de *E. coli* 5-alfa (fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) (Lucigen Corporation, Middleton, EE.UU., ref. 60602-2) por RD Biotech (Besançon, Francia). Los plásmidos exentos de endotoxinas se resuspendieron en 1x PBS estéril a 4 mg/ml. Las estructuras artificiales se verificaron mediante digestión con enzimas de restricción.

Cultivo celular y transfección transitoria

30 Las células HEK293T se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de ternera fetal termoinactivado al 10% (PAA, Velizy-Villacoublay, Francia) y 1% de penicilina/estreptomina (Life technologies SAS, Saint-Aubin, Francia).

Las células se cultivaron como monocapas en matraces de 75 cm² a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Se sembraron 8x10⁵ células en placas de cultivo de tejidos de seis pocillos y se incubaron durante 24 h. Las células se cultivaron hasta tener un 70-80% de confluencia el día de la transfección.

35 Las estructuras artificiales pUCPbasic, pUCP2(4x), pDE7 se transfectaron en células diana usando el reactivo de transfección de polímero catiónico jetPrime (Polyplus-transfection Inc., Illkirch, Francia). Se utilizaron células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1 como control negativo. Después de 48 horas de transfección, las células se recogieron y se analizaron para estudiar la expresión.

Transferencia Western

40 Las células HEK293T transfectadas con pUCPbasic, pUCP2(4x), pDE7 y pcDNA3.1 se lisaron sobre hielo durante 20 minutos en tampón RIPA (Sigma Aldrich SARL, Saint-Quentin Fallavier, Francia) complementado con una mezcla de inhibidores de proteasa (Roche Diagnostic, Indianapolis, EE.UU.). Los lisados se eliminaron por centrifugación a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el material sobrenadante y se midió la concentración de proteína usando el ensayo colorimétrico de Bradford.

45 La proteína pDE7 se inmunoprecipitó usando perlas de agarosa conjugadas con anti-V5 (Abcam, Cambridge, Reino Unido). Las células se lisaron con un tampón de lisis celular que contenía NaCl 125 mM, Tris 50 mM pH 8, EDTA 25 mM pH8 y NP40 al 0,5% durante 15 min y se centrifugaron a 1600 rpm durante 5 min, y después se añadieron 20 µl de agarosa anti-V5 (Abcam). Las muestras se sometieron a rotación durante la noche a 4°C y se lavaron tres veces con tampón de lisis celular frío.

50 Todas las muestras de proteínas se volvieron a suspender en 1x tampón de muestra (Life technologies SAS, Saint-Aubin, Francia), se desnaturalizaron 5 minutos a 90°C, se separaron en geles de Nu-PAGE® Novex con Bis-Tris al 4-12% (Life Technologies) y se sometieron a una electrotransferencia sobre membranas de PVDF (apilamiento para la transferencia iBlot®, Life Technologies) utilizando el dispositivo iBlot® (Life Technologies). Se usó el marcador de proteínas ProSieve™ QuadColor™ (Lonza, Levallois-Perret, Francia) para determinar el peso molecular. Las mem-

branas se cortaron aproximadamente a 40 kDa y se bloquearon con PBS 1X, Tween®20 al 0,05%, leche al 3%. La parte inferior de la membrana se analizó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-V5 (Life Technologies) diluido 1/5000 y la parte superior se analizó con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-β-actina (Sigma Aldrich SARL, Saint-Quentin Fallavier, Francia) diluido 1/5000. A continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-ratón unido a HRP (GE Healthcare, Vélizy, Francia) diluido 1/5000 y las proteínas se detectaron mediante un ensayo de quimioluminiscencia mejorado, usando el kit de reactivos de sustrato quimioluminiscente de HRP ECL. Las membranas se visualizaron en un sistema ChemiDoc XRS (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, Francia) y se analizaron utilizando el programa informático Image Lab 5.2.1 (Bio-Rad).

Ratones

- 10 Ratones transgénicos HLA-A*0201/DRB1*0101 (HLA-A2/DR1) (13-16 semanas de edad) fueron suministrados por el Institut Pasteur (París, Francia) o CDTA-TAAM (Orleans, Francia). Esos ratones expresan los dominios α1α2 de HLA-A*0201 humano y el dominio α3 murino de la molécula H2-D, la β2-microglobulina humana y las moléculas HLA-DRB1*0101 y HLA-DRA*0101. Están desactivados los genes H2-D^b, H2-K^b e IA^b (Pajot et al., 2004).

- 15 Los animales se alojaron en las instalaciones para animales exentas de agentes patógenos del Institut Pasteur. Todos los animales fueron manejados de forma estrictamente conforme con la buena práctica animal y cumpliendo con la experimentación local con animales (Directiva 2010/63/UE).

Inmunización

- 20 Antes del tratamiento, los ratones se anestesiaron con una solución mixta de xilacina al 2% (Rompun, Bayer Santé, Loos, Francia) y ketamina al 8% (Imalgen 1000, Merial, Lyon, Francia) en PBS (Life technologies SAS, Saint-Aubin, Francia) a través de la vía intraperitoneal (IP) según el peso de cada animal y la duración de la anestesia. Los plásmidos se inyectaron después por vía intradérmica (ID) en la parte inferior de la espalda el día 0 (cebado) y el día 21 (refuerzo) y se electroporaron. Brevemente, inmediatamente después de la inyección ID, se realizó un pliegue en la piel en el sitio de la inyección, completamente cubierto con un gel conductor y colocado entre las placas de electrodos del dispositivo de electroporación (CLINIPORATOR® 2, IGEA, Carpi, Italia). Se aplicaron dos impulsos con voltajes (HV-LV) como se describe a continuación. Los grupos experimentales se definieron como se resume en la Tabla 6.

