



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 466**

51 Int. Cl.:
C12N 15/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02798748 .6**

96 Fecha de presentación : **18.09.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1427826**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2004**

54 Título: **Vacunas de ADN optimizadas por codón *rt-nef-gaf* para VIH.**

30 Prioridad: **20.09.2001 PCT/GB01/04207**
11.12.2001 GB 0129604
19.03.2002 GB 0206462

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.09.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.09.2011

73 Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

72 Inventor/es: **Beaton, Andrew;**
Ertl, Peter, Franz;
Gough, Gerald, Wayne;
Lear, Andrew;
Tite, John, Philip y
Van Wely, Catherine, Ann

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 364 466 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

Vacunas.

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a construcciones de ácido nucleico, a células huésped que comprenden dichas construcciones y a su uso en vacunas de ácido nucleico. La invención también se refiere a formulaciones de vacuna que comprenden dichas construcciones y al uso de dichas formulaciones en medicina. En particular, la invención se refiere a vacunas de ADN que son útiles en la profilaxis y tratamiento de infecciones por VIH, más particularmente cuando se administran mediante liberación mediada por partícula.

Antecedentes de la invención

- 10 El VIH-1 es la causa principal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), que se considera uno de los mayores problemas de salud en todo el mundo. Aunque se han realizado exhaustivas y extensas investigaciones en todo el mundo para producir una vacuna, hasta ahora dichos esfuerzos no han tenido éxito.

- 15 Se han descrito proteínas que no pertenecen a la cubierta del VIH-1 e incluyen, por ejemplo, proteínas de la estructura interna, tales como los productos de los genes *gag* y *pol* y otras proteínas estructurales tales como Rev, Nef, Vif y Tat (Green y col., New England J. Med, 324, 5, 308 y sig. (1991) y Bryant y col. (Ed. Pizzo), *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 11, 5, 390 y sig. (1992)).

- 20 El gen *gag* se traduce a partir del ARN de longitud completa para dar una poliproteína precursora que después se fragmenta en 3-5 proteínas de la cápside; la proteína de la matriz, la proteína de la cápside y la proteína de unión a ácido nucleico y proteasa. (1. Fundamental Virology, Fields BN, Knipe DM and Howley M 1996 2. Fields Virology vol 2 1996).

- 25 El gen *gag* da lugar a la proteína precursora Gag de 55 kilodalton (kDa), también denominada p55, que se expresa a partir del ARNm viral sin ajustar. Durante la traducción, el extremo N-terminal de p55 se miristoíla, desencadenando su asociación con el lado citoplásmico de las membranas celulares. La poliproteína Gag asociada con la membrana recluta dos copias del ARN genómico viral junto con otras proteínas virales y celulares que desencadenan la gemación de la partícula viral a partir de la superficie de una célula infectada. Tras la gemación, la p55 es fragmentada por la proteasa codificada por el virus (un producto del gen *pol*) durante el proceso de la maduración viral en cuatro proteínas más pequeñas denominadas MA (matriz [p17]), CA (cápside [p24]), NC (nucleocápside [p9]) y p6. (4)

- 30 Además de las 3 proteínas Gag principales, todos los precursores de Gag contienen otras varias regiones que se fragmentan y permanecen en el virión como péptidos de varios tamaños. Estas proteínas tienen diferentes funciones, por ejemplo la proteína p2 tiene un papel propuesto en la regulación de la actividad de la proteasa y contribuye a la correcta cronología del procesamiento proteolítico.

- 35 El polipéptido MA deriva del extremo miristolado en N terminal de p55. La mayoría de las moléculas de MA permanecen unidas a la superficie interna de la bicapa lipídica del virión, estabilizando la partícula. Una subpoblación de MA es reclutada en el interior de las capas más profundas del virión, donde pasa a formar parte del complejo que escolta al ADN viral al núcleo. (5) Estas moléculas de MA facilitan el transporte nuclear del genoma viral porque la maquinaria de importación nuclear de la célula reconoce una señal cariofíllica en MA. Este fenómeno permite que el VIH infecte las células que no están en división, una propiedad inusual para un retrovirus.

- 40 La proteína p24 (CA) forma el núcleo cónico de las partículas víricas. Se ha demostrado con la ciclofilina A interacción con la región p24 de p55, lo que conduce a su incorporación en las partículas de VIH. La interacción entre Gag y ciclofilina A es esencial porque la rotura de esta interacción por la ciclosporina A inhibe la replicación viral.

- 45 La región NC de Gag es responsable de reconocer específicamente la así llamada señal de empaquetamiento del VIH. La señal de empaquetamiento consiste en cuatro estructuras en bucle troncales localizadas cerca del extremo 5' del ARN viral y es suficiente para mediar en la incorporación de un ARN heterólogo en viriones del VIH-1. NC se une a la señal de empaquetamiento a través de interacciones mediadas por dos motivos en dedo de cinc. NC también facilita la transcripción reversa.

- 50 La región del polipéptido p6 media las interacciones entre Gag p55 y la proteína accesoria Vpr, lo que conduce a la incorporación de Vpr en los viriones en ensamblaje. La región p6 también contiene un así llamado dominio tardío que es necesario para la liberación eficiente de los viriones en gemación de una célula infectada.

El gen *pol* codifica dos proteínas que contienen las dos actividades necesarias por el virus en la infección temprana, la RT y la proteína integrasa necesaria para la integración del ADN del virus en el ADN de la célula. El producto principal de Pol es escindido por la proteasa del virión para dar el péptido RT amino terminal que contiene

actividades necesarias para la síntesis de ADN (ADN polimerasa dirigida por ARN y por ADN, ribonucleasa H) y la proteína integrasa en carboxi terminal.

La RT del VIH es un heterodímero de RT de longitud completa (p66) y un producto de escisión (p51) que carece del dominio integrasa de ARNasa carboxi-terminal.

- 5 La RT es una de las proteínas más altamente conservadas codificadas por el genoma del retrovirus. Dos actividades principales de la RT son la ADN Pol y la ribonucleasa H. La actividad ADN Pol de la RT usa ARN y ADN como moldes de forma intercambiable y, como todas las ADN polimerasas conocidas no puede iniciar la síntesis de ADN de novo, requiere una molécula preexistente que sirva como cebador (ARN).

- 10 La actividad ARNasa H inherente a todas las proteínas RT desempeña el papel esencial temprano en la replicación de eliminar el genoma de ARN a medida que progresa la síntesis de ADN. Degrada selectivamente el ARN de todas las moléculas híbridas de ARN-ADN. Estructuralmente, la polimerasa y la ribo H ocupan dominios separados no solapantes, con el Pol abarcando los dos tercios amino de la Pol.

La subunidad catalítica de p66 se pliega en 5 subdominios distintos. Los 23 amino terminales de éstos tienen la parte de la actividad RT. EL extremo carboxi de éstos es el dominio de ARNasa H.

- 15 Tras la infección de la célula huésped, el genoma de ARN retroviral se copia en el ADN ds lineal por la transcriptasa inversa que está presente en la partícula infectante. La integrasa (revisada en Skalka AM '99 Adv in Virus Res 52 271-273) reconoce los extremos del ADN viral, los recorta y acompaña al ADN viral a un sitio cromosómico del huésped para catalizar la integración. Muchos Sitios en el ADN huésped pueden ser dianas para la integración. Aunque la integrasa es suficiente para catalizar la integración in vitro, no es la única proteína asociada con el ADN viral in vivo, el complejo grande proteína-ADN viral aislado de las células infectadas se ha denotado complejo de preintegración. Esto facilita la adquisición de los genes de la célula huésped por los genomas virales de la progenie.

20 La integrasa está formada por 3 dominios distintos, el dominio N terminal, el núcleo catalítico y el dominio C terminal. El dominio central catalítico contiene todos los requisitos para la química de la transferencia de polinucleotidilos.

- 25 Se sabe que la proteína Nef produce la eliminación de CD4, el receptor del VIH, de la superficie celular, pero la importancia biológica de esta función es objeto de debate. Adicionalmente, la Nef interacciona con la vía de señalización de las células T e induce un estado activo, que, a su vez, puede estimular una expresión génica más eficiente. Algunos aislados de VIH presentan mutaciones en esta región, que hacen que no codifiquen proteína funcional y que estén gravemente comprometidos en su replicación y patogénesis in vivo.

- 30 Las vacunas de ADN usualmente consisten en un vector plasmídico bacteriano en el que se inserta un promotor fuerte, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y secuencias de poliadenilación/terminación de la transcripción. El gen de interés puede codificar una proteína completa o, simplemente, una secuencia peptídica antigénica relacionada con el patógeno, tumor u otro agente contra el que se quiera proteger. El plásmido se puede cultivar en bacterias, tales como, por ejemplo, E. coli y después puede aislarse y prepararse en un medio adecuado, dependiendo de la vía de administración prevista, antes de su administración al huésped. Tras la administración, el plásmido es captado por las células del huésped, donde el péptido codificado se produce. Preferentemente, el vector plasmídico se elaborará sin un origen de replicación que sea funcional en células eucariotas para evitar la replicación del plásmido en el mamífero huésped y la integración dentro del ADN cromosómico del animal afectado.

- 35 Hay un número de ventajas de la vacunación con ADN con respecto a las técnicas de vacunación tradicionales. En primer lugar, se predice que dado 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 de la proteína nativa asociada con el estado de enfermedad. También es probable que la vacunación con ADN ofrezca protección contra diferentes cepas de un virus, generando una respuesta de linfocitos T citotóxicos que reconozcan epitopos de proteínas conservadas. Además, dado que los plásmidos son captados por las células huésped donde se puede producir la proteína antigénica, se producirá una respuesta inmunitaria duradera. La tecnología también ofrece la posibilidad de combinar diversos inmunogenes en una única preparación para facilitar la inmunización simultánea en relación con una serie de estados morbosos.

En Donnelly y col. "DNA vaccines" Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617-648, cuya divulgación se incluye en el presente documento en su totalidad por medio de referencia, se proporciona información de antecedentes útil en relación con la vacunación con ADN.

- 50 Se describen vacunas de politopos de ADN politopos contra VIH en Woodberry y col., Journal of virology, 1999, vol. 73, No. 7, p. 5320-5325.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona construcciones novedosas para usar en vacunas de ácidos nucleicos para la profilaxis y tratamiento de infecciones por VIH y SIDA, según se define en las reivindicaciones.

- Se divulga una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína gag del VIH o un fragmento de la misma unida a una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno adicional del VIH, o un fragmento del mismo y se une de forma operable a un promotor heterólogo. El fragmento de dicha secuencia de nucleótidos codificará un epitopo de VIH y típicamente codificará un péptido de al menos 8 aminoácidos. La secuencia de nucleótidos es, preferentemente, una secuencia de ADN y preferentemente está contenida dentro de un plásmido sin un origen de replicación. Dichas moléculas de ácido nucleico se formulan con excipientes, vehículos, diluyentes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables para producir una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento y/o profilaxis de la infección por VIH y SIDA.
- En una realización preferida la secuencia de ADN se formula sobre la superficie de partículas o perlas inertes adecuadas para la liberación de fármaco mediada por partículas. Preferentemente las perlas son oro.
- La invención proporciona una secuencia de ADN que altamente expresada codifica una proteína gag cuya secuencia está optimizada para imitar el uso de codones de los genes en células de mamífero. En particular, la proteína gag está optimizada para imitar la de los genes humanos de expresión alta.
- El código de ADN tiene 4 letras (A, T, C y G) y usa éstas para deletrear "codones" de tres letras que representan los aminoácidos que codifican las proteínas en los genes de un organismo. La secuencia lineal de los codones a lo largo de la molécula de ADN se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos en la(s) proteína(s) codificada(s) por esos genes. El código es altamente degenerado, con 61 codones que codifican para los 20 aminoácidos naturales y 3 codones que representan señales de "terminación". Por tanto, los aminoácidos están codificados por más de un codón, de hecho varios están codificados por cuatro o más codones diferentes.
- Cuando más de un codón está disponible para codificar un aminoácido dado, se ha observado que los patrones de uso de codones de los organismos son altamente no aleatorios. Especies diferentes muestran un sesgo diferente en su selección de codones y, además, el uso de codones puede ser marcadamente diferente en una única especie entre genes que se expresan a niveles altos y bajos. Este sesgo es diferente en virus, plantas, bacterias y células de mamífero y algunas especies muestran un sesgo más fuerte alejado de una selección aleatoria del codón con respecto a otras. Por ejemplo, los seres humanos y otros mamíferos están menos fuertemente sesgados que ciertas bacterias o virus. Por estas razones, existe una probabilidad significativa de que un gen de mamífero expresado en *E.coli* o un gen extraño o recombinante expresado en células de mamífero tenga una distribución inadecuada de codones para expresión eficiente. Se cree que la presencia en una secuencia de ADN heterólogo de grupos de codones, o una abundancia de codones que rara vez se observan en el huésped en el que va a ocurrir la expresión es predictiva de niveles bajos de expresión heteróloga en dicho huésped.
- Se divulga una secuencia polinucleotídica de gag que codifica una secuencia de aminoácidos, en la que el patrón de uso de codones de la secuencia polinucleotídica imita aquella de los genes de mamíferos altamente expresados. Preferentemente, la secuencia polinucleotídica es una secuencia de ADN. Deseablemente, el patrón de uso de codones de la secuencia polinucleotídica es la habitual de genes humanos altamente expresados.
- En los polinucleótidos de la presente invención, el patrón de uso de codones está alterado con respecto al habitual de los virus de inmunodeficiencia humana para representar más estrechamente el sesgo del codón del organismo diana, por ejemplo un mamífero, especialmente un ser humano. El "coeficiente de uso de codones" es una medida de lo estrechamente que el patrón de un codón de una secuencia polinucleotídica dada imita al de una especie diana. Las frecuencias de los codones pueden obtenerse de fuentes bibliográficas para los genes altamente expresados de muchas especies (véase, p. ej., Nakamura y col. *Nucleic Acids Research* 1996, 24: 214-215). Las frecuencias de los codones para cada uno de los 61 codones (expresadas como el número de apariciones por 1000 codones de la clase seleccionada de genes) están normalizadas para cada uno de los veinte aminoácidos naturales, de modo que el valor para el codón usado con mayor frecuencia para cada aminoácido se establece en 1 y las frecuencias para los codones menos comunes se dan a escala para que queden entre cero y 1. Por tanto, a cada uno de los 61 codones se le asigna un valor de 1 o menor para los genes altamente expresados de la especie diana. Con el fin de calcular un coeficiente de uso de codones para un polinucleótido específico, con respecto a los genes altamente expresados de esa especie, se anota el valor escalado para cada codón del polinucleótido específico y se toma la media geométrica de todos estos valores (dividiendo la suma de los logaritmos naturales de estos valores por el número total de codones y se tomando el antilogaritmo). El coeficiente tendrá un valor entre cero y 1 y cuanto mayor sea el coeficiente más codones en el polinucleótido son codones de uso frecuente. Si una secuencia de polinucleótidos tiene un coeficiente de uso de codones de 1, todos los codones son los codones "más frecuentes" para los genes altamente expresados de la especie diana.
- De acuerdo con la presente invención, el patrón de uso de codones del polinucleótido excluirá preferentemente los codones con un valor de RSCU inferior a 0,2 en genes altamente expresados del organismo diana. Como alternativa, el patrón de uso de codones excluirá los codones que representen <10% de los codones usados para un aminoácido particular. Un valor de uso de codones sinónimo relativo (RSCU) es el número observado de codones dividido por el número previsto si todos los codones para ese aminoácido se usaran con igual frecuencia. Un polinucleótido de la presente invención tendrá generalmente un coeficiente de uso de codones (o RSCU) para genes humanos altamente expresados superior a 0,3, preferentemente superior a 0,4, más preferentemente superior a 0,5. Las tablas del uso de codones para seres humanos también se pueden encontrar en Genbank.

En comparación, un gen de beta actina altamente expresado tiene un RSCU de 0,747. La tabla de uso de codones para un *Homo sapiens* se expone a continuación:

Tabla de uso de codones 1:

***Homo sapiens* [gbpri]: 27143 CDS (12816923 codones)**

5 campos: [tripleto] [frecuencia: **por mil**] ([número])

UUU	17,0 (217684)	UCU	14,8 (189419)	UAU	12,1 (155645)	UGU	10,0 (127719)
UUC	20,5 (262753)	UCC	17,5 (224470)	UAC	15,8 (202481)	UGC	12,3 (157257)
UUA	7,3 (93924)	UCA	11,9 (152074)	UAA	0,7 (9195)	UGA	1,3 (16025)
UUG	12,5 (159611)	UCG	4,5 (57572)	UAG	0,5 (6789)	UGG	12,9 (165930)
CUU	12,8 (163707)	CCU	17,3 (222146)	CAU	10,5 (134186)	CGU	4,6 (59454)
CUC	19,3 (247391)	CCC	20,0 (256235)	CAC	14,9 (190928)	CGC	10,8 (137865)
CUA	7,0 (89078)	CCA	16,7 (214583)	CAA	12,0 (153590)	CGA	6,3 (80709)
CUG	39,7 (509096)	CCG	7,0 (89619)	CAG	34,5 (441727)	CGG	11,6 (148666)

***Homo sapiens* [gbpri]: 27143 CDS (12816923 codones)**

campos: [tripleto] [frecuencia: **por mil**] ([número])

AUU	15,8 (202844)	ACU	12,9 (165392)	AAU	17,0 (218508)	AGU	12,0 (154442)
AUC	21,6 (277066)	ACC	19,3 (247805)	AAC	19,8 (253475)	AGC	19,3 (247583)
AUA	7,2 (92133)	ACA	14,9 (191518)	AAA	24,0 (308123)	AGA	11,5 (147264)
AUG	22,3 (285776)	ACG	6,3 (80369)	AAG	32,6 (418141)	AGG	11,3 (145276)
GUU	10,9 (139611)	GCU	18,5 (236639)	GAU	22,4 (286742)	GGU	10,8 (138606)
GUC	14,6 (187333)	GCC	28,3 (362086)	GAC	26,1 (334158)	GGC	22,7 (290904)
GUA	7,0 (89644)	GCA	15,9 (203310)	GAA	29,1 (373151)	GGA	16,4 (210643)
GUG	28,8 (369006)	GCG	7,5 (96455)	GAG	40,2 (515485)	GGG	16,4 (209907)

10 GC de codificación 52,51% 1ª letra GC 56,04% 2ª letra GC 42,35% 3ª letra GC 59,13%

Tabla de uso de codones 2 (preferida):

Uso de codones para genes humanos (de expresión alta) 24/1/91
(human_high.cod)

Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
Gly	GGG	905,00	18,76	0,24
Gly	GGA	525,00	10,88	0,14
Gly	GGT	441,00	9,14	0,12
Gly	GGC	1.867,00	38,70	0,50

ES 2 364 466 T3

Uso de codones para genes humanos (de expresión alta) 24/1/91
(human_high.cod)

Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
Glu	GAG	2.420,00	50,16	0,75
Glu	GAA	792,00	16,42	0,25
Asp	GAT	592,00	12,27	0,25
Asp	GAC	1.821,00	37,75	0,75
Val	GTG	1.866,00	38,68	0,64
Val	GTA	134,00	2,78	0,05
Val	GTT	198,00	4,10	0,07
Val	GTC	728,00	15,09	0,25
Ala	GCG	652,00	13,51	0,17
Ala	GCA	488,00	10,12	0,13
Ala	GCT	654,00	13,56	0,17
Ala	GCC	2.057,00	42,64	0,53
Arg	AGG	512,00	10,61	0,18
Arg	AGA	298,00	6,18	0,10
Ser	AGT	354,00	7,34	0,10
Ser	AGC	1.171,00	24,27	0,34
Lys	AAG	2.117,00	43,88	0,82
Lys	AAA	471,00	9,76	0,18
Asn	AAT	314,00	6,51	0,22
Asn	AAC	1.120,00	23,22	0,78
Met	ATG	1.077,00	22,32	1,00
Ile	ATA	88,00	1,82	0,05
Ile	ATT	315,00	6,53	0,18
Ile	ATC	1.369,00	28,38	0,77
Thr	ACG	405,00	8,40	0,15
Thr	ACA	373,00	7,73	0,14
Thr	ACT	358,00	7,42	0,14

ES 2 364 466 T3

Uso de codones para genes humanos (de expresión alta) 24/1/91
(human_high.cod)

Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
Thr	ACC	1.502,00	31,13	0,57
Trp	TGG	652,00	13,51	1,00
End	TGA	109,00	2,26	0,55
Cys	TGT	325,00	6,74	0,32
Cys	TGC	706,00	14,63	0,68
End	TAG	42,00	0,87	0,21
End	TAA	46,00	0,95	0,23
Tyr	TAT	360,00	7,46	0,26
Tyr	TAC	1.042,00	21,60	0,74
Leu	TTG	313,00	6,49	0,06
Leu	TTA	76,00	1,58	0,02
Phe	TTT	336,00	6,96	0,20
Phe	TTC	1.377,00	28,54	0,80
Ser	TCG	325,00	6,74	0,09
Ser	TCA	165,00	3,42	0,05
Ser	TCT	450,00	9,33	0,13
Ser	TCC	958,00	19,86	0,28
Arg	CGG	611,00	12,67	0,21
Arg	CGA	183,00	3,79	0,06
Arg	CGT	210,00	4,35	0,07
Arg	CGC	1.086,00	22,51	0,37
Gln	CAG	2.020,00	41,87	0,88
Gln	CAA	283,00	5,87	0,12
His	CAT	234,00	4,85	0,21
His	CAC	870,00	18,03	0,79
Leu	CTG	2.884,00	59,78	0,58
Leu	CTA	166,00	3,44	0,03

Uso de codones para genes humanos (de expresión alta) 24/1/91
(human_high.cod)

Aminoácido	Codón	Número	/1000	Fracción
Leu	CTT	238,00	4,93	0,05
Leu	CTC	1.276,00	26,45	0,26
Pro	CCG	482,00	9,99	0,17
Pro	CCA	456,00	9,45	0,16
Pro	CCT	568,00	11,77	0,19
Pro	CCC	1.410,00	29,23	0,48

5 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención se proporciona un vector de expresión que comprende y es capaz de dirigir la expresión de una secuencia polinucleotídica de acuerdo con el primer aspecto de la invención, en particular el patrón de uso de codones de la secuencia de polinucleótidos gag es típico de genes de mamífero altamente expresados, preferentemente de genes humanos altamente expresados. El vector puede ser adecuado para dirigir la expresión de ADN heterólogo en células bacterianas, células de insecto o células de mamífero, particularmente en células de seres humanos. En una forma de realización, el vector de expresión es p7313 (véase la figura 1).