Tabla 6: Distribución de la numeración de ratones y las condiciones de tratamiento

Grupos	Número de animales	Número de ratón	Tratamiento	Dosis (μg)	Volumen de la inyección/ratón	Vía	Parámetros de la electroporación
1	4	1-4	pDE7/pcDNA3.1	100+100	50 μl	ID	Electrodo: P-30-8B (0,5 cm de separación) HV = 1250 V/cm, 1 Hz, 100 μs, 1 impulso, interrupción de 1000 ms LV = 180 V/cm, 1 Hz, 400 ms, 1 impulso
2	5	5-9	pDE7/pUCP2(4x)	100+100			
3	4	10-13	pDE7/pUCPbasic	100+100			

ID = intradérmica;

Péptidos

- 30 Para los análisis de la respuesta inmune, los péptidos de hTERT restringidos a HLA-DR y los péptidos de E7 restringidos a HLA-A*0201 se describieron previamente o se determinaron mediante predicción *in silico* de epítomos usando los algoritmos SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) Rammensee et al., 1999) o NetMHCII 2.2 (Nielsen y Lund, 2009) disponibles en línea. Todos los péptidos sintéticos se compraron liofilizados (>90% de pureza) en Proimmune (Oxford, Reino Unido). Los péptidos liofilizados se disolvieron en agua estéril a 2 mg/ml y se almacenaron a -80°C antes de su uso. Los detalles de las secuencias de los péptidos y las restricciones del MHC se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Péptidos de hTERT y E7 con MHC restringido

Péptido	Grupo	Secuencia	MHC
---------	-------	-----------	-----

Péptido	Grupo	Secuencia	MHC
TERT 44-58 (UCP1) TERT 578-592 (UCP2) TERT 916-930 (UCP3) TERT 1041-1055 (UCP4)	Grupo 1	PAAFRALVAQCLVCV (SEQ ID NO: 1) KSVWSKLQSIGIRQH (SEQ ID NO: 2) GTAFVQMPAHGLFPW (SEQ ID NO: 3) SLCYSILKAKNAGMS (SEQ ID NO: 4)	HLA-DR
E7 9-23 E7 73-87	Grupo 2	HEYMLDLQPETTDLY (SEQ ID NO: 27) HVDIRTLEDLLMGTL (SEQ ID NO: 28)	HLA-DRB1*0101
E7 7-15 E7 11-20 E7 14-22 E7 78-87 E7 81-90 E7 82-90 E7 86-93	Grupo 3	TLHEYMLDL (SEQ ID NO: 29) YMLDLQPETT (SEQ ID NO: 30) DLQPETTDL (SEQ ID NO: 31) TLEDLLMGTL (SEQ ID NO: 32) DLLMGTLGIV (SEQ ID NO: 33) LLMGTLGIV (SEQ ID NO: 34) TLGIVCPI (SEQ ID NO: 35)	HLA-A*0201

Ensayo ELISpot con IFN- γ

Diez días después de la vacunación de refuerzo, los ratones fueron sacrificados mediante narcosis con CO₂ y se extirparon los bazo. A continuación, los bazo se machacaron y las suspensiones de esplenocitos se filtraron a través de una malla de nailon de 70 μ m (Cell Strainer, BD Biosciences, Pont-de-Claix, Francia), se purificaron en ficol (medio de separación de linfocitos, Eurobio, Les Ulis, Francia) y se numeraron usando el contador Cellometer® Auto T4 Plus (Ozyme, Montigny-le Bretonneux, Francia). Después se añadieron los esplenocitos purificados a microplacas de PVDF de ELISpot (kit de ELISpot con IFN- γ , Diaclone, Besançon, Francia) recubiertas con un anticuerpo anti-IFN- γ de ratón a 2×10^5 células/pocillo por triplicado y estimulados con 5 μ g/ml de péptidos (véase la Tabla 7), 10 μ g/ml de PMA-ionomicina (Sigma-Aldrich), o estimulados de forma simulada con medio de cultivo exento de suero. Para contar el número de células secretoras de IFN- γ específicas del antígeno E7 y hTERT, se usaron tres grupos de péptidos diferentes: CD4+ hTERT (grupo 1), CD4 E7 (grupo 2) o CD8 E7 (grupo 3) (Tabla 7). Después de 19 horas, las manchas se revelaron con un anticuerpo de detección anti-IFN γ conjugado con biotina, seguido de estreptavidina-HRP y solución de sustrato BCIP/NBT. Se contaron las manchas y se analizaron utilizando el recuento y el programa informático de ImmunoSpot® ELISpot (Cellular Technology Limited, Bonn, Alemania).

Ensayo de unión a citocinas (CBA)

Esplenocitos (6×10^5 células) procedentes de ratones HLA-A2/DR1 vacunados, se cultivaron durante 24 h a 37°C con péptidos obtenidos a partir de hTERT con HLA-DR restringido, procedentes del grupo 1, con una concentración final de 5 μ g/ml. El material sobrenadante del cultivo de citocinas se recuperó y se mantuvo congelado a -20°C hasta la prueba. Se usó el kit de matriz de perlas citométricas Th1/Th2/Th17 de ratón (CBA, BD Biosciences) para cuantificar, respectivamente, la concentración de IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17a. El inmunoensayo CBA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La citometría de flujo se realizó usando el citómetro de flujo FACScan LSR II (BD Biosciences). Se generaron resultados cuantitativos utilizando el programa informático de FCAP Array TM versión 3.0 (Becton Dickinson, Pont-de-Claix, Francia).

25 Análisis estadístico

Las diferencias entre dos grupos se evaluaron mediante una prueba t no emparejada o una prueba U de Mann y Whitney no paramétrica. La prueba del coeficiente de correlación de Pearson se utilizó para evaluar la correlación entre las respuestas de hTERT de clase II y E7 de clase I en ratones inmunizados. Todos los análisis informáticos se realizaron con GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc. La Jolla, CA, EE. UU.). Los valores de p < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

Resultados

Caracterización y análisis de la secuencia de estructuras artificiales

Los transgenes de ADN que expresaban las proteínas UCPbasic, UCP2(4x) y DE7 se sintetizaron y clonaron en un vector de expresión pcDNA3.1(+) de Life Technologies, tal y como se muestra mediante digestión con enzimas de restricción y electroforesis (Figura 4). Los insertos y las uniones se secuenciaron usando cebadores de T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3' directo, (SEQ ID NO: 36)) y/o de BGH (5' TAGAAGGCACAGTCGAGG 3' inverso (SEQ ID NO: 37) que coincidían con la secuencia del vector que flanqueaba el ADN del inserto (véase la Tabla 8). Los resultados de la secuenciación confirmaron que los transgenes se habían sintetizado y clonado correctamente.

Tabla 8: Caracterización de las estructuras artificiales basándose en un cartografiado de restricción y secuenciación de ADN

Plásmido	Enzima de restricción o cebador de secuenciación	Longitud de la secuencia (pb)
pUCPbasic	HindIII/XbaI	369+5348*
pUCP2(4x)	HindIII/XhoI	363+5354*
pDE7	HindIII/XhoI	354+5354*
pUCPbasic	Cebador de BGH	Secuencia HindIII/XhoI confirmada (911-1294 pb)
pUCP2(4x)	Cebador de BGH	Secuencia HindIII/XhoI confirmada (911-1320 pb)
pDE7	Cebadores de T7 y BGH	Secuencia HindIII/XhoI confirmada (911-1364 pb)

* Tamaños del producto de la digestión (pb) y fragmentos generados

Expresión transgénica *in vitro*

La expresión de los polipéptidos pUCPbasic y pUCP2(4x), así como la proteína pDE7 se evaluó mediante un ensayo de transferencia Western. Las estructuras artificiales se transfectaron transitoriamente en la línea celular HEK293T, que se cultivó a continuación durante 48 horas. Los polipéptidos pUCPbasic y pUCP2(4x) se identificaron con un peso molecular de aproximadamente 12,6 y 12,8 kDa, respectivamente. Se observaron dos bandas adicionales para UCP2(4x) (aproximadamente 11 y 9 kDa) que se pueden explicar por la degradación de proteínas (Figura 5a). Por razones desconocidas, era difícil detectar la proteína DE7 directamente por transferencia Western (Figura 5a). Fue necesaria una etapa de inmunoprecipitación usando perlas de agarosa conjugadas con anti-V5 para lograr este objetivo (Figura 5b). La proteína pDE7 se detectó con el peso molecular esperado de aproximadamente 14,5 kDa. Las células transfectadas con pcDNA3.1 se usaron como control negativo. Estos resultados validan *in vitro* el patrón de expresión y la identidad de las estructuras artificiales de ADN de pUCPbasic, pUCP2(4x) y pDE7.

Los epítomos de hTERT cooperadores aumentan las respuestas inmunes específicas de E7 en ratones transgénicos para el HLA

Para determinar la frecuencia de los linfocitos T específicos de hTERT CD4+ y E7 CD8+/CD4+ en ratones transgénicos HLA-A2/DR1 inmunizados con pUCPbasic, pUCP2(4x) y pDE7, se realizaron análisis ELISpot con IFN- γ .

Como se muestra en la Figura 6a, la inmunización con pUCPbasic o pUCP2(4x) inducía una fuerte respuesta inmune celular específica de hTERT CD4+. Como se esperaba, no se detectó ninguna respuesta inmune específica de E7 CD4+ (Figura 6b) ya que la proteína E7 no presenta epítomos de clase II de alta afinidad. Una coinmunización de pUCPbasic o pUCP2(4x) con pDE7 mostraba una respuesta inmune específica de E7 CD8+ significativa (Figura 6c). En comparación con la vacuna de ADN pDE7+pcDNA3.1, pDE7 coinmunizado con pUCPbasic o pUCP2(4x), era potente para dirigir una respuesta inmune específica de E7, lo que sugiere que las estructuras artificiales pUCPbasic y pUCP2(4x) eran capaces de aumentar significativamente la magnitud de las respuestas inmunes celulares CD8+ contra el antígeno E7.

Se observó una correlación positiva entre la intensidad de las respuestas inmunes específicas de hTERT CD4+ de clase II y E7 CD8+ de clase I, tanto individualmente (Figura 6a, c, véanse los puntos numerados correspondientes al número de identificación del animal) como cuando se sumaban (Figura 6d).

Por lo tanto, el mayor nivel de respuesta de los linfocitos T CD4 era directamente proporcional a la magnitud de la expansión de los linfocitos T CD8 para cada animal. Un análisis de los datos utilizando la prueba del coeficiente de correlación de Pearson indicaba que la intensidad de la correlación entre las respuestas CD4+ y CD8+ era muy alta ($R^2 = 0,95$) y estadísticamente significativa ($p = 0,005$) al menos para pUCP2(4x) (Figura 6e). Ese análisis era menos fiable para pUCPbasic ($R^2 = 0,42$, $p = 0,35$) probablemente debido al bajo número de animales incluidos en este

estudio (Figura 6f).

Finalmente, con el fin de evaluar el papel de la respuesta inmune Th1/Th2, se examinaron las diferentes citocinas secretadas por linfocitos T CD4 específicos de hTERT. Con este objetivo, se estimularon esplenocitos de ratones transgénicos vacunados procedentes de un segundo experimento independiente *in vitro* durante 24 horas, con un grupo de péptidos de hTERT o se dejaron sin estimular. El material sobrenadante se recuperó y se analizó en un ensayo de unión a citocinas (CBA). Se detectaron concentraciones elevadas de citocinas de Th1 IFN- γ , TNF- α , IL-2 y de Th2 IL-6, pero no IL-4, IL-10 e IL-17 en el material sobrenadante del cultivo de esplenocitos recuperados a partir de ratones vacunados con pUCPbasic y pUCP2(4x), en comparación con las de los ratones de control (pDE7 + pcDNA3.1 y pcDNA3.1) (Figura 7). Ese resultado indica que la inmunización con UCP inducía preferentemente una respuesta inmune polarizada a Th1 *in vivo*.

Por lo tanto, la vacunación con pUCPbasic o pUCP2(4x) induce una respuesta específica de linfocitos T CD4 polarizadas a Th1 y puede promover la expansión de linfocitos T CD8 específicos de E7 *in vivo*.

Conclusión

Los resultados mostraban que las estructuras artificiales de ADN de poliepítopos CD4 de hTERT se procesaban correctamente y se presentaban a linfocitos T CD4 en ratones transgénicos HLA-A2/DR1 en el contexto de una restricción del HLA de clase II y podían generar linfocitos Th1 CD4 eficientes que producen principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-2. Además, la respuesta de los linfocitos Th1 CD4 de hTERT está altamente correlacionada con la respuesta de los linfocitos T CD8 contra el antígeno E7 y mejora fuertemente la respuesta inmune de los linfocitos T CD8 contra los epítopos restringidos a la clase I de E7 y, por lo tanto, la eficacia de una vacunación con el antígeno E7.

Estos resultados confirman que es posible aumentar la intensidad y la calidad de la respuesta inmune contra antígenos poco inmunogénicos, complementando la formulación de una vacuna con epítopos de Th1 CD4 a través de un enfoque de entrega de ADN.