10 En una realización preferida, el gen gag no codifica el péptido gag p6. El gen Nef está truncado para eliminar la secuencia que codifica la región N terminal es decir para eliminación de 30-85, preferentemente 60-85, normalmente aproximadamente 81, preferentemente los 65 aminoácidos N-terminales.

En la invención el gen de RT también está optimizado para imitar un gen humano altamente expresado. La RT codifica preferentemente una mutación para inactivar sustancialmente cualquier actividad de transcriptasa inversa. Una mutación de inactivación preferida implica la sustitución del triptófano W 229 por K (lisina).

15 De acuerdo con un aspecto adicional de la invención, se proporciona una célula huésped que comprende una secuencia de polinucleótidos de acuerdo con la invención, o un vector de expresión de acuerdo con la invención. La célula huésped puede ser bacteriana, por ejemplo de E. coli, de mamífero, por ejemplo de ser humano, o puede ser una célula de insecto. Las células de mamífero que comprenden un vector de acuerdo con la presente invención pueden ser células cultivadas transfectadas in vitro o pueden transfectarse in vivo mediante la administración del vector al mamífero.

20 La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica que comprende una secuencia polinucleotídica de acuerdo con la invención. Preferentemente la composición comprende un vector de ADN. En realizaciones preferidas la composición comprende una pluralidad de partículas, preferentemente partículas de oro, recubiertas por ADN que comprende un vector que codifica una secuencia polinucleotídica de la invención.

25 Preferentemente la secuencia codifica una secuencia de aminoácidos de gag del VIH, en el que el patrón de uso de codones de la secuencia polinucleotídica es típico de los genes de mamíferos altamente expresados, particularmente genes humanos. En realizaciones alternativas, la composición comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y un vector de ADN de acuerdo con el segundo aspecto de la presente invención. La composición puede también incluir un coadyuvante.

30 Los vectores se pueden usar con agentes inmunoestimuladores. Preferentemente el agente inmunoestimulador se administra al mismo tiempo que el vector de ácido nucleico de la invención y en realizaciones preferidas se formulan conjuntamente. Tales agentes de inmunoestimulación incluyen, aunque esta lista no es, de ningún modo, exhaustiva y no excluye otros agentes: imidazoquinolinas sintéticas, tales como imiquimod [S-26308, R-837], (Harrison, y col. 'Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine', Vaccine 19: 1820-1826, (2001)); y resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos, y col. 'Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN', Cellular immunology 204: 64-74 (2000).), bases de Schiff de carbonilos y aminas que se expresan de forma constitutiva en las superficies de las células presentadoras de antígeno y de los linfocitos celulares, tal como tucaresol (Rhodes, J. y col. 'Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs', Nature 377: 71-75 (1995)), citocinas, quimiocinas y moléculas co-estimuladoras como bien proteína o bien péptido, estas incluirían citocinas pro-inflamatorias tales como GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa y TGF-beta, inductores de Th1 tales como interferón gamma, IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otras quimiocinas y genes co-estimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 y CD40L, otros ligandos que tienen como objetivo inmunoestimulación tales como CTLA-4 y L-selectina, proteínas y péptidos estimuladores de la apoptosis tales como

- Fas, (49), coadyuvantes basados el lípidos sintéticos, tales como vaxfectina, (Reyes y col., 'Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization', *Vaccine* 19: 3778-3786) escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DOPC y colesterol, endotoxina, [LPS], Beutler, B., 'Endotoxin, 'Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity', *Current Opinion in Microbiology* 3: 23-30 (2000)); CpG oligo- y di-nucleótidos, Sato, Y. y col., 'Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization', *Science* 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H. y col., 'A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA', *Nature* 408: 740-745, (2000) y otros posibles ligandos que desencadenan los receptores Toll para producir citocinas inductoras de Th1, tales como lipoproteínas micobacterianas sintéticas, proteína p19 micobacteriana, péptidoglicano, ácido teicoico y lípido A.
- 10 Ciertos coadyuvantes preferidos para provocar una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, un derivado del lípido A, tal como monofosforilo de lípido A o, preferentemente monofosforilo de lípido A 3-des-O-acilado. Los coadyuvantes MPL[®] están disponibles en Corixa Corporation (Seattle, WA; véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG no está metilado) también inducen una respuesta predominantemente de Th1. Dichos oligonucleótidos se conocen bien y se describen en, por ejemplo, los documentos WO 96/02555, WO 99/33488, y las patentes de EE.UU. n° 6,008,200 y 5,856,462. También se describen secuencias de ADN inmunoestimuladoras por Sato y col., *Science* 273: 352, 1996. Otro coadyuvante preferido comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma, incluidas QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonina; o saponinas de *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*.
- 15
- 20 También se proporciona el uso de un polinucleótido de acuerdo con la invención, o de un vector de acuerdo con la invención, en el tratamiento o profilaxis de una infección por VIH.

La presente invención también proporciona procedimientos para tratar o evitar infecciones por VIH, cualesquiera síntomas o enfermedades asociados con las mismas, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un polinucleótido, un vector o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención. La administración de una composición farmacéutica puede tomar la forma de una o más dosis individuales, por ejemplo como dosis repetidas del mismo plásmido de ADN, o en un régimen de vacunación terapéutica de "sensibilización-refuerzo". En ciertos casos, la vacunación de "sensibilización" puede realizarse por liberación de ADN mediada por partículas de un polinucleótido de acuerdo con la presente invención, preferentemente incorporado en un vector derivado de plásmido, y el "refuerzo" por administración de un vector viral recombinante que comprende la misma secuencia de polinucleótidos, o refuerzo con la proteína en coadyuvante. Por el contrario la sensibilización puede realizarse con el vector viral o con una formulación proteica típicamente una proteína formulada en un coadyuvante y el refuerzo puede ser una vacuna de ADN de la presente invención. Se pueden emplear múltiples dosis de sensibilización y/o refuerzo.

25

30

En realizaciones de la invención se contemplan fragmentos de proteínas gag, nef o RT. Por ejemplo, un polinucleótido de la invención puede codificar un fragmento de una proteína gag, nef o RT del VIH. Un polinucleótido que codifica un fragmento de al menos 8, por ejemplo 8-10 aminoácidos, o de hasta 20, 50, 60, 70, 80, 100, 150 o 200 aminoácidos de longitud se considera que entra dentro del alcance de la invención siempre que el oligo o polipéptido codificado demuestre antigenicidad del VIH. En particular, pero no exclusivamente, este aspecto de la invención abarca la situación cuando el polinucleótido codifica un fragmento de una secuencia proteica completa de VIH y puede representar uno o más epitopos diferenciados de dicha proteína. Dichos fragmentos pueden estar optimizados por codones de tal modo que el fragmento tenga un patrón de uso de codones que se asemeje al de un gen de mamífero de expresión alta.

35

40

Las construcciones divulgadas son:

1. p17, p24, condensados a Nef truncada (desprovista de los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-65 terminales)
 2. p17, p24, RT, Nef truncada (desprovista de los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-65 terminales)
 3. p17, p24, (gag optimizado), Nef truncada (desprovista de los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-65 terminales)
 4. p17, p24, (gag optimizado), RT (optimizada), Nef truncada (desprovista de los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-85 terminales)
 5. p17, p24, RT (optimizada) Nef truncada (desprovista de los nucleótidos que codifican los aminoácidos 1-65 terminales)
 6. NEF truncada- (desprovista de 1-65 nucleótidos) condensada a p17, p24 gag optimizados
 7. Construcciones de la invención particularmente preferidas incluyen triples condensaciones RT-NEF-Gag y RT-GAg-Nef, particularmente:
- 55

8. RT optimizada, NEF truncada y P17 optimizada, p24 (gag) (RNG)

y

9. RT (optimizada), P17, 924 (gag) optimizados, Nef truncada (desprovista de los aminoácidos 1-65) RNG)

Se prefiere que las construcciones de VIH deriven de un subtipo B o subtipo C del VIH, particularmente del subtipo B.

Como se ha tratado anteriormente, la presente invención incluye vectores de expresión que comprenden las secuencias nucleotídicas de la invención. Dichos vectores de expresión se construyen de forma rutinaria en la técnica de biología molecular y pueden implicar por ejemplo el uso de ADN plasmídico y de iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos adecuados, tales como, por ejemplo, señales de poliadenilación que pueden ser necesarias y que están en la orientación correcta con el fin de permitir la expresión de proteínas. Otros vectores adecuados serán evidentes para los expertos en la técnica. A modo de ejemplo adicional a este respecto los autores de la presente invención remiten a Sambrook y col. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Segunda edición. CSH Laboratory Press. (1989).

Preferentemente, un polinucleótido de la invención, o para usar en la invención en un vector, está unido de forma operable a una secuencia control que puede proporcionar la expresión de la secuencia codificadora por la célula huésped, es decir el vector es un vector de expresión. La expresión "operablemente unido" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en su modo deseado. Una secuencia reguladora, tal como un "promotor", "operablemente unida" a una secuencia codificante está colocada de tal modo que se consigue la expresión de la secuencia codificadora en condiciones compatibles con las secuencias reguladoras.

Los vectores pueden ser, por ejemplo, plásmidos, cromosomas artificiales (p. ej., BAC, PAC, YAC), virus o fagos proporcionados con un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del polinucleótido y opcionalmente un regulador del promotor. Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a kanamicina o ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia para un vector fúngico. Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ADN o ARN o se pueden usar para transfectar o transformar una célula huésped, por ejemplo, una célula huésped de mamífero por ejemplo para la producción de la proteína codificada por el vector. Los vectores también pueden adaptarse para usarse *in vivo*, por ejemplo en un procedimiento de vacunación con ADN o de terapia génica.

Los promotores y otras señales de regulación de la expresión pueden seleccionarse de modo que sean compatibles con la célula huésped para la que está diseñada su expresión. Por ejemplo, los promotores de mamífero incluyen el promotor de metalotioneína, que puede inducirse en respuesta a metales pesados tales como cadmio y el promotor de la β -actina. También se pueden usar promotores virales tales como el promotor de antígeno T grande de SV40, el promotor temprano inmediato (TI) del citomegalovirus (CMV) humano, el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous, el promotor de adenovirus o un promotor de HPV, particularmente la región reguladora anterior en la cadena de HPV (URR). Todos estos promotores están bien descritos y fácilmente disponibles en la técnica.

Un elemento promotor preferido es el promotor temprano inmediato del CMV, desprovisto del intrón A pero incluyendo exón 1. El elemento promotor puede ser el elemento promotor mínimo o el promotor potenciado, prefiriéndose el promotor potenciado. De acuerdo con esto, se proporciona un vector que comprende un polinucleótido de la invención bajo el control del promotor temprano HCMV TI.

Ejemplos de vectores virales adecuados incluyen vectores del virus del herpes simple, vectores de virus vaccinia o de virus alfa y retrovirus, incluyendo lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados. Las técnicas de transferencia de genes usando estos virus se conocen por aquellos expertos en la técnica. Los vectores de retrovirus por ejemplo se pueden usar para integrar de forma estable el polinucleótido de la invención en el genoma del huésped, aunque dicha recombinación no se prefiere. En contraste, los vectores de adenovirus defectivos en la replicación permanecen episomales y por tanto permiten la expresión temporal. Se pueden emplear vectores capaces de dirigir la expresión en células de insecto (p. ej., vectores de baculovirus), en células humanas, en levaduras o en bacterias, con el fin de producir cantidades de la proteína del VIH codificada por los polinucleótidos de la presente invención, por ejemplo para usar como vacunas de subunidades o en inmunoensayos.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención tienen utilidad en la producción mediante expresión de las proteínas codificadas, cuya expresión puede tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los nucleótidos pueden por lo tanto estar implicados en la síntesis de proteínas recombinantes, por ejemplo para incrementar los rendimientos, o de hecho pueden encontrar uso como agentes terapéuticos por derecho propio, usados en las técnicas de vacunación con ADN. Donde los polinucleótidos de la presente invención se usan en la producción de las proteínas codificadas *in vitro* o *ex vivo*, las células, por ejemplo en cultivo celular, se modificarán para incluir el polinucleótido que se va a expresar. Dichas células incluyen líneas de células de mamífero transitorias, o preferentemente estables. Ejemplos concretos de células que se pueden modificar mediante inserción de vectores que codifican un polipéptido de acuerdo con la invención incluyen las células de mamífero HEK293T, CHO, HeLa, 293 y COS. Preferentemente, la línea celular seleccionada será una que no sólo sea estable, sino que también permita la glicosilación madura y la

expresión en la superficie celular de un polipéptido. La expresión se puede conseguir en oocitos transformados. Un polipéptido puede expresarse a partir de un polinucleótido de la presente invención, en células de un animal no humano transgénico, preferentemente un ratón. Un animal no humano transgénico que expresa un polipéptido de un polinucleótido de la invención está incluido dentro del alcance de la invención.

- 5 Se divulga un procedimiento para vacunar a un sujeto mamífero, que comprende administrar al mismo una cantidad eficaz de una vacuna o composición de vacuna tal. Más preferentemente, los vectores de expresión para usar en vacunas de ADN, composiciones de vacunas y productos inmunoterapéuticos serán vectores plasmídicos.

Las vacunas de ADN pueden administrarse en forma de "ADN desnudo", por ejemplo en una formulación líquida administrada usando una jeringuilla o chorro de presión alta, o de ADN formulado con liposomas o con un potenciador de la transfección irritante, o por administración de ADN mediada por partículas (PMDD). Todos estos sistemas de administración se conocen bien en la técnica. El vector puede introducirse en un mamífero por ejemplo por medio de un sistema de administración de un vector viral.

10

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar intramuscularmente.

En una forma de realización preferida, la composición se administra intradérmicamente. En particular, la composición se administra por medio de una pistola génica particularmente mediante técnicas de administración con bombardeo de partículas que implican recubrir con el vector una perla (p. ej., oro) que después se administra a presión alta en la epidermis; tal como se describe, por ejemplo, en Haynes y col., J Biotechnology 44: 37-42 (1996).

15

En un ejemplo ilustrativo, se puede alcanzar aceleración de partículas impulsada por gas con dispositivos tales como los fabricados por Powderject Pharmaceuticals PLC (Oxford, Reino Unido) y Powderject Vaccines Inc. (Madison, WI), algunos ejemplos de los cuales se describen en las patentes de EE.UU. n° 5.846.796; 6.010.478; 5.865.796; 5.584.807; y en la patente EP n° 0500 799. Este enfoque ofrece un abordaje de administración sin aguja en el que una formulación en polvo seco de partículas microscópicas, tal como un polinucleótido, se acelera a alta velocidad en un chorro de gas helio generado por un dispositivo manual, que propulsa las partículas en un tejido diana de interés, habitualmente la piel.

20

Preferentemente las partículas son perlas de oro de un diámetro de 0,4-4,0 μm , más preferentemente de 0,6-2,0 μm , y, el conjugado de ADN se dispone revestido sobre éstas y después se introducen en un cartucho o casete para su colocación en la "pistola génica".

25

En una realización relacionada, otros dispositivos y procedimientos que pueden ser útiles para inyección impulsada por gas sin aguja de composiciones de la presente invención incluyen aquellos proporcionados por Bioject, Inc. (Portland, OR), algunos ejemplos de los cuales se describen en las patentes de EE.UU. n° 4.790.824; 5.064.413; 5.312.335; 5.383.851; 5.399.163, 5.520.639 y 5.993.412.

30

Los vectores que comprenden las secuencias nucleotídicas que codifican péptidos antigénicos se administran en tal cantidad que serán profiláctica o terapéuticamente eficaces. La cantidad que se va a administrar, está en general en el intervalo de un picogramo a 1 miligramo, preferentemente 1 picogramo a 10 microgramos, para la administración mediada por partículas y 100 nanogramos a 1 miligramo, preferentemente 10 microgramos a 1 miligramo, para otras vías, de nucleótido por dosis. La cantidad exacta puede variar considerablemente en función del peso del paciente que se está inmunizando y de la vía de administración.

35

Es posible que el componente inmunógeno que comprende la secuencia que codifica el péptido antigénico se administre una sola vez o se administre repetidamente, por ejemplo entre 1 y 7 veces, preferentemente entre 1 y 4 veces, a intervalos de entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 18 meses. No obstante, este régimen terapéutico variará significativamente en función del tamaño del paciente implicado, la cantidad de secuencia nucleotídica administrada, la vía de administración y otros factores que serán evidentes para un médico o veterinario practicante experto. El paciente puede recibir uno o más fármacos antirretrovirales contra VIH como parte de su régimen terapéutico global. Adicionalmente el inmunógeno ácido nucleico se puede administrar con un coadyuvante.

40

El componente coadyuvante especificado en el presente documento se puede administrar de forma similar a través de una diversidad de vías de administración, tales como por ejemplo, vías oral, nasal, pulmonar, intramuscular, subcutánea, intradérmica o tópica. Preferentemente, el componente coadyuvante se administra por las vías intradérmica o tópica. Lo más preferentemente por la vía tópica. La administración puede tener lugar entre aproximadamente 14 días antes y aproximadamente 14 días después de la administración de la secuencia nucleotídica, preferentemente entre aproximadamente 1 día antes y aproximadamente 3 días después de la administración de la secuencia nucleotídica. El componente coadyuvante se administra, en una realización, sustancialmente simultáneamente con la administración de la secuencia nucleotídica. Por "sustancialmente simultánea" se quiere decir que la administración del componente coadyuvante se realiza preferentemente al mismo tiempo que la administración de la secuencia nucleotídica, o si no, al menos en el plazo de unas horas antes o después de la administración de la secuencia nucleotídica. En el protocolo de tratamiento más preferido, el componente coadyuvante se administrará sustancialmente simultáneamente con la administración de la secuencia nucleotídica. Obviamente, este protocolo puede variarse según sea necesario, de acuerdo con el tipo de variables a las que se hace referencia anteriormente. Se prefiere que el coadyuvante sea un derivado de 1H-

45

50

55

imidazo[4,5c]quinolina-4-amina, tal como imiquimod. Normalmente, imiquimod se presentará como una formulación en crema tópica y se administrará según el protocolo anterior.

De nuevo, dependiendo de dichas variables, la dosis de administración del derivado también variará, pero podrá por ejemplo, variar entre aproximadamente 0,1 mg por kg a aproximadamente 100 mg por kg, donde "por kg" se refiere al peso corporal del mamífero afectado. Esta administración del derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina preferentemente se repetirá con cada administración posterior o de refuerzo de la secuencia nucleotídica. Lo más preferentemente, la dosis de administración estará entre aproximadamente 1 mg por kg a aproximadamente 50 mg por kg. En el caso de un esquema de "sensibilización-refuerzo" como se ha descrito en el presente documento, el imiquimod u otro derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina se puede administrar con el sensibilizador o con el refuerzo o con ambos el sensibilizador y el refuerzo.

Aunque es posible que el componente coadyuvante comprenda sólo derivados de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina para administrarse en el estado químico bruto, es preferible para la administración que sea en forma de una formulación farmacéutica. Es decir, el componente coadyuvante comprenderá preferentemente la 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina combinada con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, y, opcionalmente, otros ingredientes terapéuticos. El(los) vehículo(s) debe(n) ser "aceptable(s)" en el sentido de ser compatibles con otros ingredientes de la formulación y no dañinos para el receptor de los mismos. La naturaleza de las formulaciones variará de forma natural de acuerdo con la vía de administración prevista, y se pueden preparar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Todos los procedimientos incluyen la etapa de poner en contacto un derivado de 1H-imidazo[4,5c]quinolina-4-amina con uno o más vehículos adecuados. En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto de forma uniforme y estrecha el derivado con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos o con ambos y, después, en caso necesario, dando forma al producto en la formulación deseada. Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración oral pueden presentarse en forma de unidades pequeñas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo; como un polvo o gránulos; como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso; o como una emulsión líquida de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. El ingrediente activo también puede presentarse en forma de un bolo, electuario o pasta.

Un comprimido puede fabricarse mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos sometidos a compresión se pueden preparar comprimiendo en una máquina adecuada del ingrediente activo en forma de flujo libre, tal como un polvo o gránulos, mezclados opcionalmente con un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, lubricante, agente de superficie activa o de dispersión. Los comprimidos moldeados se pueden fabricar moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Opcionalmente, los comprimidos pueden recubrirse o ranurarse y pueden formularse de forma que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo.

Las formulaciones para inyección por medio de, por ejemplo, las vías de administración intramuscular, intraperitoneal o subcutánea incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que vuelven a la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes en suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de multidosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones adecuadas para administración pulmonar por medio de la cavidad bucal o nasal se presentan de modo que dichas partículas que contienen el ingrediente activo, que deseablemente tienen un diámetro en el intervalo de 0,5 a 7 micrómetros, se liberan en el árbol bronquial del receptor. Las posibilidades para dichas formulaciones son que estén en forma de polvos finamente triturados que puedan presentarse de forma conveniente bien en una cápsulas perforable, adecuadamente de, por ejemplo, gelatina, para usar en un dispositivo de inhalación, o, como alternativa, como una formulación con autopropulsión que comprende el ingrediente activo, un propulsor líquido adecuado y, opcionalmente, otros ingredientes tales como tensoactivo y/o un diluyente sólido. Las formulaciones de autopropulsión pueden también emplearse cuando el ingrediente activo se dispensa en forma de gotitas de una solución o suspensión. Dichas formulaciones de autopropulsión son análogas a aquellas conocidas en la técnica y pueden prepararse mediante procedimientos establecidos. Se proporcionan adecuadamente con una válvula de funcionamiento bien operable manualmente o bien automático que tenga las características de pulverización deseadas; de forma ventajosa la válvula es de un tipo fijo que libera un volumen fijado, por ejemplo, de 50 a 100 µl, tras cada operación de la misma.

En otra posibilidad, el componente coadyuvante puede estar en forma de una solución para usar en un atomizador o nebulizador por el que se emplea una corriente de aire acelerada o agitación ultrasónica para producir una neblina de gotitas fina para inhalación.

Generalmente las formulaciones adecuadas para administración intranasal incluyen presentaciones similares a

aquellas descritas con anterioridad para la administración pulmonar, aunque se prefiere que dichas formulaciones tengan un diámetro de partícula en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 200 micrómetros, para permitir la retención en el interior de la cavidad nasal. Esto se puede conseguir como sea adecuado mediante el uso de un tamaño de partícula adecuado o mediante la elección de una válvula adecuada. Otras formulaciones adecuadas incluyen polvos gruesos que tienen un diámetro de partícula en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 500 micrómetros, para administración mediante inhalación rápida a través de las vías nasales desde un contenedor sujeto cerca de la nariz y gotas nasales que comprenden aproximadamente 0,2 al 5% p/p del ingrediente activo en soluciones acuosas u oleosas. En una realización de la invención, es posible que el vector que comprende la secuencia nucleotídica que codifica el péptido antigénico se administre dentro de la misma formulación que el derivado de 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina. Por tanto, en la presente realización, el inmunógeno y el componente coadyuvante se encuentran dentro de la misma formulación.

En una realización, el componente coadyuvante se prepara en una forma adecuada para administración con pistola génica y se administra a través de la vía sustancialmente simultánea con la administración de la secuencia nucleotídica. Para la preparación de formulaciones adecuadas para usar de este modo, puede ser necesario que el derivado de de 1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina se liofilice y se adhiera sobre, por ejemplo, perlas de oro que son adecuadas para administración con pistola génica.

En una realización alternativa, el componente coadyuvante puede administrarse como un polvo seco, mediante propulsión de gas a presión elevada.

Aunque no se formulen juntos, puede ser adecuado administrar el componente coadyuvante en el mismo, o aproximado, punto de administración que la secuencia nucleotídica.

Otros detalles de las preparaciones farmacéuticas se pueden encontrar en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania (1985), cuya divulgación se incorpora en el presente documento en su totalidad, por medio de referencia.

Técnicas adecuadas para introducir el polinucleótido desnudo o el vector en un paciente también incluyen la aplicación tópica con un vehículo adecuado. El ácido nucleico se puede administrar tópicamente a la piel, o a las superficies mucosas mediante por ejemplo administración intranasal, oral, intravaginal o intrarectal. El polinucleótido desnudo o el vector pueden presentarse conjuntamente con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato (PBS). La captación del ADN puede facilitarse también mediante el uso de agentes facilitadores, tales como bupivacaína, bien por separado o bien incluidos en la formulación de ADN. Otros procedimientos de administración del ácido nucleico directamente en un receptor incluyen ultrasonidos, estimulación eléctrica, electroporación y microsiembra, que se describen en el documento US-5.697.901.

La captación de las construcciones de ácido nucleico puede potenciarse mediante varias técnicas de transfección conocidas, por ejemplo aquéllas que incluyen el uso de agentes de transfección. Ejemplos de estos agentes incluyen agentes catiónicos, por ejemplo fosfato cálcico y DEA-Dextrano, y lipofectantes, por ejemplo lipofectam y transfectam. La dosis del ácido nucleico que se ha de administrar se puede modificar.

Una secuencia de ácido nucleico también se puede administrar por medio de vectores de administración especializados útiles en terapia génica. Los enfoques de la terapia génica se tratan en, por ejemplo, Verme y col, *Nature* 1997, 389: 239-242. Se pueden usar los sistemas de vectores tanto virales como no virales. Los sistemas virales incluyen sistemas basados en virus retrovirus, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados, herpesvirus, virus de la viruela del canario y virus vaccinia. Los sistemas no basados en virus incluyen la administración directa de ácidos nucleicos, tecnología de encapsulación en microesferas (poli(láctido-co-glicólido) y sistemas basados en liposomas. Los sistemas de liberación virales y no virales se pueden combinar cuando sea deseable con el fin de proporcionar inyecciones de refuerzo tras una vacunación inicial, por ejemplo una vacunación con ADN "de sensibilización" usando un vector no viral, tal como un plásmido, seguido de una o más vacunaciones de refuerzo usando un vector viral o un sistema no viral. De forma similar, la invención contempla sistemas de arranque de sensibilización con el polinucleótido de la invención, seguidos por refuerzo con proteína en coadyuvante o viceversa.

Una secuencia de ácido nucleico también se puede administrar por medio de células transformadas. Dichas células incluyen células recogidas de un sujeto. El polinucleótido desnudo o el vector de la presente invención se puede introducir en dichas células in vitro y después las células pueden ser devueltas al sujeto. El polinucleótido de la invención se puede integrar en el ácido nucleico ya presente en una célula mediante eventos de recombinación homóloga. Si se desea, una célula transformada se puede cultivar in vivo y una o más de las células resultantes se pueden usar en la presente invención. Las células se pueden proporcionar en un sitio adecuado de un paciente mediante técnicas quirúrgicas o microquirúrgicas (p. ej., injertos, microinyección, etc.).

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir compuestos coadyuvantes, como se ha detallado anteriormente, u otras sustancias que pueden servir para incrementar la respuesta inmunitaria inducida por la proteína que está codificada por el ADN. Éstas pueden estar codificadas por el ADN, bien por separado o bien como una condensación con el antígeno, o pueden estar incluidas como elementos distintos a ADN de la formulación. Ejemplos de sustancias de tipo coadyuvante que se pueden incluir en las formulaciones de la presente invención

incluyen ubiquitina, proteína de membrana asociada al lisosoma (LAMP), antígeno del núcleo del virus de la hepatitis B, ligando de FLT3 (una citocina importante en la generación de células presentadoras de antígeno de profesionales, particularmente células dendríticas) y otras citocinas tales como IFN- γ y GMCSF. Otros coadyuvantes preferidos incluyen imiquimod y resiquimod y tucarasol. Siendo el imiquimod particularmente preferido.

- 5 La presente invención en realizaciones preferidas de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento para usar en el tratamiento o profilaxis de la infección por VIH. Preferentemente la molécula de ácido nucleico se administra con imiquimod. Preferentemente imiquimod se administra tópicamente, mientras que la molécula de ácido nucleico se administra preferentemente por medio de la liberación mediada por partícula.
- 10 De acuerdo con ello se proporciona un procedimiento de tratar a un sujeto que sufre de o es susceptible a infección por VIH, que comprende administrar una molécula de ácido nucleico tal como se describe en el presente documento e imiquimod.

La presente invención se describirá a continuación mediante referencia a los ejemplos siguientes:

Ejemplos

15 **Ejemplo 1:**

Optimización de p55 gag (p17, p24, p13) para simular el uso de codones de genes humanos de expresión alta

Gen de interés

- 20 Un gen sintético codificador para el antígeno p55gag de la cepa HXB2, subtipo B, del VIH-1 (Gen Bank, entrada K03455), optimizado para la expresión en células de mamífero se ensambló a partir de oligonucleótidos solapantes mediante PCR.

- 25 La optimización implicó cambiar el patrón de uso de codones del gen viral dando una frecuencia de codones más cercana a aquella encontrada en genes humanos de expresión alta. Los codones se asignaron usando un programa estadístico Visual Basic denominado Syngene (una versión actualizada de Calcgene, escrito por R.S. Hale y G. Thompson, Protein Expression and Purification Vol. 12 páginas 185-188, 1998).

Clonación:

El producto de la PCR de gag 1528 pb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se ligó en el vector WRG7077 cortado con NotI/BamHI. Esto coloca al gen entre el promotor/intrón A del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

- 30 Los clones se secuenciaron y se comprobaron en busca de errores. Ningún clon estaba correcto al 100%. Las regiones con secuencia correcta de dos clones se combinaron mediante PCR solapante usando combinaciones adecuadas del conjunto de oligos para optimización, dando un gen gag de longitud completa optimizado por codón. Subsiguientemente se encontró que este clon final contenía una única delección de nucleótidos que tuvo como resultado un desplazamiento del marco y la terminación prematura de la traducción. La delección se reparó cortando
- 35 la región del gen que contenía la secuencia incorrecta y clonando en la secuencia correcta de la región equivalente de otro clon. Esto dio el clon p55 gag optimizado por codón final: Gagoptpr2. (Véase la Figura 2)

Ejemplo 2:

Producción de un gen de condensación p17/p24 truncado en Nef

Gen de interés

- 40 Las partes p17 y p24 del gen p55gag derivado de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 se amplificaron mediante PCR a partir del plásmido pHXB?Pr (B.Maschera, E Furfine y E.D. Blair 1995 J.Virol 69 5431-5436). pHXB?Pr. de 426 pb desde el extremo 3' del gen nef de HXB2 se amplificó a partir del mismo plásmido. Dado que el gen nef de HXB2 contiene un codón de terminación prematura se usaron dos PCR solapantes reparando el codón (TGA [terminación] a TGG [Trp]).

- 45 Los productos de PCR p17/p24engarce y trNEFengarce se unieron formando el gen de condensación p17p24trNEF (figura 3) en una reacción de PCR (**antisentido**)

El producto de 1542 pb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se clonó en los sitios NotI BamHI del vector WRG7077. Esto coloca al gen entre el promotor/intrón A del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

50

Ejemplo 3:**Producción de un gen de condensación Gag p17/p24opt/trNef1 ("Gagopt/Nef")****Gen de interés**

5 La parte p17/p24 del gen p55gag optimizado por codón derivado de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pGagOPTtrp2. El gen Nef de HXB2 truncado con el codón de terminación prematuro reparado (TGA [terminación] a TGG [Trp]) se amplificó mediante PCR a partir del plásmido 7077trNef20. Los dos productos de la PCR se diseñaron teniendo extremos solapantes de tal modo que los dos genes se pudieran unir en una segunda PCR.

10 El producto de 1542 pb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se clonó (véanse las figuras) en los sitios NotI BamHI del vector WRG7077. Esto coloca al gen entre el promotor/intrón A del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Ejemplo 4:**Plásmido: p7077-RT3 Clon A****Gen de interés:**

15 Un gen sintético codificante para la parte RT del gen pol de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 optimizado para la expresión en células de mamífero se ensambló a partir de oligonucleótidos solapantes mediante PCR. La secuencia clonada es equivalente a las posiciones 2550-4222 de la secuencia de referencia de HXB2 (GenBank entrada K03455). Para garantizar la expresión la secuencia clonada tiene dos codones adicionales en el extremo 5' no presentes en el gen original, AUG GGC (Met Gly). La optimización implicó cambiar el patrón de uso de codones del gen viral dando una frecuencia de codones más cercana a la encontrada en genes humanos de expresión alta, pero excluyendo los codones de uso infrecuente. Los codones se asignaron usando un programa estadístico Visual Basic denominado Syngene (una versión actualizada de Calcgene, escrito por R.S. Hale y G. Thompson, Protein Expression and Purification Vol. 12 páginas 185-188, 1998).

20

El clon final se construyó a partir de dos clones intermedios, n° 16 y n° 21.

25 Clonación:

El producto de la PCR de 1,7 kb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se limpió por PCR antes de ligar con WRG7077 cortado con NotI/BamHI. Esto coloca al gen entre el promotor del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Se secuenciaron los clones. Ningún clon era correcto al 100%, pero el clon n° 16 se corrigió sustituyendo el fragmento de Kpn1-BamHI de 403 pb que contenía 3 errores con un fragmento de Kpn1-BamHI correcto del clon n° 21. El clon final se verificó mediante secuenciación. (Véase la Figura 5)

30

Ejemplo 5:**RT optimizada****Gen de interés**

35 El gen sintético que codifica para la parte RT del gen pol de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1, optimizado para la expresión en células de mamífero se escindió del plásmido p7077-RT3 como un fragmento NotI/BamHI de 1697 pb, se purificó en gen y se clonó en los sitios NotI y BamHI del p7313-ie (derivado de pspC31) colocando al gen en 3' de un promotor + exón 1 de HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de globina de conejo. (R7004 p27) (figura 6)

40 Ejemplo 6**Plásmido: 7077trNef20****Gen de interés**

El inserto comprende parte del gen Nef de la cepa HXB2 subtipo B VIH-1. Se delecionan 195 pb del extremo 5' eliminando los codones de los primeros 65 aminoácidos de Nef. Además se ha reparado el codón de terminación prematura en la secuencia nef de HXB2 publicada (TAG a TGG [Trp]), como se ha descrito para el plásmido p17/24trNEF1. La secuencia nef truncada se amplificó mediante PCR del plásmido p17/24trNef1. La secuencia clonada es equivalente a las posiciones 8992-9417 de la secuencia de referencia de HXB2 (GenBank entrada K03455). Para garantizar la expresión la secuencia clonada tiene un codón adicional en el extremo 5' no presente en el gen original, AUG (Met).

45

50 Cebadores

StrNef (sentido correcto) ATAAGAATGCGGCCGCCATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTT [SEC ID N° 1]

AStrNef (antisentido)

CGCGGATCCTCAGCAGTTCTTGAAGTACTCC [SEC ID N°: 2]

PCR: 94°C 2 min, después 25 ciclos: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 2 min, terminando a 72°C 5 min

5 Clonación:

El producto de la PCR de RT de 455 pb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se ligó en el vector WRG7077 cortado con NotI/BamHI. Esto coloca al gen entre el promotor/intrón A del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Ejemplo 7

10 Plásmido: 7077RT 8

Gen de interés

La parte RT del gen pol se obtuvo de la cepa HXB2, subtipo B, del VIH-1. Se amplificó mediante PCR del plásmido p7077Pol14.

15 La secuencia clonada es equivalente a las posiciones 2550-4234 de la secuencia de referencia de HXB2 (GenBank entrada K03455). Para garantizar la expresión, la secuencia clonada tiene dos codones adicionales en el extremo 5' no presentes en el gen original, AUG GGC (Met Gly).

Cebadores:

SRT (sentido correcto) ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGCCCCATTAGCCCTATTGAGACT [SEC ID N°: 3]

ASRT (antisentido)

20 CGCGGATCCTTAATCTAAAAATAGTACTTTCCTGATT [SEC ID N°: 4]

PCR: 94°C 2 min, después 25 ciclos: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 4 min, terminando a 72°C 5 min

Clonación:

25 El producto de la PCR de RT de 1720 pb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se ligó en el vector WRG7077 cortado con NotI/BamHI. Esto coloca al gen entre el promotor/intrón A del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Ejemplo 8

p17/24opt/RT/trNef13 ('Gagopt/RT/Nef')

Esta construcción contiene una PCR que produce un cambio de aminoácido de R a H.

Gen de interés:

30 La parte p17/p24 del gen p55gag optimizado por codón derivado de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 se amplificó mediante PCR a partir del plásmido pGagOPTrpr2. La secuencia de codificación de RT se amplificó mediante PCR de plásmido 7077RT 8. El gen Nef de HXB2 truncado con el codón de terminación prematuro reparado (TGA [terminación] a TGG [Trp]) se amplificó mediante PCR a partir del plásmido 7077trNef20. Los tres productos de la PCR se diseñaron teniendo extremos solapantes de modo que los tres genes se pudieran unir en una segunda PCR.

35 Cebadores:

(P17/24)

Sp17p24opt (sentido correcto)

ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGTGCCCGAGCTTCGGT [SEC ID N° 5]

ASp17p24optRTengarce (antisentido)

40 TGGGGCCCATCAACTCTGGCTTTGTGTC [SEC ID N°: 6]

PCR: 94°C 1 min, después 20 ciclos: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 2 min, terminando a 72°C 4 min

El producto 1114bp p17/24opt se purificó en gel.

(RT)

Sp17p24optRTengarce (sentido correcto)

CAGAGTGTGATGGGCCCCATTAGCCCTAT [SEC ID N° 7]

5 ASRTtrNefengarce (antisentido)

AACCCACCATATCTAAAAATAGTACTTTCC [SEC ID N°: 8]

PCR: como se ha indicado anteriormente

El producto de la PCR de RT 1711 pb se purificó en gel.