Referencias

- Adolph, K. 1996 ed. "Viral Genome Methods" CRC Press, Florida
- Bernhardt SL, Gjertsen MK, Trachsel S, Moller M, Eriksen JA, et al. (2006) Telomerase peptide vaccination of patients with non-resectable pancreatic cancer: A dose escalating phase I/II study. Br J Cancer 95: 1474-1482.
- Bolonaki I, Kotsakis A, Papadimitraki E, Aggouraki D, Konsolakis G, et al. (2007) Vaccination of patients with advanced non-small-cell lung cancer with an optimized cryptic human telomerase reverse transcriptase peptide. J Clin Oncol 25: 2727-2734.
- Brehm A, Nielsen SJ, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, et al. (1999) The E7 oncoprotein associates with Mi2 and histone deacetylase activity to promote cell growth. EMBO J 18: 2449-2458.
- Chen CH, Wang TL, Hung CF, Yang Y, Young RA, et al. (2000) Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an HSP70 gene. Cancer Res 60: 1035-1042.
- Cheever MA, Allison JP, Ferris AS, Finn OJ, Hastings BM, et al. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. Clin Cancer Res 15: 5323-5337.
- Godet Y, Fabre E, Dosset M, Lamuraglia M, Levionnois E, et al. (2012) Analysis of spontaneous tumor-specific CD4 T-cell immunity in lung cancer using promiscuous HLA-DR telomerase-derived epitopes: potential synergistic effect with chemotherapy response. Clin Cancer Res 18: 2943-2953.
- Mir LM. 2008. Application of electroporation gene therapy: past, current, and future. Methods Mol Biol 423: 3-17.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, et al. (2004) Mechanisms of human papilloma-virus-induced oncogenesis. J Virol 78: 11451-11460.
- Murray, 1991, ed. "Gene Transfer and Expression Protocols" Humana Pres, Clifton, N.J.
- Nielsen M, Lund O (2009) NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. BMC Bioinformatics 10: 296.
- Pajot A, Michel ML, Fazilleau N, Pancre V, Auriault C, et al. (2004) A mouse model of human adaptive immune functions: HLA-A2.1-/HLA-DR1-transgenic H-2 class I-/class II-knockout mice. Eur J Immunol 34: 3060-3069.

- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bacher OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
- Sardesai NY, Weiner DB. 2011. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success. *Curr Opin Immunol* 23: 421-429.
- 5 - Shay JW, Bacchetti S (1997) A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33: 787-791.
- Shedlock DJ, Shen H (2003) Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300: 337-339.
- Suso EM, Dueland S, Rasmussen AM, Vetrhus T, Aamdal S, et al. (2011) hTERT mRNA dendritic cell vaccination: complete response in a pancreatic cancer patient associated with response against several hTERT epitopes. *Cancer Immunol Immunother* 60: 809-818.
- 10 - Wieking BG, Vermeer DW, Spanos WC, Lee KM, Vermeer P, et al. (2012) A non-oncogenic HPV 16 E6/E7 vaccine enhances treatment of HPV expressing tumors. *Cancer Gene Ther* 19: 667-674.
- Yang, 1992, "Gene transfer into mammalian somatic cells in vivo", *Crit. Rev. Biotech.* 12: 335-356.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Invectys

<120> Estructuras artificiales de poliepítopos para uso en inmunoterapia

5 <130> B2109

<160> 37

<170> PatentIn versión 3.5

10

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Ala	Leu	Val	Ala	Gln	Cys	Leu	Val	Cys	Val
1				5					10				15	

<210> 2

20

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Lys	Ser	Val	Trp	Ser	Lys	Leu	Gln	Ser	Ile	Gly	Ile	Arg	Gln	His
1				5					10				15	

25

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

30

<213> Homo sapiens

<400> 3

Gly	Thr	Ala	Phe	Val	Gln	Met	Pro	Ala	His	Gly	Leu	Phe	Pro	Trp
1				5					10				15	

35

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 4

Ser	Leu	Cys	Tyr	Ser	Ile	Leu	Lys	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Met	Ser
1				5					10				15	

<210> 5

45

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser	Phe	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Pro	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Arg
1				5					10				15	

50

<210> 6

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<400> 6

Ser	Arg	Pro	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Pro	Arg	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu
1				5					10				15	

ES 2 809 508 T3

<210> 7
 <211> 15
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

 <400> 7
 Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His Ala Gln Cys Pro
 1 5 10 15

 10 <210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 15 <400> 8
 Ala Lys Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu
 1 5 10 15

 <210> 9
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 9
 Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 1 5 10 15

 25 <210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 10
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr
 1 5 10 15

 <210> 11
 35 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 11
 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr
 40 1 5 10 15

 <210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

 <400> 12
 Phe Leu Arg Phe Met Cys His His Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys
 1 5 10 15

 50 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 55 <400> 13
 Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys Gly
 1 5 10 15

 <210> 14
 <211> 15

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
 5 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe
 1 5 10 15

15 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 16
 Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys
 1 5 10 15

30 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 18
 Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 19
 40 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu
 45 1 5 10 15

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu
 1 5 10 15

55 <210> 21
 <211> 369
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de inserción de pUCPbasic

<220>

5 <221> CDS

<222> (13)..(357)

<400> 21

aagcttgccg cc atg gtg cag aga ggc gat ccc gcc gct ttc cgc gca ctg 51
Met Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg Ala Leu
1 5 10

gtc gct cag tgc ctg gtg tgc gtg ccc tgg gac gca aga ctc ttc ttc 99
Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Leu Phe Phe

10

15 20 25

tac cgg aag tcc gtg tgg tcc aag ctg cag agt atc gga att agg cag 147
Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln
30 35 40 45

cac ctg aaa agg gtt cag gac gag gcc ctg gga ggt acc gcc ttc gtc 195
His Leu Lys Arg Val Gln Asp Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val
50 55 60

cag atg cct gcc cac ggc ctg ttt cct tgg tgc ggt ctg ctc ctg atc 243
Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Ile
65 70 75

agc gat act gct agc ctg tgt tac tcc atc ctg aaa gct aag aat gcc 291
Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala
80 85 90

gga atg tca ctt ggc gca aag gga ggt aaa cca att cct aac ccc ctc 339
Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu
95 100 105

ttg ggc ttg gac tca aca tgataactcg ag 369
Leu Gly Leu Asp Ser Thr
110 115

<210> 22

<211> 115

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Estructura artificial sintética

20

<400> 22

ES 2 809 508 T3

Met Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg Ala Leu Val Ala Gln
1 5 10 15

Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys
20 25 30

Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys
35 40 45

Arg Val Gln Asp Glu Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro
50 55 60

Ala His Gly Leu Phe Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Ile Ser Asp Thr
65 70 75 80

Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser
85 90 95

Leu Gly Ala Lys Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu
100 105 110

Asp Ser Thr
115

5 <210> 23
<211> 369
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Secuencia de inserción de pUCP2(4x)

<220>
<221> CDS

15 <222> (13)..(369)

<400> 23

ES 2 809 508 T3

aagcttgccg cc atg gtg cag agg gga gac aag tct gtg tgg tcc aag ctg 51
Met Val Gln Arg Gly Asp Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu
1 5 10

cag tcc atc gga atc agg cag cat ccc tgg gac gca cgg ttg ttc ttt 99
Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Pro Trp Asp Ala Arg Leu Phe Phe
15 20 25

tac cgg aag tcc gtc tgg agc aag ctc cag tcc att ggg atc cgc cag 147
Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln
30 35 40 45

cac ctg aag cgg gtg cag gat gag gct ctc ggc aag agt gtc tgg tca 195
His Leu Lys Arg Val Gln Asp Glu Ala Leu Gly Lys Ser Val Trp Ser
50 55 60

aag ctg caa agc atc ggc att agg cag cac tgc ggg ctc ctt ttg atc 243
Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Cys Gly Leu Leu Leu Ile
65 70 75

agc gac acc gcc aag tcc gtg tgg agc aaa ctg cag agc atc ggg att 291
Ser Asp Thr Ala Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile
80 85 90

aga cag cac ctc ggc gcc aag ggg ggg aaa cct att cca aac ccc ctg 339
Arg Gln His Leu Gly Ala Lys Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu
95 100 105

ctg ggc ctg gat tct aca tga taa ctc gag 369
Leu Gly Leu Asp Ser Thr Leu Glu
110 115

<210> 24
<211> 115
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
10 <223> Estructura artificial sintética

<400> 24
Met Val Gln Arg Gly Asp Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile
1 5 10 15

Gly Ile Arg Gln His Pro Trp Asp Ala Arg Leu Phe Phe Tyr Arg Lys
20 25 30

Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Leu Lys
35 40 45

Arg Val Gln Asp Glu Ala Leu Gly Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln
50 55 60

Ser Ile Gly Ile Arg Gln His Cys Gly Leu Leu Leu Ile Ser Asp Thr
65 70 75 80

Ala Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln His
85 90 95

Leu Gly Ala Lys Gly Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu
100 105 110

Asp Ser Thr
115

ES 2 809 508 T3

	<210> 25	
	<211> 360	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de inserción de pDE7	
10	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (13)..(348)	
	<400> 25	
	aagcttgccg cc atg cca gga gat aca cct aca ttg cat gaa tat atg tta	51
	Met Pro Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu	
	1 5 10	
	gat ttg caa cca gag aca act gat ctc tac ggt tat gag caa tta aat	99
	Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Glu Gln Leu Asn	
	15 20 25	
	gac agc tca gag gag gag gat gaa ata gat ggt cca gct gga caa gca	147
	Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala	
	30 35 40 45	
	gca ccg gac aga gcc cat tac aat att gta acc ttt tgt tgc aag tgt	195
	Ala Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys	
	50 55 60	
15	gac tct acg ctt cgg aga tgc gta caa agc aca cac gta gac att cgt	243
	Asp Ser Thr Leu Arg Arg Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg	
	65 70 75	
	act ttg gaa gac ctg tta atg ggc aca cta gga att gtg tgc ccc atc	291
	Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile	
	80 85 90	
	tgt tct cag aaa cca ggt aaa cca att cct aac ccc ctc ttg ggc ttg	339
	Cys Ser Gln Lys Pro Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu	
	95 100 105	
	gac tca aca tgataactcg ag	360
	Asp Ser Thr	
	110	
20	<210> 26	
	<211> 112	
	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
25	<223> Estructura artificial sintética	
	<400> 26	

ES 2 809 508 T3

Met Pro Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
1 5 10 15

Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
20 25 30

Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Ala Pro Asp
35 40 45

Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr
50 55 60

Leu Arg Arg Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln
85 90 95

Lys Pro Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
100 105 110

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Papillomavirus sp

<400> 27

His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Papillomavirus sylvilagi

<400> 28

His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu
1 5 10 15

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Papillomavirus sylvilagi

<400> 29

Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu
1 5

<210> 30

<211> 10

<212> PRT

<213> Papillomavirus sylvilagi

<400> 30

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
1 5 10

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Papillomavirus sylvilagi

<400> 31
 Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu
 1 5

5 <210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papillomavirus sylvilagi

10 <400> 32
 Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu
 1 5 10

15 <210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Papillomavirus sylvilagi

20 <400> 33
 Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
 1 5 10

25 <210> 34
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Papillomavirus sylvilagi

30 <400> 34
 Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
 1 5

35 <210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Papillomavirus sylvilagi