10 (5' nef truncado)

SRTtrNef engarce (sentido correcto)

CTATTTTTAGATATGGTGGGTTTTCCAGTCAC [SEC ID N°: 9]

AStrNef (antisentido)

CGCGGATCCTCAGCAGTTCTTGAAGTACTCC [SEC ID N°: 10]

15 PCR como se ha indicado anteriormente.

El producto de 448 pb se purificó en gel.

Los tres productos de PCR se unieron en una segunda PCR con los cebadores Sp17/24opt y AstrNef.

PCR: 94°C 1 min, después 30 ciclos: 94°C 30 s, 50°C 30 s, 72°C 4 min, terminando a 72°C 4 min

20 El producto de 3253 pb se purificó en gel, se cortó con las endonucleasas de restricción NotI y BamHI y se clonó en los sitios NotI BamHI del vector WRG7077.

Esto coloca al gen entre el promotor/intrón A del CMV y la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina.

Ejemplo 9

Plásmido: pGRN#16 (p17/p24opt corr /RT/trNef.)

25 **Gen de interés:**

Se observó que la poliproteína generada por p17/24opt/RT/trNef13 ('Gagopt/RT/Nef') expresaba un producto truncado de ~30 kDa debido a un grupo de codones desfavorables en p24 alrededor del aminoácido 270. Estos se sustituyeron con codones óptimos mediante mutagénesis por PCR. Se usó p17/24opt/RT/trNef13 como molde amplificando la parte de Gag 5' en la mutación con los cebadores Sp17/p24opt and GTR-A y la parte de Gag 3' a la mutación con los cebadores GTR-S y Asp17/p24optRTengarce.

El solapamiento de los productos contenía los cambios de codón y los productos purificados en gen se unieron usando los cebadores Sp17/p24o and Asp17/p24optRTengarce. El producto se cortó con NotI y AgeI y se insertó en p17/24opt/RT/trNef13 cortado de forma similar, generando pGRN. El clon n° 16 se verificó y progresó.

Cebadores:

35 5' PCR:

Sp17p24opt (sentido correcto)

ATAAGAATGCGGCCCGCCATGGGTGCCCCGAGCTTCGGT [SEC ID N° 11]

GTR-A (Antisentido)

[SEC ID N° 12]

40 3' PCR

Sentido correcto: GTR-S (Sentido correcto)

[SEC ID N° 13]

ASp17p24optRTengarce (antisentido)

TGGGGCCCATCAACACTCTGGCTTTGTGTC [SEC ID N° 14]

- 5 Las condiciones de PCR para productos individuales y puntos, usando PWO ADN polimerasa (Roche): 95°C 1min, después 20 ciclos 9°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 180 s, terminando a 72°C 120 s y 4°C de retención

El producto de 1114 pb se purificó en gen y se cortó con NotI y AgeI liberando un fragmento de 6647 pb que se purificó en gel y se ligó en el fragmento p17/24opt/RT/trNef13 cortado con NotI/Agel purificado en gel, generando pGRN#16.

10 **Ejemplo 10:**

Plásmido: p73i-GRN2 Clone nº 19

(p17/p24(opt)/RT(opt)trNef) – reparado

Gen de interés:

- 15 La parte p17/p24 de gag optimizado por codón, RT optimizado por codón y gen Nef truncado de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

- 20 Los plásmidos que contienen el gen trNef derivado del plásmido p17/24trNef1 contienen un error de PCR que da un cambio de aminoácido R a H en los 19 aminoácidos a partir del final de nef. Esto se corrigió mediante mutagénesis por PCR, la nef corregida se unió por PCR a RT optimizado por codón de p7077-RT3 y el fragmento unido se cortó con ApaI y BamHI y se clono en p73i-GRN cortado con ApaI/BamHI.

Cebadores:

coRT por PCR de p7077-RT3 usando cebadores:

(Polimerasa = rendimiento PWO (Roche).

Sentido correcto: U1

- 25 AScoRT-Nef

[SEC ID N1 16]

Ciclo: 95 °C (30 s), después 20 ciclos 95°C(30 s), 55°C (30 s), 72°C (180 s), después 72°C (120 s) y retención a 4°C
El producto de 1,7 kb de la PCR se purificó en gel

PCR 5' Nef de p17/24trNef1 usando los cebadores:

- 30 Sentido correcto: S-Nef

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACC [SEC ID N° 17]

Antisentido: ASNef-G:

GATGAAATGCTAGGCGGCTGTCAA.ACCTC [SEC ID N° 18]

Ciclo: 95°C (30 s), después 15 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (60 s), después 72°C (120 s) y retención a 4°C

- 35 PCR 3' Nef de p17/24trNef1 usando los cebadores:

Sentido correcto: SNEF-G

GAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTTCATC [SEC ID N° 19]

Antisentido:

AStrNef (antisentido)

- 40 CGCGGATCCTCAGCAGTTCTTGAAGTACTCC [SEC ID N°: 20]

Ciclo: 95 °C (30 s), después 15 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (60s), después 72°C (120 s) y retención a 4°C

Los productos de PCR se purificaron en gel. Inicialmente, los dos productos Nef se unieron usando los cebadores 5' (S-Nef) y 3' (AstrNef).

Ciclo: 95°C (30 s), después 15 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C(60 s), después 72°C (180 s) y retención a 4°C

5 El producto de la PCR se limpió en PCR y se unió al producto RT usando los cebadores U1 y AstrNef.

Ciclo: 95°C (30 s), después 20 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (180 s), después 72°C (180 s) y retención a 4°C

El producto de 2,1 kb se purificó en gel y se cortó con Apa1 and BamHI. El plásmido p73I-GRN también se cortó con Apa1 y BamHI, se purificó en gel y se ligó con RT3trNef cortada con Apa1-BamHI regenerando el gen p17/p24(opt)/RT(opt)trNef.

10 **Ejemplo 11**

p73i-GN2 Clon nº 2 (p17/p24opt/trNef) – reparado

Gen de interés:

15 La parte p17/p24 de gag optimizado por codón y los genes Nef truncados de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 después de un promotor + exón 1 de HCMV largo lowa y antes de una señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

20 Los plásmidos que contienen el gen trNef derivado del plásmido p17/24trNef1 contienen un error de PCR que da un cambio de aminoácido R a H en los 19 aminoácidos a partir del final de Nef. Esto se corrigió mediante mutagénesis por PCR y el fragmento corregido se cortó con BglII y BamHI y se clonó en p73I-GN cortado con BglII/BamHI. (Figura 12) se regeneró el gen de fusión p17/p24opt/trNef corregido posterior al promotor + exón 1 de HCMV largo lowa y antes de la señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

PCR 5' Nef de p17/24trNef1 usando los cebadores:

(Polimerasa = rendimiento PWO (Roche).

Sentido correcto: S-Nef

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACC [SEC ID Nº 21]

25 Antisentido: ASNef-G:

GATGAAATGCTAGGCGGCTGTCAAACCTC [SEC ID Nº 22]

Ciclo: 95°C (30 s), después 15 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (60 s), después 72°C (120 s) y retención a 4°C

PCR 3' Nef de p17/24trNef1 usando los cebadores:

Sentido correcto: SNEF-G

30 GAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATC [SEC ID Nº 23]

Antisentido: AStrNef

CGCGGATCCTCAGCAGTTCTTGAAGTACTCC [SEC ID Nº: 24]

Ciclo: 95°C (30 s), después 15 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (60s), después 72°C (120 s) y retención a 4°C

Los productos de la PCR se purificaron en gel y se unieron usando los cebadores 5' (S-Nef) y 3' (AstrNef).

35 Ciclo: 95°C (30 s), después 15 ciclos 95°C (30 s), 55°C (30 s), 72°C (60 s), después 72°C (180 s) y retención a 4°C

El producto de PCR se limpió en PCR, se cortó con BglII y BamHI y el fragmento de 367 pb se purificó en gel y se clonó en p73I-GN cortado con BglII/BamHI.

Ejemplo 12

Plásmido: p73I-RT w229k (RT inactivado)

40 **Gen de interés:**

Generación de un gen RT inactivado en posición más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de

HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β -globina de conejo.

Debido a los problemas con el uso de una especie RT de VIH activa en una vacuna terapéutica era deseable la inactivación del gen. Esto se consiguió mediante mutagénesis por PCR del RT (derivado de P73I-GRN2), posición de aminoácido 229 de Trp a Lys (R7271 p1-28).

Cebadores:

PCR 5' RT + mutación usando los cebadores:

(polimerasa = rendimiento PWO (Roche)).

Sentido correcto: RT3-u:1

GAATTTCGCGGCCGCGATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTG
AAACCCGGGAT [SEC ID N° 25]

10

Antisentido: AScoRT-Trp229Lys

GGAGCTCGTAGCCCATCTTCAGGAATGGCGGCTCCTTCT [SEC ID N° 26]

Ciclo:

1 x [94°C (30 s)]

15 15 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (60 s)]

1 x [72°C (30 s)]

Purificación en gel PCR

PCR 3' RT + mutación usando los cebadores:

Antisentido RT3- 1:1

20 Sentido correcto: ScoRT-Trp229Lys

CCTGAAGATGGGCTACGAGCTCCATG [SEC ID N° 28]

Ciclo:

1 x [94°C (30 s)]

15 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (60 s)]

25 1 x [72°C (30 s)]

Purificación en gel PCR

Los productos de la PCR se purificaron en gel y se unieron los extremos 5' y 3' de RT usando los cebadores (RT3-U1) y 3' (RT3-L1).

Ciclo:

30 1 x [94°C (30 s)]

15 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (120 s)]

1 x [72°C (30 s)]

El producto de la PCR se purificó en gel y se clonó en p7313ie, usando los sitios de restricción NotI y BamHI generando p73I-RT w229k. (Véase la Figura 13)

35 **Ejemplo 13:**

Plásmido: p73i-Tgrn (n° 3)

Gen de interés:

La parte p17/p24 de gag optimizado por codón, RT optimizado por codón y gen Neg truncado de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β -globina de conejo.

- 5 Las construcciones de fusión triple que contienen una forma activa de RT pueden no ser aceptables para las autoridades reguladoras para uso humano, por tanto se realizó la inactivación de RT mediante la inserción de un fragmento cortado con NheI y ApaI de p73i-RT w229k en p73i-GRN2#19 cortado con NheI/ApaI (Figura 14). Esto da como resultado un cambio de W \rightarrow K en la posición 229 en RT.

Ejemplo 14

p73i-Tnrg (nº 16)

10 **Gen de interés:**

El Nef truncado, RT inactivada optimizada por codón y la parte p17/p24 del gen gag optimizado por codón de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β -globina de conejo.

- 15 El orden de los genes en la poliproteína codificada por p73i-Tgrn se reorganizó mediante PCR y unión en PCR generando p73i-Tnrg (Figura 15). Cada gen se amplificó por PCR y se purificó en gel antes de la unión en PCR de los genes formando una única poliproteína. El producto se purificó en gel, se digirió con NotI/BamHI y se ligó en p73i3ie cortado con NotI/BamHI.

Cebadores:

PCR de trNef

- 20 S-Nef (Not I)

CATTAGAGCGGCCGCGATGGTGGGTTTTCCAC [SEC ID Nº 29]

Engarce AS-Nef-coRT

[SEC ID Nº 30]

PCR RTw229k

- 25 S-coRT

ATGGGCCCATCAGTCCCATCGAG [SEC ID Nº 31]

Engarce AS-coRT-p17p24

[SEC ID Nº 32]

- 30 PCR de p17p24opt

S-p17p24opt

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG [SEC ID Nº 33]

AS-p17p24opt (BamHI)

GATGGGGGATCCTCACAACACTCTGGCTTTGTGTCC [SEC ID Nº 34]

- 35 Condiciones de PCR para productos individuales y unión usando VENT ADN polimerasa (NEB):

1 x [94°C (30 s)]

25 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (120 s [p17p24 o RT] o 60 s [trNef])]

1 x [72°C (240 s)]

- 40 Los productos de la PCR se purificaron en gel y usaron en una unión por PCR usando los cebadores S-trNef (NotI) y ASp17p24opt (BamHI):

1 x [94°C (30 s)]

25 x [94°C (30 s) /55°C (30 s)/72°C (210 s)]

1 x [72°C (240 s)]

5 El producto de 3000 pb se purificó en gel y se cortó con NotI y BamHI, que se limpió en PCR y se ligó en p7313ie digerido con NotI/BamHI y purificado en gel, generando p73i-Tnrg.

Ejemplo 15:

1. Plásmido: P73i-Tnrg (nº 3)

Gen de interés:

10 El Nef truncado, la parte p17/p24 del gen gag optimizado por codón y el gen RT inactivado optimizado por codón de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo lowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

15 El orden de los genes en la poliproteína codificada por p73i-Tgrn se reorganizó mediante PCR generando p73ITnrg (Figura 16). Se generaron p17/p24 y RT optimizados por codón como un único producto y se unió mediante PCR hasta obtener trNef amplificado. El producto se purificó en gel, se digirió con NotI/BamHI y se ligó en p7313ie cortado con NotI/BamHI.

Cebadores:

PCR P17/p24 - RT 3':

Sp17p24opt (sentido correcto)

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG [SEC ID Nº 35]

20 RT3 1:1 (antisentido)

**GAATTCGGATCCTTACAGCACCTTTCTAATCCCCGCACTCACCAGCTTGTCCGACCTG
CTCGTTGCCGC [SEC ID Nº 36]**

PCR de TrNef 5'

S-Nef (Not I)

CATTAGAGCGCCGCGATGGTGGGTTTTCCAC [SEC ID Nº 37]

25 AS-Nef-p17p24

[SEC ID Nº 38]

Condiciones de PCR para productos individuales y unión usando VENT ADN polimerasa (NEB):

1 x [94°C (30 s)]

25 x [94°C (30 s) /55°C (30 s)/72°C (180 s [p17p24+RT] o 60 s [trNef] o 210 s [unión])]

30 1 x [72°C (240 s)]

El producto de 3000 pb se purificó en gel y se cortó con NotI y BamHI, que se limpió en PCR y se ligó en p7313ie digerido con NotI/BamHI y purificado en gel, generando p73i-Tnrg.

Ejemplo 16:

Plásmido: p73I-Trgn (nº 6)

35 **Gen de interés:**

El gen RT inactivado optimizado por codón, la parte p17/p24 del gen gag optimizado por codón y el gen Nef truncado de la cepa HXB2, subtipo B, del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo lowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

5 El orden de los genes dentro de la construcción se realizó mediante amplificación por PCR de p17p24-trNef y RTw229k de los plásmidos p73I-GN2 y p73I-RTw229k, respectivamente. Se unió mediante PCR y el producto se purificó en gel y se digirió con NotI/BamHI antes de ligar en p7313ie digerido con NotI/BamHI. La secuenciación reveló que p17p24 no estaba completamente optimizado, después se cortó un fragmento de 700 pb con AgeI/MunI de la región de codificación y se substituyó con el fragmento MunI/Aje de p73i-Tgrn#3 que contiene la secuencia de codificación correcta. (Véase la Figura 17)

Cebadores:

p17p24-trNef PCR

S-p17p24opt

10 ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG [SEC ID N° 39]

AstrNef (BamHI)

RTw229k

RT3-U:1

**GAATTCGCGGGCCGCGATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTG
AAACCCGGGAT [SEC ID N° 40]**

15 AS-coRT-p17p24opt engarce

CAGTACCGAAGCTCGGGCACCCATCAGCACCTTTCTAATCCCCGC [SEC ID N° 41]

Condiciones de PCR para productos individuales y unión usando VENT ADN polimerasa (NEB):

1 x [94°C (30 s)]

25 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (120 s (PCR) o 180 s (unión)

20 1 x [72°C (240 s)]

25 El producto de 3000 pb de la unión en PCR se purificó en gel y se cortó con NotI y BamHI, que se limpió en PCR y se ligó en p7313ie digerido con NotI/BamHI y purificado en gel, generando p73i-Trng. El análisis de la secuencia mostró que la secuencia de p17p24 obtenida de p73I-GN2 no estaba completamente optimizada por codón y que esto se había llevado a cabo en el nuevo plásmido. Esto se rectificó cortando un fragmento de 700 pb de p73i-Trng cortado con MunI y AgeI, y substituyéndolo mediante unión con un producto de 700 pb digerido con MunI/AgeI de p73i-Tgrn generando la construcción p73i-Trng n° 6.

Ejemplo 17:

Plásmido: p73i-Trng (n° 11)

Gen de interés:

30 El gen RT inactivado optimizado por codón, el Nef truncado y la parte p17/p24 del gen gag optimizado por codón y de la cepa HXB2, subtipo B, del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

35 El orden de los genes dentro de la construcción se realizó mediante amplificación por PCR de los genes RT-trNef and p17p24 de p73i-Tgrn. Se realizó la unión mediante PCR de los dos fragmentos de ADN y el producto de 3 kb se purificó en gel y se digirió con NotI/BamHI antes de ligar en p7313ie digerido con NotI/BamHI, y dio p73i Trng (n° 11).

Cebadores:

RTw229k-trNef

RT3-u: 1

40 AS-Nef-p17p24opt engarce

P17p24

S-p17p24opt

ATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTG [SEC ID N° 44]

AS-p17p24opt (BamHI)

GATGGGGGATCCTCACAACACTCTGGCTTTGTGTCC [SEC ID N° 45]

5 Condiciones de PCR para productos individuales y unión usando VENT ADN polimerasa (NEB):

1 x [94°C (30 s)]

25 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (120 s (PCR de los genes) o 180 s (unión)

1 x [72°C (240 s)]

10 El producto de 3000 pb de la unión en PCR se purificó en gel y se cortó con NotI y BamHI, que se limpió en PCR y se ligó en p7313ie digerido con NotI/BamHI y purificado en gel, generando p73i-Tnrg.

Ejemplo 18:

p73i-Tgrn (n° 11)

Gen de interés:

15 La parte p17/p24 del gen gag optimizado por codón, el gen Nef truncado y el gen RT inactivado optimizado por codón de la cepa HXB2 subtipo B del VIH-1 más adelante en la cadena con respecto a un promotor + exón 1 de HCMV largo Iowa y anteriormente en la cadena con respecto a una señal de poliadenilación de la β-globina de conejo.

20 El orden de los genes dentro de la construcción se realizó mediante amplificación por PCR de p17p24-trNef y RTw229k de los plásmidos p73I-GN2 y p73I-RTw229k, respectivamente. Se unió mediante PCR y el producto se purificó en gel y se digirió con NotI/BamHI antes de ligar en p7313ie digerido con NotI/BamHI. Se observaron dos errores de secuencia en la secuencia (p17p24 y RT), que después se repararon mediante sustitución con las partes correctas de los genes usando los sitios de restricción dentro de la poliproteína. (Véase la Figura 19).

Cebadores:

p17p24-trNef PCR

25 S-p17p24opt

ATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTG [SEC ID N° 46]

AS-Nef-coRTengarce

GATGGGACTGATGGGGCCCATGCAGTTCTTGAACACTACTCCGG [SEC ID N° 47]

RTw229k

30 S-coRT

ATGGGCCCATCAGTCCCATCGAG [SEC ID N° 48]

RT3-1:1

**GAATTCGGATCCTTACAGCACCTTTCTAATCCCCGCACTCACCAGCTTGTTCGACCTG
CTCGTTGCCGC [SEC ID N° 49]**

Condiciones de PCR para productos individuales y unión usando VENT ADN polimerasa (NEB):

35 1 x [94°C (30 s)]

25 x [94°C (30 s) /55°C (30 s) /72°C (120 s (PCR) o 180 s (unión)

1 x [72°C (240 s)]

40 El producto de 3000 pb se purificó en gel y se cortó con NotI y BamHI, que se limpió en PCR y se ligó en p7313ie digerido con NotI/BamHI y purificado en gel, generando p73i-Tnrg. La secuenciación reveló que p17p24 no estaba completamente optimizado, después se cortó un fragmento de 700 pb con AgeI/MunI de la región de codificación y

se sustituyó con el fragmento MunI/Age de p73i-Tgrn#3 que contiene la secuencia de codificación correcta. La poliproteína también contenía una única mutación puntual (G2609A), que tuvo como resultado una sustitución de aminoácido de Thr a Ala en la parte RT de la poliproteína. La mutación se corrigió mediante digestión con ApaI/BamHI de la construcción y se limpió en PCR eliminando la secuencia mutada, que se sustituyó mediante unión con una parte de RT de p73i-Tgrn digerida con ApaI/BamHI.