40 <400> 35
 Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
 1 5

45 <210> 36
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

50 <220>
 <223> cebador

55 <400> 36
 taatacgact cactataggg 20

60 <210> 37
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

65 <220>
 <223> cebador

70 <400> 37
 tagaaggcac agtcgagg 18

REIVINDICACIONES

1. Un vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN que codifica al menos dos epítopos de CD4 de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) y al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario; en donde dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT son idénticos y están repetidos.
- 5 2. La mezcla de vectores de expresión de ADN según la reivindicación 1, que comprende i) al menos un vector de expresión de ADN que codifica dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT y ii) al menos un vector de expresión de ADN que codifica dicho al menos un epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.
3. El vector de expresión de ADN según la reivindicación 1, que codifica dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT y dicho epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.
- 10 4. El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicha TERT es TERT humana.
5. El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que codifica entre 4 y 10, preferiblemente entre 4 y 8, de dichos epítopos de CD4 idénticos de TERT.
- 15 6. El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde al menos uno de dichos epítopos de CD4 de TERT se selecciona a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4, preferiblemente en donde el vector o una mezcla de vectores codifica una secuencia poliepitópica que comprende todas las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4.
- 20 7. El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN según la reivindicación 6, que codifica una repetición de al menos dos, preferiblemente al menos cuatro, epítopos de SEQ ID NO: 2.
8. El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que codifican, como dicho epítipo de CD8, todo o parte de un antígeno vírico, bacteriano o parasitario que comprende epítopos del MHC de clase I, preferiblemente un mutante no oncogénico del antígeno E7 del HPV.
- 25 9. Un kit que comprende
 - a. un primer recipiente que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT; en donde dichos al menos dos epítopos de CD4 de TERT son idénticos y están repetidos, y
 - b. un segundo recipiente que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica un epítipo de
- 30 CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario.
10. El kit según la reivindicación 9, que comprende además al menos un recipiente adicional que contiene al menos un vector de expresión de ADN que codifica otro epítipo de CD8 tumoral, vírico, bacteriano o parasitario distinto.
11. El vector de expresión de ADN o una mezcla de vectores de expresión de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el kit según la reivindicación 9 o 10, para uso en el tratamiento de un tumor o una infección en un
- 35 paciente.
12. El vector de expresión de ADN, una mezcla de vectores de expresión de ADN o el kit para uso según la reivindicación 11, en donde el tumor es un cáncer, tal como un cáncer seleccionado a partir del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, mieloma maligno, enfermedad de Hodgkin, melanoma, tumor cerebral tal como glioblastoma, neuroblastoma y astrocitoma y carcinomas de vejiga, mama, cuello uterino, colon, pulmón, páncreas, próstata, cabeza y cuello o estómago, preferiblemente en donde el tumor es un
- 40 cáncer inducido por un virus.
13. El vector de expresión de ADN, una mezcla de vectores de expresión de ADN o el kit, para uso según la reivindicación 11 o 12, administrado mediante inyección intradérmica, preferiblemente combinada con electroporación.