Ejemplo 19:

Preparación de la “pasta de oro” recubierta de plásmido para cartuchos de ADN de la “pistola génica”

El ADN del plásmido (aproximadamente 1 µg/µl, por ejemplo 100 µg, y partículas de oro de 2 µm, por ejemplo 50 mg, (PowderJect), se suspendieron en espermidina 0,05 M, por ejemplo 100 µl (Sigma). El ADN se precipitó en las partículas de oro mediante adición de CaCl₂ 1 M, por ejemplo 100 µl (American Pharmaceutical Partners, Inc., EE.UU.). El complejo de ADN/oro se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, se lavó 3 veces en etanol absoluto, por ejemplo 3 x 1 ml (secado previamente en tamiz molecular 3A (BDH)). Las muestras se resuspendieron en etanol absoluto que contiene 0,05 mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP, Sigma) y se dividieron en tres alícuotas iguales en tubos de microfuga de 1,5 ml (Eppendorf). Las alícuotas eran para análisis de (a) “pasta de oro”, (B) eluato- plásmido eluido de (a) y (c) para la preparación de cartuchos Tefzek recubiertos con oro/plásmido para la “pistola génica” (véase el Ejemplo 3, a continuación). Para la preparación de muestras (a) y (b), los tubos que contienen ADN del plásmido/“pasta de oro” en etanol/PVP se centrifugaron durante 2 minutos a velocidad máxima en un tubo de microfuga Eppendorf 5418, el sobrenadante se retiró y la “pasta de oro” se secó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra (a) se resuspendió a 0,5-1,0 µg/µl de ADN plasmídico en TE a pH 8,0, suponiendo un recubrimiento de aproximadamente el 50%. Para la elución, la muestra (b) se resuspendió hasta 0,5-1,0 µg/µl de ADN del plásmido en TE a pH 8,0 y se incubó a 37°C durante 30 minutos, agitando enérgicamente y, después, se centrifugó durante 2 minutos a velocidad máxima en un tubo de microfuga Eppendorf 5418 y el sobrenadante, eluato, se retiró y se almacenó a -20°C. La concentración exacta de ADN eluida se determinó mediante cuantificación espectrofotométrica usando un Genequant II (Pharmacia Biotech).

Ejemplo 20:

Preparaciones de cartuchos para inmunización con ADN

La preparación de los cartuchos para el dispositivo de transferencia génica Accell se realizó como se ha descrito anteriormente (Eisenbraun y col., DNA and Cell Biology, 1993 Vol 12 N° 9 páginas 791-797; Pertner y col.). Brevemente, partículas de oro de 2 µm (DeGussa Corp., South Plainfield, N.J., EE.UU.) se recubrieron con el ADN plasmídico y se cargaron en tubos de Tefzel, y después se cortaron en fragmentos de 1,27 cm de longitud para servir como cartuchos y se almacenaron desecadas a 4°C hasta su uso. En una vacunación típica, cada cartucho contenía 0,5 mg de oro recubierto con un total de 0,5 µg de ADN/cartucho.

Ejemplo 21:

Respuesta inmunitaria a antígenos de VIH tras vacunación con ADN usando la pistola génica

Se vacunaron ratones (n= 3/grupo) con antígenos codificados por ácidos nucleicos y localizados en dos vectores. P7077 usa el promotor IE de HCMV, que incluye el intrón A y el exón 1 (promotor fcmv). P73I libera el mismo antígeno, pero contiene el promotor IE de HCMV (promotor icmv) que no contienen el intrón A, pero incluye el exón 1.

El plásmido se administró en el mismo sitio diana afeitado de piel abdominal de ratones F1 (C3H x Balb/c). Los ratones recibieron una inmunización primaria de 2 x 0,5 µg de ADN el día 0, reforzada con 2 x 0,5 µg de ADN el día 35 y se detectó la respuesta celular el día 40 usando el ensayo Elispot IFN-gamma.

- P73I – vector vacío
- P7077 - vector vacío
- P7077 GRN - (promotor f CMV) Gag, RT, Nef
- P73I GRN - (promotor i CMV) Gag, RT, Nef
- P73I GR3N - (promotor CMV) Gag optimizado, RT optimizado, Nef
- P7077 GRN - (promotor f CMV) Gag, Nef
- P73I GRN - (promotor i CMV) Gag, Nef

Respuestas de células T citotóxicas

- La respuesta de células T citotóxicas se evaluó mediante ensayo ELISPOT con IFN- γ restringido a células T CD8+ de esplenocitos recogidos 5 días después. Se mató a los ratones mediante dislocación cervical y se extrajeron los bazo y se introdujeron en PBS helado. Los esplenocitos se clarificaron en solución salina tamponada con fosfato (PBS), seguido de lisis de eritrocitos (1 minuto en tampón consistente en NH₄Cl 155 mM, KHCO₃ 10 mM, EDTA 0,1 mM). Después de dos lavados en PBS eliminando la materia particulada, la suspensión celular sencilla se alicuotó en placas de ELISPOT previamente revestidas con anticuerpo de captura de IFN- γ y se estimuló con péptido cognado restringido a CD8- (Gag, Nef o RT). Después de cultivar durante una noche, las células productoras de IFN- γ se visualizaron mediante aplicación de anticuerpo anti IFN γ murino marcado con biotina (Pharmingen), seguido de fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina y se cuantificaron usando análisis de imagen
- 10 Los resultados de este experimento se muestran en figuras 20, 21 y 22.

Ejemplo 22:

Inmunogenicidad de las construcciones para vacuna

1. Ensayos celulares

- La respuesta inmunitaria celular comprende células CD8 citotóxicas y células CD4 coadyuvantes. Un procedimiento sensible para detectar las células CD8 y CD4 específicas es el ensayo ELISPOT, que se puede usar cuantificando el número de células capaz de secretar interferón- γ o IL-2. El ensayo ELISPOT depende de la captura de citocinas secretadas por células individuales. Brevemente, placas de microvaloración especializadas se revisten con anticuerpos anti-citocinas. Los esplenocitos aislados de animales inmunizados se incuban durante la noche en presencia de péptidos específicos que representan epítopos conocidos (CD8) o proteínas (CD4). Si se estimulan las células para liberar citocinas, se unirán a los anticuerpos sobre la superficie de la placa que rodea la localidad de las células productoras individuales. Las citocinas permanecen unidas al anticuerpo de revestimiento después de que las células se han lisado y las placas se han lavado. El ensayo se desarrolla de un modo similar a un ELISA usando un sistema de amplificación con biotina/avidina. El número de manchas iguala al número de células productoras de citocina.
- 25 Respuestas de CD8 a los siguientes epítopos murinos restringidos por K2d: Gag (AMQMLKETI), Nef (MTYKAAVDL) y RT (YYDPSKDLI) y las respuestas de CD4 a las proteínas Gag y RT se registraron para las 6 construcciones. Los resultados de estos ensayos se analizaron estadísticamente y las construcciones se clasificaron de acuerdo con su inmunogenicidad. El resultado se muestra en la figura 23 de las figuras.

2. Ensayos humorales

- 30 Las muestras de sangre se recogieron para análisis de anticuerpos a los 7 y 14 días después del refuerzo a partir de dos experimentos. Se separó el suero y se almacenó congelado hasta que se pudieron medir los títulos de anticuerpos usando ensayos ELISA específicos. En todas las muestras se analizaron los anticuerpos frente a Gag, Nef y RT. Brevemente, las placas de ELISA se recubrieron con la proteína relevante. El exceso de proteína se lavó antes de incubar las muestras de suero diluidas en los pocillos. Las muestras de suero se lavaron y se añadió antisuero anti-ratón conjugado con una marca adecuada. La placa se desarrolló y leyó en un lector de placas. Los resultados se muestran en la figura 24.

3. Datos de anticuerpos

- Los títulos de anticuerpos se midieron para las seis construcciones en cuatro experimentos. La construcción p73i-GNR no generó de forma consistente respuestas de anticuerpos frente a Gag y respuestas de anticuerpos limitadas frente a Nef. La razón de ello no está clara, ya que se observaron respuestas de linfocitos T de esplenocitos aislados de los mismos ratones, lo que indica que la proteína Gag se estaba expresando in vivo.

El orden para la generación de anticuerpos específicos frente a Gag fue:

RNG>GRN>NRG>RGN>NGR>GNR

Datos del análisis de inmunología celular

- 45 El objetivo era clasificar las 6 construcciones sobre la base de los datos del recuento de manchas en 3 experimentos de inmunología. Se evaluaron tres grupos de respuestas:
- Respuestas de CD8 a Gag, Nef y RT el día 7 (7 días después de la primaria),
 - Respuestas de CD4 a Gag y RT el día 35 (7 días después del refuerzo),
 - Respuestas de CD8 a Gag, Nef y RT el día 35 (7 días después del refuerzo),
- 50 Cada respuesta (p. ej., respuesta CD8 a Gag) se modeló usando un modelo de efectos lineales mixtos en SAS, versión 8. El modelo incluyó efectos fijos de la construcción, estuviera el antígeno particular (Gag, Nef o RT)

presente o ausente, y estuviera IL-2 presente o ausente. Además, para las respuestas de CD8, en las que se disponía de datos de cada ratón individual, el sujeto se incluyó como efecto aleatorio en el modelo. El modelo incluyó términos de interacción permitiendo un efecto diferente de la construcción para cada combinación del antígeno (presente/ausente) e IL-2 (presente/ausente).

- 5 A partir del modelo, la diferencia en la respuesta media ajustada entre cada construcción y p7313 (el grupo control) se estimó por separado para cada combinación de antígeno (presente/ausente) e IL-2 (presente/ausente), junto con un valor p indicativo de si la diferencia era estadísticamente significativa o no. En base a las diferencias y los valores p en presencia del antígeno y la ausencia de IL-2, las construcciones se clasificaron asignando una puntuación de 6 a la construcción con la diferencia más grande, 5 para la siguiente más grande etc., pero 0 a todas las construcciones en las que la diferencia no era estadísticamente significativa al nivel de 5%.

Las suposiciones del modelo -que los residuos estaban distribuidos normalmente con una varianza constante, se evaluaron usando procedimientos gráficos y análisis de sensibilidad, en los que se modeló primero un logaritmo y segundo una transformación de raíz cuadrada de la respuesta. La clasificación de las construcciones no era sensible a las desviaciones de las suposiciones del modelo.

- 15 Habiendo calculado los órdenes para cada respuesta en cada experimento por separado, los órdenes totales para los 3 grupos de respuestas se calcularon en los 3 experimentos. La tabla siguiente muestra los órdenes totales en los 3 experimentos.

Órdenes totales de las construcciones para cada uno de los 3 grupos de respuestas, combinados a lo largo de 3 experimentos de inmunología

Construcción	Día 7 (7 días tras la primaria)		Día 35 (7 días tras el refuerzo)	
	CD8	CD4	CD4	CD8
GRN	5	18	18	3
GNR	17	24	24	28
RGN	28	23	23	33
RNG	25	27	27	37
NRG	25	19	19	0
NGR	4	14	14	10

- 20 RNG tiene el orden más alto para todos los grupos de respuestas el día 35 y el segundo orden más alto por detrás de RGN el día 7. EGN también recibe órdenes altos para todos los grupos de respuestas el día 35.

REIVINDICACIONES

1. Una secuencia de nucleótidos ligada en forma operable a un promotor heterólogo, en la que la secuencia de nucleótido codifica para RT optimizada, Nef truncada, p17 Gag optimizada por codón y p24 Gag optimizada por codón, en el orden RT, Nef, p17 Gag, p24 Gag.
- 5 2. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 en la que la secuencia gag se optimiza por codón para que se parezca al uso de codón en un gen humano altamente expresado y la secuencia de nucleótido tiene un valor de RSCU mayor de 0,5.
3. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1 ó 2 en la que el RT se optimiza por codón para que se parezca a un gen de expresión alta.
- 10 4. Una secuencia de nucleótidos según cualquier reivindicación precedente en la que el promotor heterólogo es el promotor del gen IE de HCMV.
5. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 4 en la que el extremo 5' del promotor comprende el exón 1.
- 15 6. Una secuencia de nucleótidos según cualquier reivindicación precedente en la que la RT codifica una mutación para inactivar sustancialmente cualquier actividad de transcriptasa reversa.
7. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 6 en la que RT se muta substituyendo el triptófano 229 por Lisina.
8. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 20 9. Un vector según la reivindicación 8 que es un vector viral.
10. Un vector viral según la reivindicación 9 que es un adenovirus defectivo en replicación.
11. Un vector según la reivindicación 9 que es un plásmido de ADN de doble cadena.
12. Una proteína codificada por una secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 25 13. Una composición farmacéutica que comprende una secuencia de nucleótidos de las reivindicaciones 1 a 7 o un vector de las reivindicaciones 8-11 y un excipiente, diluyente, vehículo o coadyuvante farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 13 adaptada para administración intramuscular o intradérmica.
- 30 15. Una composición farmacéutica según la reivindicación 13 ó 14, en la que el vehículo es una perla de oro.
16. Un dispositivo de administración intradérmica que comprende una composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15.
- 35 17. Una secuencia de nucleótido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, un vector de las reivindicaciones 8 a 11 o una composición de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, para usar en medicina.
- 40 18. Un procedimiento para la producción de un nucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende engarzar de manera operable una secuencia de nucleótidos que codifica RT (optimizada por codón), Nef truncada, p17 Gag (optimizada por codón) y p24 Gag (optimizada por codón) en el orden RT, Nef, p17 Gag, p24 Gag a un promotor heterólogo.

Figura 1

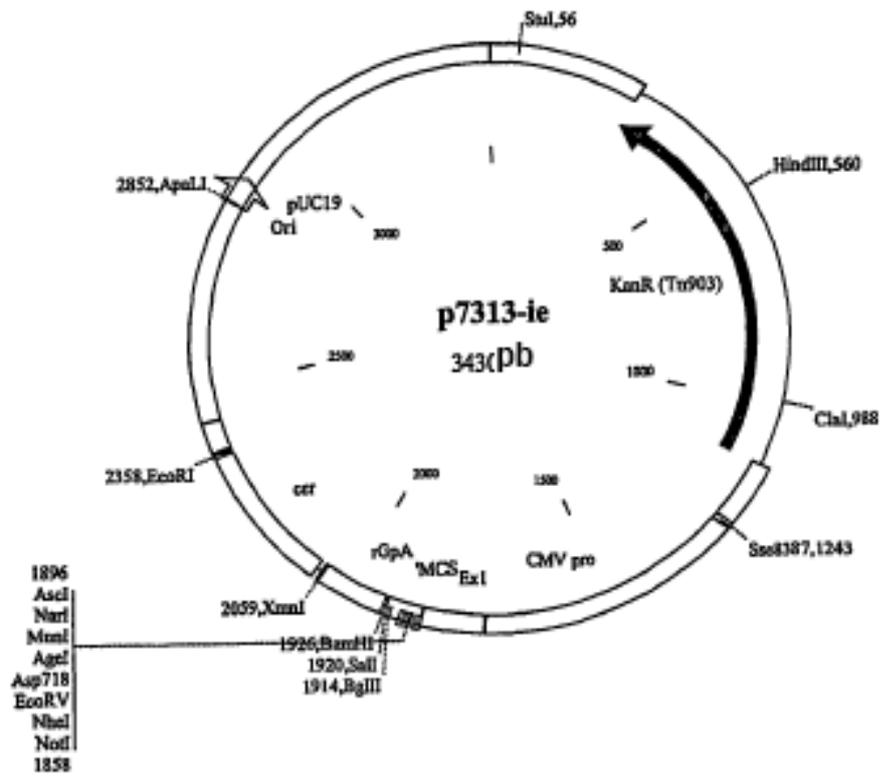


Figura 2

Secuencia del inserto p55 gag en pGAgOptpr2

ATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
 AGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCG
 AGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
 CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGG
 TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
 GCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCT
 ATTGTCCAAAACATTGAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTC
 AATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATG
 TTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
 GTGGGCGGCCATCAGGCCGCGCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
 GCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATG
 CGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATC
 GGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATTCTCGGTCTCAATAAAAATTGTTAGAAATGACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTGACCGGTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCCGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGGCCGAAGCCATGAGCCAGGTGACGAACTCCGCAACCATCATGATGCAGAGA
 GGGAACTTCCGCAATCAGCGGAAGATCGTGAAGTGTTCATTGCGGCAAGGAGGGT
 CATAACGCCCCGCAACTGTCGGGCCCCTAGGAAGAAAGGGTGTGGAAAGTGGGCAAG
 GAGGGACACCAGATGAAAGACTGTACAGAACGACAGGCCAATTTTCTTGGAAAGATT
 TGGCCGAGCTACAAGGGGAGACCTGGTAATTTCTGCAAAGCAGGCCCGAGCCACC
 GCCCCCCCTGAGGAATCCTTCAGGTCCGGAGTGGAGACCACAACGCCTCCCCAAAAA
 CAGGAACCAATCGACAAGGAGCTGTACCCTTTAACTTCTCTGCGTTCTCTTTGGC
 AACGACCCGTCGTCTCAATAA [SEQ ID NO: 50]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIBIKDTKEA
 LDKIEEBQNK SKKKAQQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNITMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMR PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWII LGL NKIVRMYSPT SILDIRQGPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQNPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLAEAMSQV TNSATIMMQR GNFRNQKIV KCFNCGKEGH
 TARNCRAPRK KGCWKCGKEG HQMKDCTERQ ANFLGKIWPS YKGRPGNFLQ
 SRPEPTAPPE EFRSGVETT TPPQKQEPID KELYPLTSLR SLFGNDPSSQ

*

[SEQ ID NO: 51]

Figura 3

Secuencia del inserto p17/24trNEF en p17/24trNEF1

ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATT
 CGGTTAAGGCCAGGGGGAAAAGAAAAATATAAATTAAAACATATAGTATGGGCAAGC
 AGGGAGCTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGT
 AGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGA
 TCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAA
 GACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAACAAAAGTAAGAAAAA
 GCACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCCT
 ATAGTGCAGAACATCCAGGGGCAAATGGTACATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTA
 AATGCATGGGTAAAAGTAGTAGAAGAGAAGGCTTTCAGCCCAGAAGTGATACCCATG
 TTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAAGATTTAAACACCATGCTAAACACA
 GTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAAGAGACCATCAATGAGGAAGCT
 GCAGAAATGGGATAGAGTGCATCCAGTGCATGCAGGGCCTATTGCACCAGGCCAGATG
 AGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACTACTAGTACCCTTCAGGAACAAATA
 GGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCAGTAGGAGAAATTTATAAAAGATGGATA
 ATCCTGGGATTAATAAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATTCTGGACATA
 AGACAAGGACCAAAGAACCCTTTAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAACTCTA
 AGAGCCGAGCAAGCTTCAAGGAGGTAAAAAATGGATGACAGAAACCTTGTTGGTC
 CAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCGGCTACA
 CTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTAGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGA
 GTTTTGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
 GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATT
 CACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTAC
 TTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGATATCCACTGACCTTT
 GGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAA
 GGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAG
 AGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCACCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGA
 GAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTCTGA [SEQ ID NO: 52]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIBIKDTKEA
 LDKIEEBQNK SKKKAQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMR PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSP SILDIRQGP EPFRDYVDRF
 YKTLRABQAS QEVKNWMTET LLVQNPDC KTIKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLVGFVTP QVPLRPMYK AAVDLSHFLK EKGLEGLIH
 SRRQDILDW WIYHTQGYFP DWQNYTPGPG VRYPLTFGWC YKLVPEPDK
 VEEANKGENT SLLHPVSLHG MDDPEREVLE WRFDSLAFH HVARELHPEY
 FKNC*

[SEQ ID NO: 53]

Figura 4

Secuencia del inserto p17/24opt/trNef en p17/24opt/trNef1

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
 AGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCG
 AGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
 CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCCGGGAGTGAAGAGCTGAGG
 TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
 GCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCT
 ATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTC
 AATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTATCCCCATG
 TTCTCCGCTTGTAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
 GTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
 GCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATG
 CGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATC
 GGATGGATGACCAACAATCCTCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATTCTCGGTCTCAATAAAATTGTTAGAATGTAATCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCCGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGTGGGTTTTCCAGTACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC
 AAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTA
 ATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGC
 TACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACC
 TTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGGCCAAT
 AAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCG
 GAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGTTTGACAGCCACCTAGCATTTCATCACGTGGCC
 CGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTCTGA [SEQ ID NO: 54]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIBIKDTKEA
 LDKIEEBQNK SKKKAQQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMRB PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWII LGL NKIVRMYSPT SILDIRQPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLVGVFPVT PQVPLRPMTY KAAVDLSHFL KEKGGLEGLI
 HSQRRQDILD LWIYHTQGYF PDWQNYTPGP GVRYPITFGW CYKLVPEVPD
 KVEEANKGEN TSL LHPVSLH GMDDPEREVL EWRFDShLAF HHVARELHPE
 YPKNC*
 [SEQ ID NO: 55]

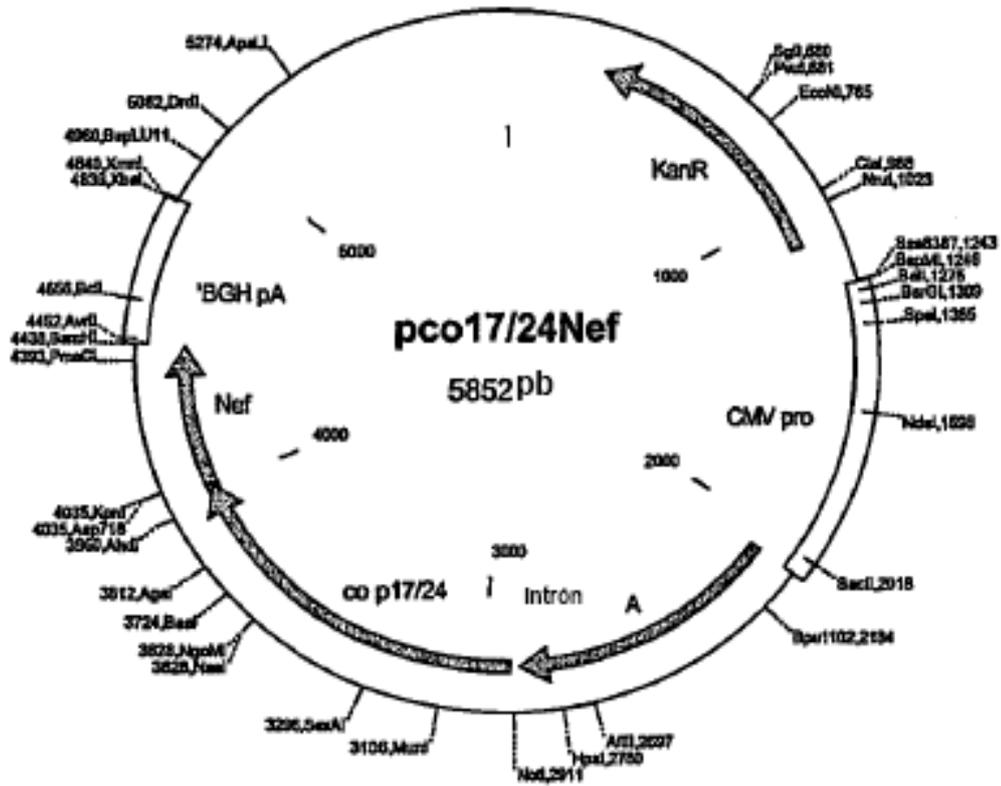


Figura 5

Secuencia del inserto RT de p7077-RT3:

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGAC
 GGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAG
 ATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCCA
 TACAACACCCCCGTGTTTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTG
 GTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGC
 ATCCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGC
 GACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACC
 ATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCC
 CAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAG
 CCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTAC
 GTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAG
 CATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCA
 TTCCTGTGGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTC
 CTCCTCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTC
 AACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTG
 CGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCTCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAG
 CTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCC
 TCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGCAGTGGACATACCAG
 ATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGC
 GCCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACGACCGAG
 TCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACC
 TGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTC
 GTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTG
 GGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACC CGAACAAGCTCGGGAAG
 GCCGGGTACGTACCAACCGGGGCCCGCAGAAGGTGCTCACCCCTGACCGACACCACC
 AACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAG
 GTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTCAGGCCAGCCGGAC
 CAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAG
 GTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGCAC
 AAGCTGGTGAAGTGGGGGATTAGAAAGGTGCTGTAA [SEQ ID NO: 56]

MGPISPIETV SVKLRKPGMDG PKVKQWPLTE EKIKALVEIC TEMEKBGKIS
 KIGPENPYNT PVFAIKKDS TKWRKLVDFR ELNKRTQDFW EVQLGIPHPA
 GLKKKKSQTV LDVGDAYFSV PLDEDFRKYT AFTIPSINNE TPGIRYQYNV
 LPQGWKQSPA IFQSSMTKIL EPFRKQNPDI VIYQYMDLY VGSLEIGQH
 RTKIBELRQH LLRWGLTTPD KKHQKEPPFL WMGYRLHPDK WTVQPIVLPE
 KDSWTVNDIQ KLVGKLNWAS QIYPGIKVRQ LCKLLRGTKA LTEVIPLTBE
 AELELAENRE ILKEPVHGVY YDPSKDLIAE IQKQGGQWT YQIYQEPFKN
 LKTGKYARMR GAHTNDVKQL TEAVQKITTE SIVIWGKTPK FKLPIQKETW
 ETWWTYEQA TWIPEWEPVN TPPLVKLWYQ LEKEPIVGAE TFYVDGAANR
 ETKLKGAGYV TNRGRQKVVV LTDTTNQKTE LQAIYLALQD SGLEVNIVTD
 SQYALGIIQA QPDQSESELV NQIIEQLIKK BKVYLAWVPA HKGIGGNEBQV

DKLVSAGIRK VL*

[SEC ID N° 57]

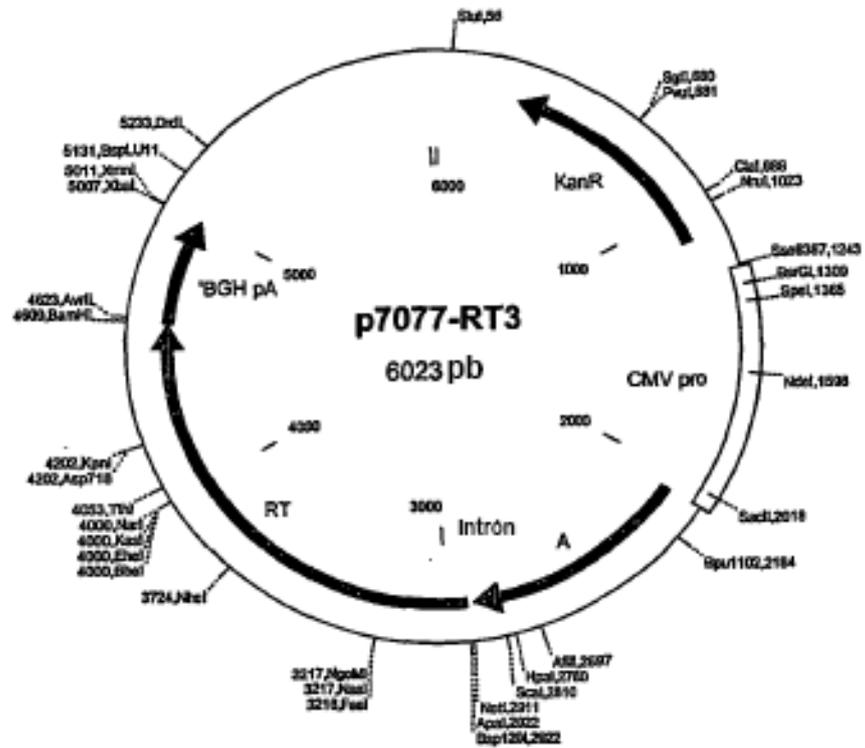


Figura 6

Secuencia del inserto codificador en p73i-RT3:

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGAC
 GGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAG
 ATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCCA
 TACAACACCCCGTGTGTTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTG
 GTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGC
 ATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTGGACGTGGGC
 GACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCCGCTTTACC
 ATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCC
 CAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAG
 CCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTAC
 GTGGGCTCTGACCTGGAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAG
 CATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCA
 TTCCTGTGGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTC
 CTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTC
 AACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTG
 CGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAG
 CTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCC
 TCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATAACAG
 ATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGC
 GCCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCAGAAAGATCACGACCGAG
 TCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCATCCAGAAGGAGACC
 TGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTC
 GTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTG
 GCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAA
 GGCCGGGTACGTCACCAACCGGGGCCCGCAGAAGGTGCTCACCCCTGACCGACACCAC
 CAACCAGAAGACCGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGA
 GGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTACAGCCCAGCCGGA
 CCAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAA
 GGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGCA
 CAAGCTGGTGAGTGCGGGGATTAGAAAGGTGCTGTAA [SEQ ID NO: 58]

MGPISPIETV SVKCLKPGMDG PKVKQWPLTE EKIKALVEIC TEMBEKGGKIS
 KIGPENPYNT PVFAIKKKDS TKWRKLVDFR ELNKRTQDFW EVQLGIPHPA
 GLKKKKSIVT LDVGDAYFSV PLDEDFRKYT AFTIPSINNE TPGIRYQYNV
 LPQGWKSPA IFQSSMTKIL EPFRKQNPDI VIYQYMDDLY VGSLEIGQH
 RTKIEELRQH LLRWGLTTPD KKHQKEPPFL WMGYELHPDK WTVQPIVLP
 KDSWTVNDIQ KLVGKLNWAS QIYPGIKVRQ LCKLLRGTKA LTEVIPLTEE
 AELELAENRE ILKEPVHGVY YDPSKDLIAE IQKQGGQWT YQIYQEPFKN
 LKTGKYARMR GAHTNDVKQL TEAVQKITTE SIVIWGKTPK FKLPIQKETW
 ETWNTYEQWQ TWIPEWEPVN TPPLVKLWYQ LEKEPIVGAE TIFYVDGAANR
 ETKLGKAGYV TNRGRQKVVT LTDTTNQKTE LQAIYLALQD SGLEVNIVTD
 SQYALGIIQA QPDQSESELV NQIIEQLIKK EKVYLAWVPA HKGIGGNEQV

DKLVSAGIRK VL*

[SEC ID N° 59]

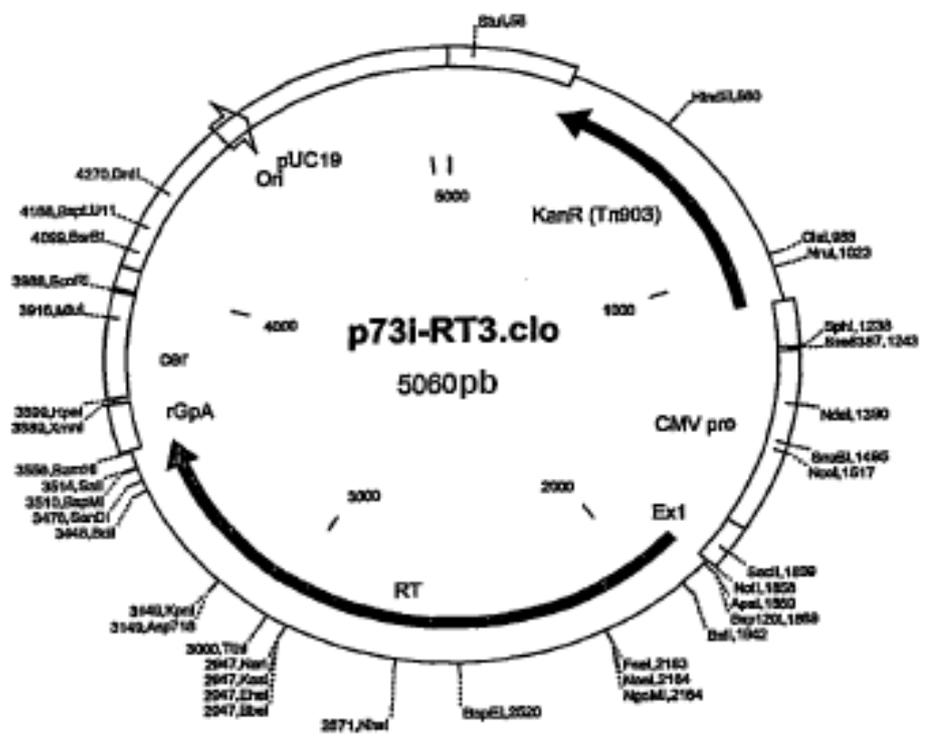


Figura 7

Secuencia del inserto Nef en 7077trNef20

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCA
GCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCAC
TCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTC
CCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGA
TGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGA
GAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGA
GAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCACCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAG
CTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 60]

MVGFPVTPQV PLRPMTYKAA VDLSHFLKEK GGLEGLIHSQ RRQDILDWI
YHTQGYFPDW QNYTPGPGVR YPLTFGWCYK LVPVEPKVE EANKGENTSL
LHPVSLHGMD DPEREVLEWR FDSVLAFHHV ARELHPEYFK NC*
[SEQ ID NO: 61]

Secuencia del inserto RT en 7077RT8

ATGGGCCCCATTAGCCCTATTGAGACTGTGTCAGTAAAATTAAGCCAGGAATGGAT
 GGCCCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAGCATTAGTAGAA
 ATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAAAATCCA
 TACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAAGACAGTACTAAATGGAGAAAATTA
 GTAGATTTTCAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAATTAGGA
 ATACCACATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGATGTGGGT
 GATGCATATTTTTTCAGTTCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAATATACTGCATTTACC
 ATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCA
 CAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAATCTTAGAG
 CCTTTTAGAAAACAAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGATTTGTAT
 GTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAGCTGAGACAA
 CATCTGTTGAGGTGGGGACTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAACCCTCCA
 TTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCTATAGTG
 CTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTGGGGAAATTG
 AATTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAACTCCTT
 AGAGGAACCAAAGCACTAACAGAAGTAATACCCTAACAGAAGAAGCAGAGCTAGAA
 CTGGCAGAAAACAGAGAGATTCTAAAAGAACCAAGTACATGGAGTGTATTATGACCCA
 TCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACATATCAA
 ATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAATGAGGGGT
 GCCCACACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACCACAGAA
 AGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAACTGCCCATACAAAAGGAAACA
 TGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCCTGAGTGGGAGTTT
 GTTAATACCCCTCCCTTAGTGAAATFATGGTACCAGTTAGAGAAAAGAACCATAGTA
 GGAGCAGAAACCTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAACAGGGGAGACTAAATTAGGAAAA
 GCAGGATATGTTACTAATAGAGGAAGACAAAAAGTTGTCACCCTAACTGACACAACA
 AATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTTATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGATTAGAA
 GTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCATTAGGAATCATTCAAGCACAACCAGAT
 CAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAGGAAAAG
 GTCTATCTGGCATGGGTACCAGCACACAAGGAATTGGAGGAAATGAACAAGTAGAT
 AAATTAGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATTAA

[SEQ ID NO: 62]

MGPISPIETV SVKCLKPGMDG PKVKQWPLTE EKIKALVEIC TEMEKEGKIS
 KIGPENFYNT PVFAIKKDS TKWRKLVDFR ELNKRTQDFW EVQLGIPHPA
 GLKKKKSVTV LDVGDAYFSV PLDEDFRKYT AFTIP SINNE TPGIRYQYNV
 LPQGWKGSPA IFQSSMTKIL EPFRKQNPDI VIYQYMDDLY VGSLEIGQH
 RTKIEBELRQH LLRWGLTTPD KKHQKEPPFL WMGYELHPDK WTVQPIVLPE
 KDSWTVNDIQ KLVGKLNWAS QIYPGIKVRQ LCKLLRGTKA LTEVIPLTEE
 AELELAENRE ILKEPVHGVY YDPSKDLIAE IQKQGQGWNT YQIYQEPFKN
 LKTGKYARMR GAHTNDVKQL TEAVQKITTE SIVIWGKTPK FKLPIQKETW
 ETWWTEYWQA TWIPEWEPVN TPPLVKLWYQ LEKEPIVGAB TFYVDGAANR
 ETKLKGAGYV TNRGRQKVVT LTDITNQKTE LQAIYLALQD SGLEVNIVTD
 SQYALGIIQA QPDQSESELV NQIIEQLIKK EKVYLAWVPA HKGIGGNEQV
 DKLVSAGIRK VLFLD*

[SEC ID N° 63]

Figura 9

Secuencia del inserto p17/24opt/RT/trNef en p17/24opt/RT/trNef13

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
 AGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCG
 AGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
 CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGG
 TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
 GCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCT
 ATTGTCCAAAACATTGAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACGCTC
 AATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATG
 TTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
 GTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
 GCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCCGGACAGATG
 CGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATC
 GGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATTCTCGGTCTCAATAAAATGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCTAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGGCCCCATTAGCCCTATTGAGACTGTGTGAGTAAAAATTAAGCCAGGA
 ATGGATGGCCCAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAATAAAAGCATTAA
 GTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAA
 AATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGA
 AAATTAGTAGATTTAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAA
 TTAGGAATACCACATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAAAATCAGTAACAGTACTGGAT
 GTGGGTGATGCATATTTTTAGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAATATACTGCA
 TTTACCATACCTAGTATAAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTG
 CTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATC
 TTAGAGCCTTTTAGAAAACAAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGAT
 TTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAAAAATAGAGGAGCTG
 AGACAAACATCTGTTGAGGTGGGGACTTACCACACCAGACAAAAAACATCAGAAAGAA
 CCTCCATTCCTTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCT
 ATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTGGGG
 AAATTGAATGGGCAAGTCAGATTTACCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAA
 CTCCTTAGAGGAACCAAAGCACTAACAGAAGTAATACCACTAACAGAAGAAGCAGAG
 CTAGAACTGGCAGAAAACAGAGAGATTCTAAAAGAACCAGTACATGGAGTGTATTAT
 GACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA
 TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAAATATGCAAGAATG
 AGGGGTGCCACACTAATGATGTAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACC
 ACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAACTGCCCATACAAAAG
 GAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGG

GAGTTTGTTAATACCCCTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACCC
 ATAGTAGGAGCAGAAACCTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAACAGGGGAGACTAAATTA
 GGAAAAGCAGGATATGTTACTAATAGAGGAAGACAAAAGTTGTCACCCCTAACTGAC
 ACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTTATCTAGCTTTGCAGGATTCCGGGA
 TTAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCATTAGGAATCATTCAAGCACAA
 CCAGATCAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAG
 GAAAAGGTCTATCTGGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAA
 GTAGATAAATTAGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATATGGTGGGT
 TTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT
 CTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGA
 AGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGG
 CAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTAC
 AAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACC
 AGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTA
 GAGTGGAGGTTTGACAGCCACCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCG
 GAGTACTTCAAGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 64]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 LDKIEEEQNK SKKKAQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNTMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMR PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWII LGL NKIVRMYSP SILDIRQPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQNaNPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETVSVKLKPG MDGPKVKQWP LTEEKIKALV
 EICTEMEKBG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ
 DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 NNETPGIRYQ YNVLPQGWKG SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIVIQYMD
 DLYVGSLEI GQHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPDKKHQKEP PFLWMGYELH
 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGIK VRQLCKLLRG
 TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IABIQKQGGQ
 QWTYQIYQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIVIWGK
 TPKFKLPIQK ETWETWTEY WQATWIPEWE FVNTPLVVKL WYQLEKEPIV
 GAETFYVDGA ANRETKLGKA GYVTNRGRQK VVTLTDTNQ KTELQAIYLA
 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAQPQSES ELVNQIIEQL IKKEKVYLA
 VPAHKGIGGN EQVDKLVSA G IRKVLFLDMV GFPVTPQVPL RPTYKAAVD
 LSHFLKEKGG LEGLIHSQRR QDILDWYIH TQGYFPDQON YTPGPGVRY
 LTFGWCYKLV PVEPKVEEA NKGENTSLLH PVSLHGMDDP EREVLEWRFD
 SHLAFHHVAR ELHPEYFKNC *