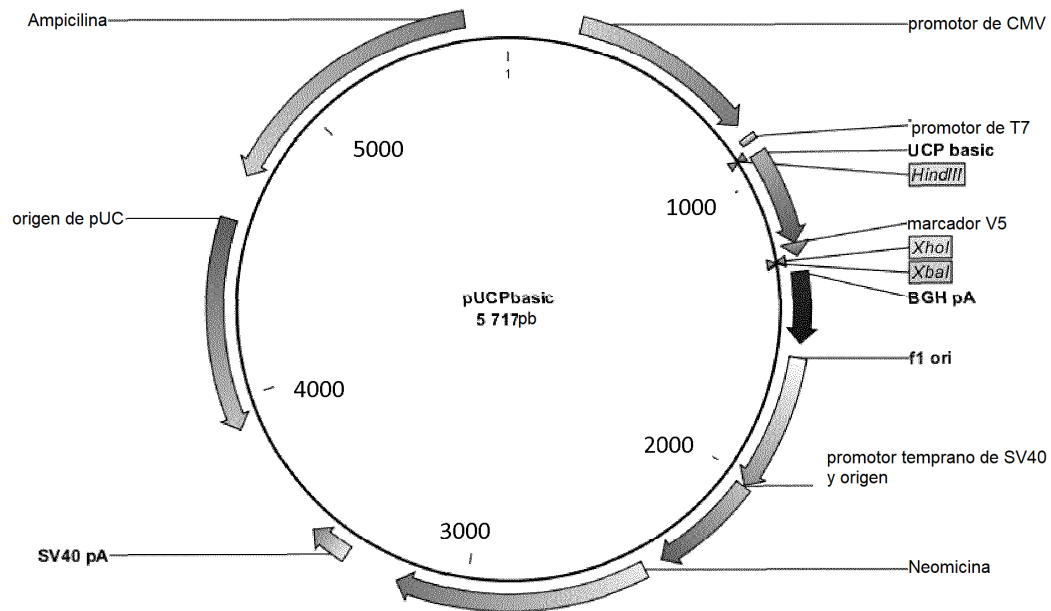


FIGURA 1

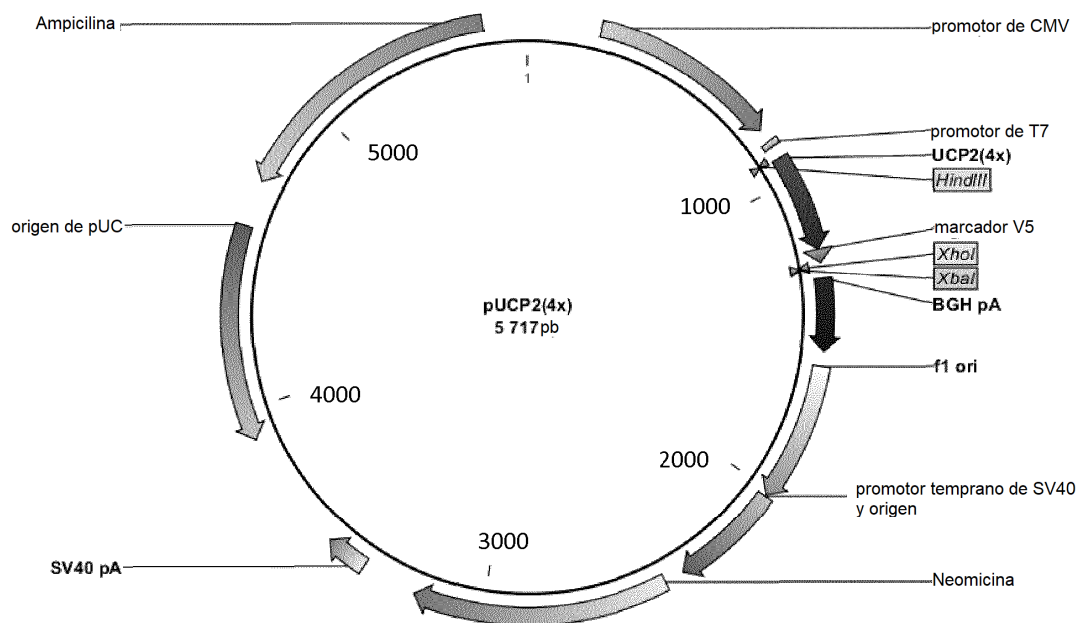


FIGURA 2

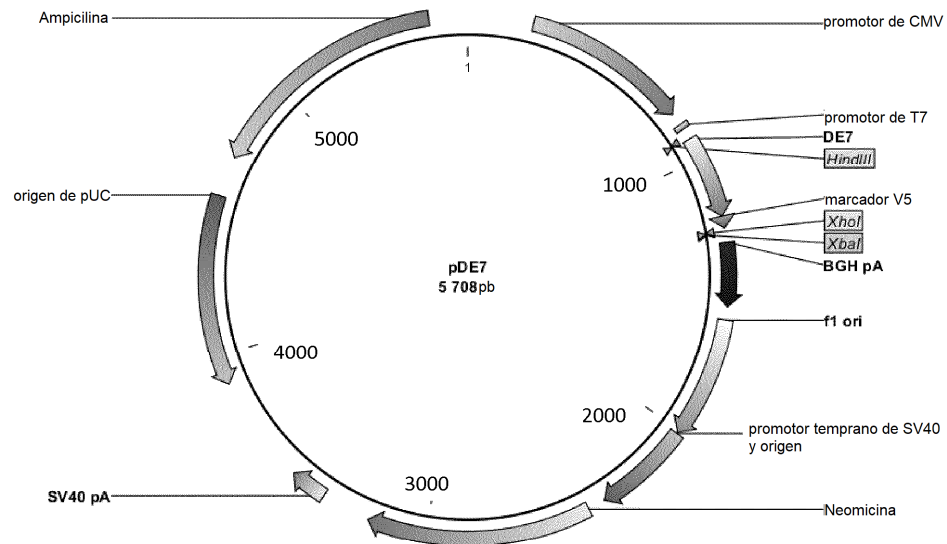


FIGURA 3

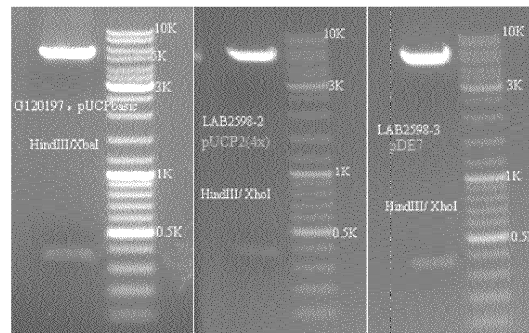


FIGURA 4

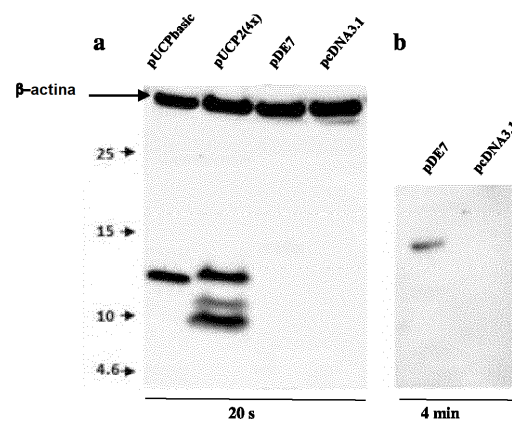
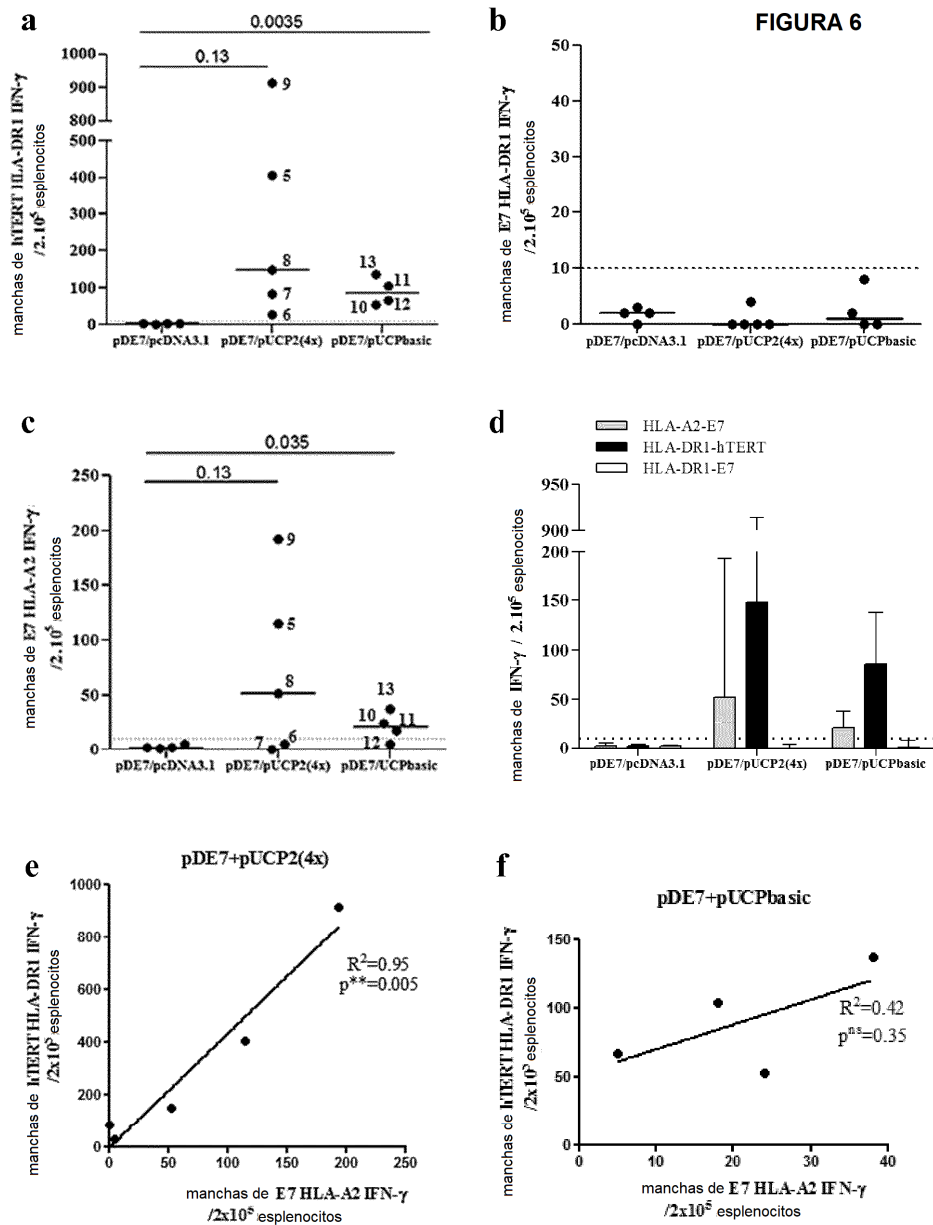