[SEQ ID NO: 65]

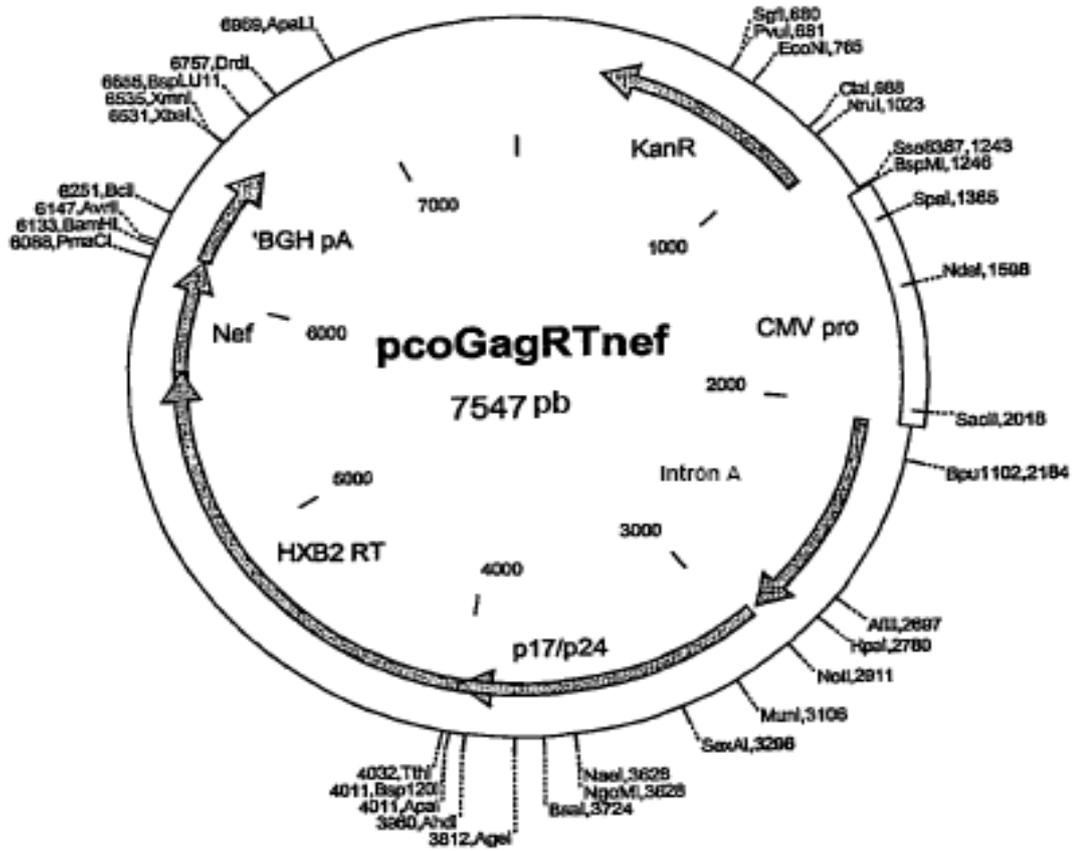


Figura 10

Secuencia del inserto codificador p17/p24opt(cor)/RT/trNef en WRG7077:

ATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
 AGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCG
 AGGGAGCTTGAACGTTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
 CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCAGGAGTGAAGAGCTGAGG
 TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
 GCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCAGAACTATCCT
 ATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACGCTC
 AATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATG
 TTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
 GTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
 GCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATG
 CGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATC
 GGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATCCTGGGCCTGAAACAAGATCGTGGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCCGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGGCCCCATTAGCCCTATTGAGACTGTGTGTCAGTAAAATTAAGCCAGGA
 ATGGATGGCCCAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGAAGAAAAAATAAAGCATT
 GTAGAAATTTGTACAGAGATGGAAAAGGAAGGGAAAATTTCAAAAATTGGGCCTGAA
 AATCCATACAATACTCCAGTATTTGCCATAAAGAAAAAGACAGTACTAAATGGAGA
 AAATTAGTAGATTTAGAGAACTTAATAAGAGAACTCAAGACTTCTGGGAAGTTCAA
 TTAGGAATACCATCCCGCAGGGTTAAAAAAGAAAAATCAGTAACAGTACTGGAT
 GTGGGTGATGCATATTTTTAGTTCCCTTAGATGAAGACTTCAGGAAATATACTGCA
 TTTACCATACCTAGTATAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTG
 CTTCCACAGGGATGGAAAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGTAGCATGACAAAAATC
 TTAGAGCCTTTTAGAAAACAATCCAGACATAGTTATCTATCAATACATGGATGAT
 TTGTATGTAGGATCTGACTTAGAAATAGGGCAGCATAGAACAATAAGAGGAGCTG
 AGACAACATCTGTTGAGGTGGGGACTTACCACACCAGACAAAAACATCAGAAAGAA
 CCTCCATTCCCTTGGATGGGTTATGAACTCCATCCTGATAAATGGACAGTACAGCCT
 ATAGTGCTGCCAGAAAAAGACAGCTGGACTGTCAATGACATACAGAAGTTAGTGGGG
 AAATTGAATTGGGCAAGTCAGATTTACCCAGGGATTAAAGTAAGGCAATTATGTAAA
 CTCCTTAGAGGAACCAAAGCACTAACAGAAGTAATACCACTAACAGAAGAAGCAGAG
 CTAGAACTGGCAGAAAACAGAGAGATTCTAAAAGAACCAGTACATGGAGTGTATTAT
 GACCCATCAAAGACTTAATAGCAGAAATACAGAAGCAGGGGCAAGGCCAATGGACA
 TATCAAATTTATCAAGAGCCATTTAAAAATCTGAAAACAGGAAAATATGCAAGAATG
 AGGGGTGCCCACTAATGATGTAAAACAATTAACAGAGGCAGTGCAAAAAATAACC
 ACAGAAAGCATAGTAATATGGGGAAAGACTCCTAAATTTAAACTGCCCATACAAAG
 GAAACATGGGAAACATGGTGGACAGAGTATTGGCAAGCCACCTGGATTCTGAGTGG
 GAGTTGTTAATACCCCTCCCTTAGTGAAATTATGGTACCAGTTAGAGAAAGAACC

ATAGTAGGAGCAGAAACCTTCTATGTAGATGGGGCAGCTAACAGGGGAGACTAAATTA
 GGAAAAGCAGGATATGTTACTAATAGAGGAAGACAAAAGTTGTCACCCTAACTGAC
 ACAACAAATCAGAAGACTGAGTTACAAGCAATTTATCTAGCTTTGCAGGATTCGGGA
 TTAGAAGTAAACATAGTAACAGACTCACAATATGCATTAGGAATCATTCAAGCACAA
 CCAGATCAAAGTGAATCAGAGTTAGTCAATCAAATAATAGAGCAGTTAATAAAAAAG
 GAAAAGGTCTATCTGGCATGGGTACCAGCACACAAAGGAATTGGAGGAAATGAACAA
 GTAGATAAATTAGTCAGTGCTGGAATCAGGAAAGTACTATTTTTAGATATGGTGGGT
 TTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT
 CTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAAAGA
 AGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGG
 CAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTAC
 AAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACC
 AGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTA
 GAGTGGAGGTTTGACAGCCACCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCG
 GAGTACTTCAAGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 66]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 LDKIEEEQNK SKKKAQQA AA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPQMRE PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSPT SILDIRQGP K EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQNANPDC KTIKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETVSVKLPKPG MDGPKVKQWP LTBEEKIKALV
 EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ
 DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 NNETPGIRYQ YNVLPQGWKG SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDI VIYQYMD
 DLYVGS DLEI GQHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPKKHQKEP PFLWMGYELH
 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGIK VRQLCKLLRG
 TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IAEIQKQGQG
 QWTYQIYQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIVIWGK
 TPKFKLPIQK ETWETWTEY WQATWIPEWE FVNTPLVLK WYQLBKEPIV
 GAETFYVDGA ANRETKLGKA GYVTNRGRQK VVTLTDTTNQ KTELQAIYLA
 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAQPQSES ELVNQIIEQL IKKEKVYLA W
 VPAHKGIGGN EQVDKLV SAG IRKVLFLDMV GFPVTPQVPL RPFMYKAAVD
 LSHFLKEKGG LEGLIHSQRR QDILDWYIH TQGYFPDQON YTPGPGVRY P
 LTFGW CYKLV PVEPKVEEA NKGENTSLLH PVSLHGMDDP EREVLEWRFD
 SHLAFHHVAR ELHPEYFKNC *
 [SEQ ID NO: 67]

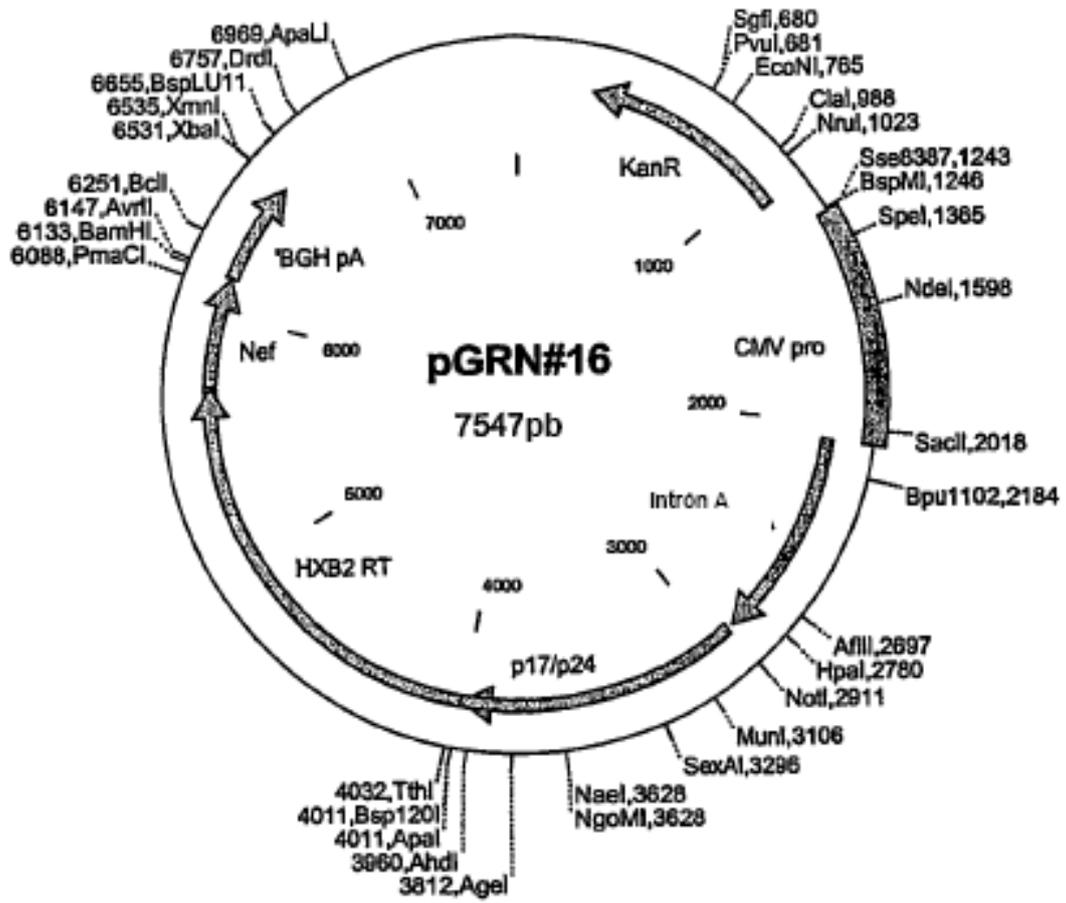


Figura 11

Secuencia del inserto p17/p24(opt)/RT(opt)trNef en p73i-GRN2:

ATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGA
 GAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCAT
 ATCGTGTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCT
 GCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCAT
 CCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCTTGTATAACACAGTGGCT
 ACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGC
 CTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAG
 CAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCC
 TATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCC
 GGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCT
 GAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGAC
 CTC AATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAT
 GTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCAT
 CCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGG
 CTCTGACATTGCCGGCACCACTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGA
 TGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCACA'GTACTCTCCGACATCCATCCIT
 GACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTGACCGGTT
 TTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGA
 TGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATC
 TTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTG
 TCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTTGATGGGCCCC
 ATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGG
 CCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTG
 GTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCG
 GGCCTGAGAACCATAACAACCCCCGTGTTTGCCATCAAGAAGAAGGAC
 AGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGAC
 CCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGA
 AGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGACGTTACTTCAGC
 GTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCT

ATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCOCCA
GGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCC
TGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTACATG
GACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAA
GATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGG
ACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCTGTGGATGGGCTACGAGCTC
CATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCCTCCCGAGAAGGACAG
CTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTA
GCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGC
GGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCT
CGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGT
ACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAG
GGGCAGTGGACATAACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGAC
CGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAG
CTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGG
GAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGT
GGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTCGTG
AATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCAT
CGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGCGAAACA
AAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTCACCAACCGGGGCCCGCAGAAGGTGCG
TCACCCTGACCGACACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTAT
CTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCA
GTACGCGCTGGGCATTATTCAGGCCAGCCGGACCAGTCCGAGAGCGAAC
TGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAGGTCTACCTC
GCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGACAA
GCTGGTGAGTGCGGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTCA
CACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTT
AGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCA
AAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACT
TCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTG
ACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGA
AGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGC

ATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAG
 CCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCA
 AGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 68]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 LDKIEEEQNK SKKKAQQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNTMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMRP PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSPT SILDIRQGPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANANPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETVSVKLPKPG MDGPKVKQWP LTEEKIKALV
 EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ
 DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 NNETPGIRYQ YNVLPQGWKG SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIVIQYMD
 DLYVGSLEI GQHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPKKKHQKEP PFLWMGYELH
 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGIK VRQLCKLLRG
 TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IAEIQKQGQG
 QWTYQIQYQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIWIWVK
 TPKFKLPIQK ETWETWWTEY WQATWIPEWE FVNTPLVVKL WYQLEKEPIV
 GAETFYVDGA ANRETKLGKA GYVTNRGRQK VVTLTDTTNQ KTELQAIYLA
 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAQPQSES ELVNQIEQL IKKEKVYLAW
 VPAHKGIGGN EQVDKLVSAQ IRKVLVGVFP VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
 GWCYKLVPE PDKVEEANKG ENTSLLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFDSRL
 AFHHVARELH PEYFKNC*
 [SEQ ID NO: 69]

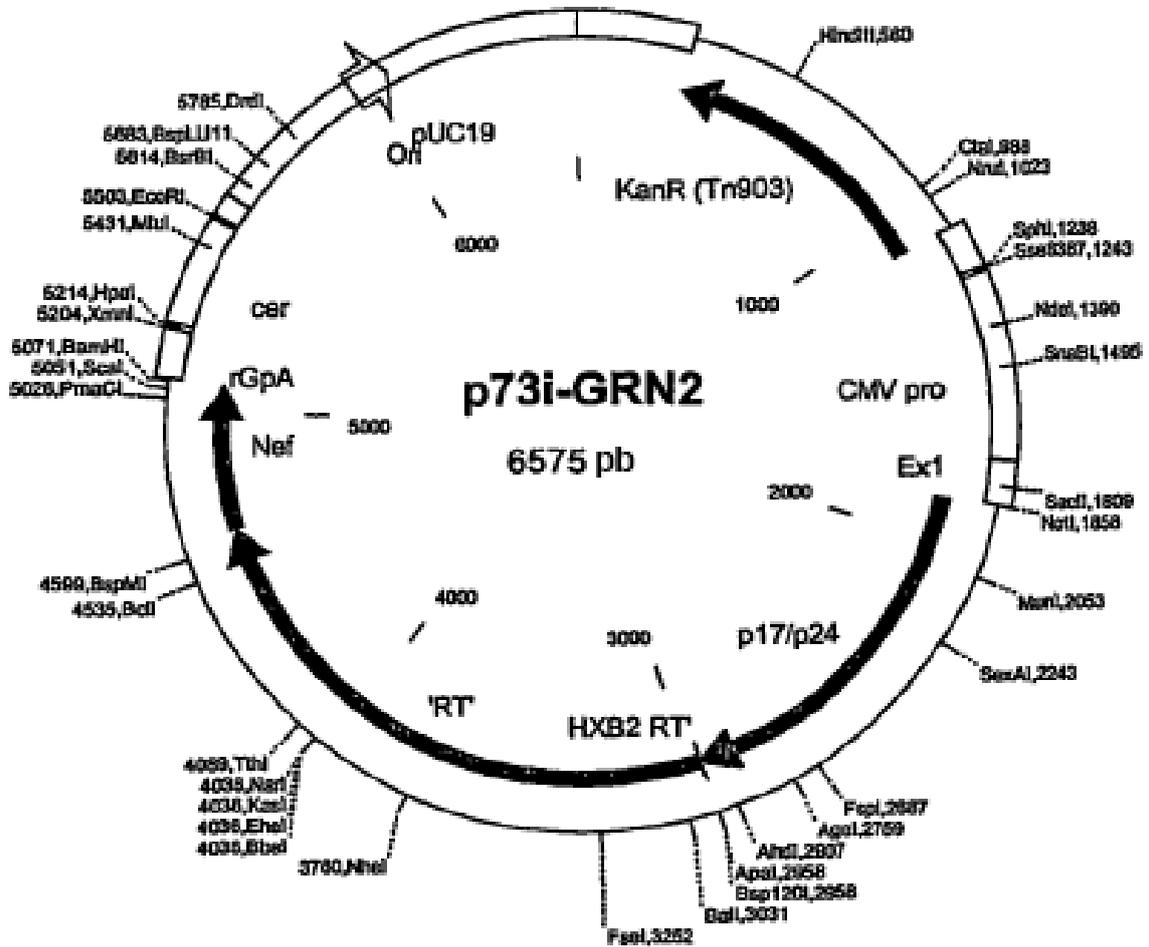


Figura 12

Secuencia del inserto p17/p24opt/trNef en p73i-GN2:

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
 AGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCG
 AGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
 CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGG
 TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
 GCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCT
 ATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACGCTC
 AATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATG
 TTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
 GTGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
 GCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATG
 CGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATC
 GGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCACTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATTCTCGGTCTCAATAAAATTGTTAGAATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC
 AAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTA
 ATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGC
 TACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACC
 TTTGGATGGTGTAGCTAGTAGTACCAGTTGAGCCAGATAGGGTAGAAGAGGCGEAT
 AAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCG
 GAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTTAGCATTTTCATCACGTGGCC
 CGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 70]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 LDKIEEBEQNK SKKKAQQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNTMLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMRE PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWII LGL NKIVRMYSP T SILDIRQPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTI LKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVL MVGFPVT PQVPLRPMTY KAAVDLSHFL KEKGGLEGLI
 HSQRRQDILD LWIYHTQGYF PDWQNYTPGP GVRYP LTFGW CYKLVVPEPD
 KVEEANKGEN TSL LHPVSLH GMDDPEREVL EWRFD SRLAF HHVARELHPE
 YFKNC* [SEQ ID NO: 71]