FIGURA 5



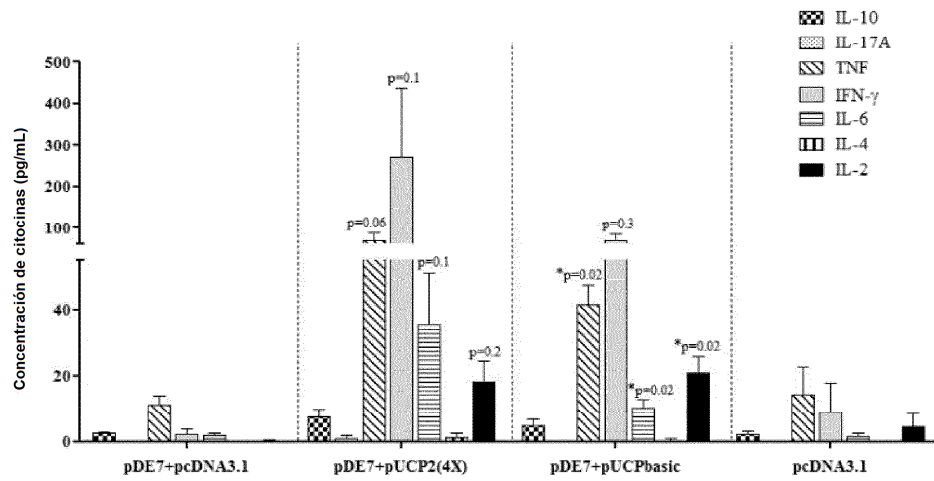


FIGURA 7

```

< UCPbasic
-----|-----|-----|-----|
1 AAGCTTGCCGCCatggtgcagagagcgatcccgcgcgtttccgcgcact 50
1      M V Q R G D P A A F R A L 13
      UCP1
-----|-----|-----|-----|
51 ggtcgctcagtgccctggtgtgctgcccctgggacgcaagactcttcttct 100
14 V A Q C L V C V P W D A R L F F Y 30
      UCP1
-----|-----|-----|-----|
101 accggaagtcctggtgtccaagctgcagagtatcggaattaggcagcac 150
31 R K S V W S K L Q S I G I R Q H 46
      UCP2
-----|-----|-----|-----|
151 ctgaaaagggttCAGgacgagggcctgggaggtaccgccttcgtccagat 200
47 L K R V Q D E A L G G T A F V Q M 63
      UCP3
-----|-----|-----|-----|
201 gcctgcccacggcctgtttccttgggtgcgggtctgctcctgatcagcgata 250
64 P A H G L F P W C G L L L I S D T 80
      UCP3
-----|-----|-----|-----|
251 ctgctagcctgtgttactccatcctgaaagctaagaatgccggaatgtca 300
81 A S L C Y S I L K A K N A G M S 96
      UCP4
UCPbasic >< marcador V5
-----|-----|-----|-----|
301 cttggcgcaaaggagggtaaaccaattcctaaccctccttgggcttggga 350
97 L G A K G G K P I P N P L L G L D 113

-----|-----
351 ctcaacaTGATAACTCGAG 369
114 S T □ □ 115

```

FIGURA 8

ES 2 809 508 T3

```

-----|-----|-----|-----|
< UCP2 (4x)
1 AAGCTTGCCGCCatggtgcagaggggagacaagtctgtgtggtccaagct 50
1      M V Q R G D K S V W S K L 13
UCP2
-----|-----|-----|-----|
51 gcagtccatcgggaatcaggcagcatccctgggacgcacggtgttctttt 100
14 Q S I G I R Q H P W D A R L F F Y 30
UCP2
-----|-----|-----|-----|
101 accggaagtcctgtggagcaagctccagtccattgggatccgccagcac 150
31 R K S V W S K L Q S I G I R Q H 46
UCP2
-----|-----|-----|-----|
151 ctgaagcgggtgcaggatgaggtctctcggaagagtgtctggtcaaagct 200
47 L K R V Q D E A L G K S V W S K L 63
UCP2
-----|-----|-----|-----|
201 gcaaagcatcggcattagcgagcactgcgggctccttttgatcagcgaca 250
64 Q S I G I R Q H C G L L L I S D T 80
UCP2
-----|-----|-----|-----|
251 ccgccaagtcctgtgtggagcaaaactgcagagcatcgggattagacagcac 300
81 A K S V W S K L Q S I G I R Q H 96
UCP2
UCP2 (4x) >< marcador V5
-----|-----|-----|-----|
301 ctcggcgccaaggggggaaacctattccaacccccctgctgggcctgga 350
97 L G A K G G K P I P N P L L G L D 113
-----|-----|
351 ttctacatgataactcgag 369
114 S T □ □ 115

```

FIGURA 9

ES 2 809 508 T3

```

      <                                     DE7
-----|-----|-----|-----|-----|
1 AAGCTTGCCGCCatgCCAggagatacacctacattgcatgaatatatgtt 50
1          M P G D T P T L H E Y M L 13
      sustitución de bases cat(H) a CCA(P)
-----|-----|-----|-----|-----|
51 agatttgcaaccagagacaactgatctctacGGTtatgagcaattaaatg 100
14 D L Q P E T T D L Y G Y E Q L N D 30
      sustitución de bases tgt(C) a GGT(G)
-----|-----|-----|-----|-----|
101 acagctcagaggaggaggatgaaatagatggtccagctggacaagcaGCA 150
31 S S E E E D E I D G P A G Q A A 46
      sustitución de bases gaa (E) a GCA (A)
-----|-----|-----|-----|-----|
151 ccggacagagcccattacaatattgtaaccttttggtgcaagtgtgactc 200
47 P D R A H Y N I V T F C C K C D S 63
      -----|-----|-----|-----|-----|
201 tacgcttcggAGAtgcgtacaaagcacacacgtagacattcgtactttgg 250
64 T L R R C V Q S T H V D I R T L E 80
      sustitución de bases ttg (L) a AGA (R)
      -----|-----|-----|-----|-----|
251 aagacctgttaatgggcacactaggaattgtgtgccccatctgttctcag 300
81 D L L M G T L G I V C P I C S Q 96
      < marcador V5                                     >
-----|-----|-----|-----|-----|
301 aaaccaggtaaaccaattcctaacccccctcttgggcttggactcaacaTG 350
97 K P G K P I P N P L L G L D S T □ 112
      -----|
351 ATAAC TCGAG 360
      □ 112

```

FIGURA 10