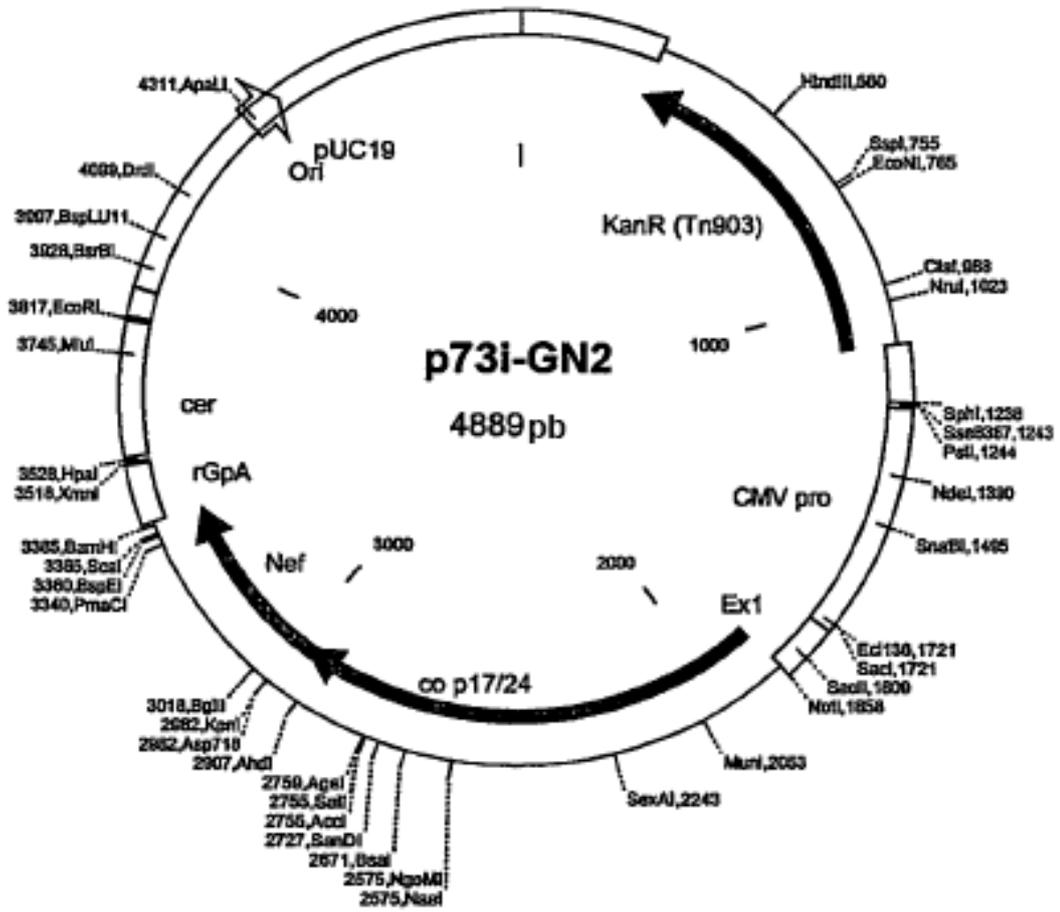


Figura 13

Secuencia de RT w229k:

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCC
 CAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCA¹CCG
 AGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCATAACAACCCCCGTG
 TTTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGGCGAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAA
 TAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGCATCCCCATCCGGCOGGCCTGAAGA
 AGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAG
 GACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAG
 ATATCAGTACAACGTCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCA
 TGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTACATG
 GACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGA²AATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCT
 GAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGC
 CATTCT³gaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCCTC
 CCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGC
 TAGCCAGATCTATCCCGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGG
 CCCTGACCGAGGTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCOGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAG
 ATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAAT
 CCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCA
 AGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAG
 GCCGTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCT
 GCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATT⁴C
 CCGAGTGGGAGTTCTGTAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAG
 CCCATCGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGGAAACAAAGCTCGG
 GAAGGCCGGGTACGTACCAACCGGGGCCGCCAGAAGGTCTCACCCCTGACCGACACCACCA
 ACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAAC
 ATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATT⁵CAGGCCAGCCGGACCAAGTCCGAGAG
 CGAACTGGTGAACCAGAT⁶TATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGG

TCCCGGCCCATAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTCGACAAGCTGGTGAGTGCGGGGATT
 AGAAAGGTGCTGTAA [SEQ ID NO: 72]

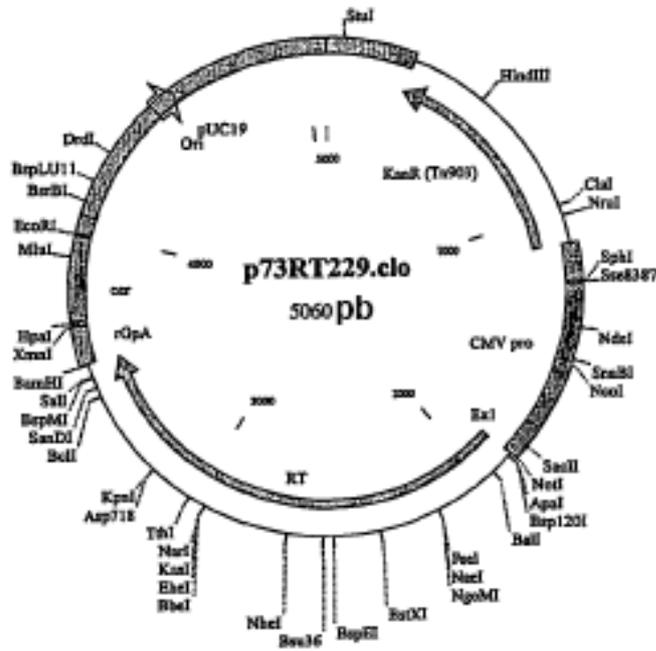
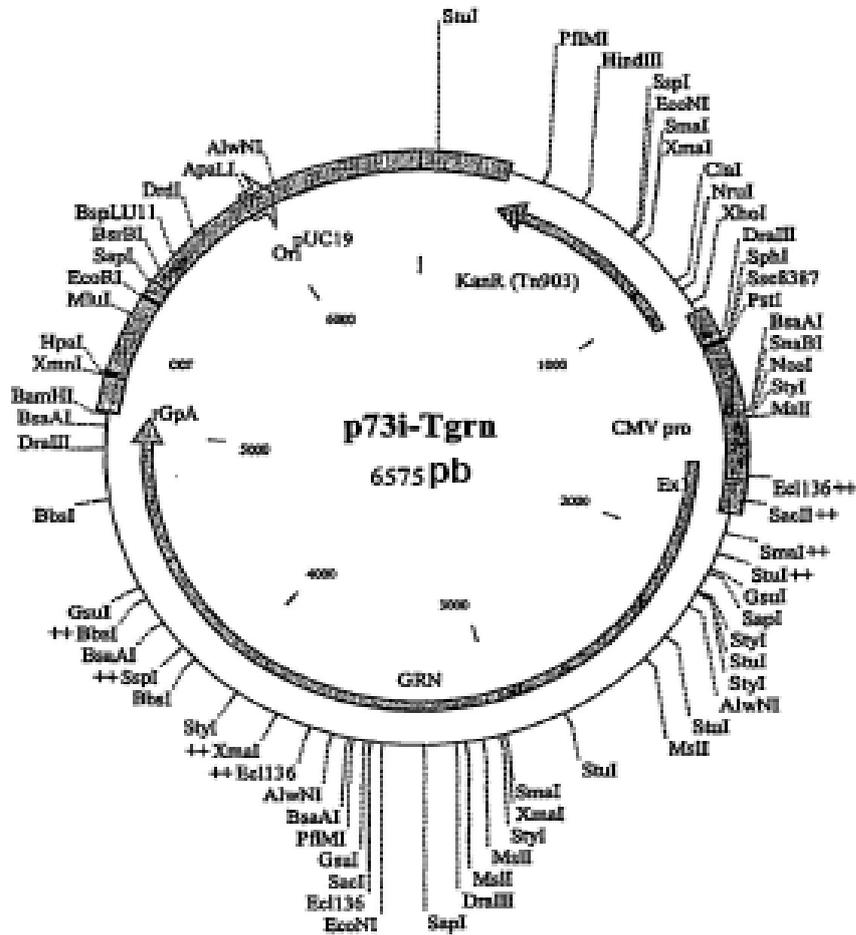


Figura 14



Secuencia:

```

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
AGGCTGCGCCCGGGAGGC AAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGCCCTCG
AGGGAGCTTGAACGGTFTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGG
TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
GCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCT
ATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTC
AATGCCTGGGTGAAGGTGTGCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATG
TTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
GTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
GCCGAGTGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATG
CGGGAGCCTCGCGCTCTGACATTGCCGGCACCACTCTACACTGCAAGAGCAAATC
GGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
    
```

ATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGGCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGG
 ATGGACGGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTG
 GTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAG
 AACCCATAACAACACCCCGTGTTTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCGC
 AAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAG
 CTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGAC
 GTGGGCGACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCC
 TTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTC
 CTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATC
 CTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGAC
 CTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTG
 AGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAG
 CCGCCATTCCTGaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCT
 ATCGTCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGC
 AAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAG
 CTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCTCACGGAGGAAGCCGAG
 CTCGAGCTGGCTGAGAACC GGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGACGGCGTGTACTAT
 GACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACA
 TACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCAGATG
 AGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACG
 ACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTC AAGCTGCCATCCAGAAG
 GAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGG
 GAGTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCC
 ATCGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTC
 GGAAGGCCGGGTACGTACCAACCGGGCCGCCAGAAGGTCGTCACCCTGACCGAC
 ACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGC
 CTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTAGGCCCAG
 CCGGACCAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAA
 GAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAG
 GTCGACAAGCTGGTGAAGTGCGGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTC
 ACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCAC
 TTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTC ACTCCCAAAGAAGACAAGAT
 ATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGA ACTAC
 ACACCAGGGCCAGGGT CAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTA
 CACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGT TAGAGTGGAGG
 TTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTC
 AAGA ACTGCTGA [SEQ ID NO: 73]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYY LKHIVWASRE LERFAVNPGL
 LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
 LDKIEEEQNK SKKKAQQAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
 TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMTLNT VGGHQAMQM
 LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMR E PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
 TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSPT SILDIRQGPK EPFRDYVDRF
 YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANANPDC KTILKALGPA ATLEEMMTAC
 QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETVSVKLGPG MDGPKVKQWP LTEEKIKALV
 EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ
 DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
 NNETPGIRYQ YNVLPQGKWK SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIVIQYMD
 DLYVGSLEI GQHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPKKHQKEP PFLWMGYELH
 PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGIK VRQLCKLLRG
 TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IAEIQKQGQG
 QWTYQIQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIVIWGK
 TPKFKLPIQK ETWETWTEY WQATWIPWEV FVNTPLVVKL WYQLEKEPIV
 GAETFYVDGA ANRETKLGKA GYVTNRGRQK VVTLTDTTNQ KTELQAIYLA
 LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAQPQSES ELVNQIIEQL IKKEKVYLA
 VPAHKGIGGN EQVDKLVSAG IRKVLVVGFP VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
 GWCYKLVPE PDKVERANKG ENTSLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFDSRL
 AFHHVARELH PEYFKNC*
 [SEQ ID NO: 74]

Figura 15

Secuencia de Tnrg:

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCA
 GCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTAC
 TCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTC
 CCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGA
 TGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGGCCAATAAAGGA
 GAGAACCACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGA
 GAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAG
 CTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTG
 CCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACC
 GAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCAGATGGAGAAAGAGGGCAAG
 ATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCATAACAACCCCCGTGTTTGCCATCAAGAAG
 AAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACC
 CAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAG
 AAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAG
 GACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGC
 ATCAGATATCAGTACAACGTCCCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTC
 CAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTC
 ATCTACCAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCAT
 CGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCG
 GACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCTGaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCC
 GACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCCCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAAC
 GACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATC
 AAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGCGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATT
 CCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCTGAAGGAG
 CCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAG
 CAGGGCCAGGGCAGTGGACATACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAG
 ACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACC
 GAGGCCGTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAG
 TTCAAGCTGCCATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAG
 GCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTCTGTAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGG
 TACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTGGGCGCGGAGACATTTCTACGTGGACGGCGCG
 GCCAACCGGAAACAAGCTCGGGAAAGGCCGGGTACGTACCAACCGGGGCCGCCAG
 AAGGTCGTACCCCTGACCGACACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTAT
 CTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCG
 CTGGGCATTATTCAGGCCAGCCGGACAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATT
 ATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAG
 GGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGACAAGCTGGTGGAGTGGGGGATTAGAAAGGTG
 CTGATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAA
 ATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCC
 TCGAGGGAGCTTGAACGTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGA
 TGTCGCCAGATCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTG
 AAGTCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATT

AAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAG
 AAGGCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTAT
 CCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACG
 CTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTGCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCC
 ATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAAT
 ACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAG
 GCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAG
 ATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAA
 ATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGG
 ATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGAC
 ATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACC
 CTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTG
 GTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCC
 ACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCC
 AGAGTGTGTGA [SEQ ID NO: 75]

MVGFPVTPQV	PLRPMTYKAA	VDLSHFLKEK	GGLEGLIHSQ	RRQDILDWI
YHTQGYFPDW	QNYTPGPGVR	YPLTFGWCYK	LVPVBPDKVE	EANKGENTS
LHPVSLHGMD	DPEREVLEWR	FDSRLAFHHV	ARELHPEYFK	NCMGPISPIE
TVSVKPKPGM	DGPKVKQWPL	TEEKIKALVE	ICTEMEKEGK	ISKIGPENPY
NTPVFAIKKK	DSTKWRKLV	FRELNRKTD	FWEVQLGIPH	PAGLKKKSV
TVLDVGDYF	SVPLDEDFRK	YTAFTIPSIN	NETPGIRYQY	NVLPQGWKGS
PAIFQSSMTK	ILEPFRKQNP	DIVIYQYMD	LYVGSLEIG	QHRTKIRELR
QHLLRWGLTT	PDKKHQKEPP	FLWMGYELHP	DKWTVQPIVL	PEKDSWTVND
IQKLVGKLNW	ASQIYPGIKV	RQLCKLLRGT	KALTEVIPLT	EEABLELAEN
REILKEPVHG	VYDPSKDLI	AEIQKQGQGO	WTYQIQEPP	KNLKTGKYAR
MGAHTNDVK	QLTEAVQKIT	TESIVIWGKT	PKFKLPIQKE	TWETWTEYW
QATWIPEWBF	VNTPLVLKLV	YQLEKEPIVG	AETFYVDGAA	NRETKLGKAG
YVTNRGRQKV	VTLTDTTNQK	TELQAIYLAL	QDSGLEVNIV	TDSQYALGII
QAQPDQSESE	LVNQIIEQLI	KKEKVYLAV	PAHKGIGGNE	QVDKLVSAGI
RKVLMGARAS	VLSGGELDRW	EKIRLRPGGK	KKYKLKHIVW	ASRELERFAV
NPGLLETSEG	CRQILGQLQP	SLQTGSEELR	SLYNTVATLY	CVHQRIEIKD
TKEALDKIEE	EQNKSKKKAQ	QAAADTGHSN	QVSQNYPIVQ	NIQGMVHQA
ISPRTLNAWV	KVVEEKAFSP	EVI PMFSALS	EGATPQDLNT	MLNTVGGHQA
AMQMLKETIN	EEAAEWDRVH	PVHAGPIAPG	QMREPRGSDI	AGTTSTLQEQ
IGWMTNPPPI	PVGEIYKRWI	ILGLNKIVRM	YSPTSILDIR	QGPKEPFRDY
VDRFYKTLRA	EQASQEVKNW	MTETLLVQNA	NPDCKTILKA	LGPAATLEEM

MTACQGVGGP GHKARVL* [SEC ID N° 76]

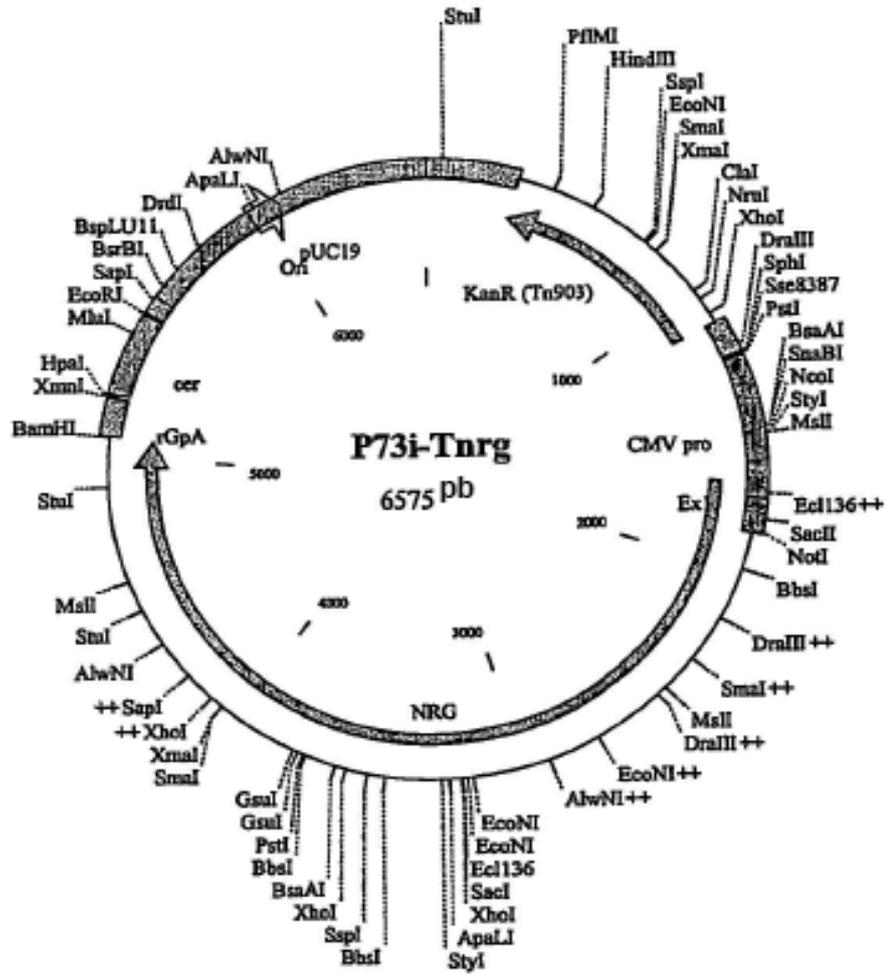


Figura 16

Secuencia del inserto Tngr en p7313ie:

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGT
 AGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAAAGAA
 GACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAAC
 TACACACCAGGGCCAGGGGT CAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACC
 AGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTG
 TGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGC
 CTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGTGC
 CCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGG
 GAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTT
 GCCGTGAACCCAGGCCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCA
 GCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCT
 ACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATAACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAG
 GAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCA
 GGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCA
 GCCCCCGGACGCTCAATGCOCTGGGTGAAGGTGTGOGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTT
 ATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAA
 TACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAG
 CCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAG
 CCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGAC
 CAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACCGTGGATCATCCTGGGCCTGAACA
 AGATCGTGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCT
 TTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGT
 CAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACTAACCCTCGACTGCAAAAACATCT
 TGAAGGCACTAGGCCCCGGCTGCCACCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGC
 GGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGT
 GAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGA
 TCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGG
 CCTGAGAACCCATACAACACCCCGTGTGTTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCG
 CAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGG
 GCATCCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTGACGTTGGGCGAC
 GCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATC
 TATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCCAGGGCTGGAAGG
 GCTCTCCCGCCATTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCCGAAGCAGAAC
 CCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGG
 GCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCTGACCACTC
 CGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCCTGaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCAGAC
 AAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCA
 GAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGC
 TCTGCAAGCTGCTGCGCGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCC
 GAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGA
 CCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGAGTGACATACCAGA
 TTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCAC

ACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCAGAAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGAT
 CTGGGGGAAGACACCCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGG
 CCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTG
 AAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGG
 CGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAAGGCGGGTACGTCACCAACCGGGGCGCCAGA
 AGGTCGTCACCCTGACCGACACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCT
 CTCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTAT
 TCAGGCCCGAGCCGACCAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCA
 AGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAG
 GTCGACAAGCTGGTGAGTGGGGGATTAGAAAGGTGCTGTAA [SEQ ID NO: 77]

MVGFPVTPQV PLRPMTYKAA VDLSHFLKEK GGLEGLIHSQ RRQDILDLWI
 YHTQGYFPDW QNYTPGPGVR YPLTFGWCYK LVPVEPKVE EANKGENTSL
 LHPVSLHGMD DPEREVLEWR FDSRLAFHHV ARELHPEYFK NCMGARASVL
 SGGELDRWEK IRLRPGGKKK YKLKHIVWAS RELERFAVNP GLEETSEGCR
 QILGQLQPSL QTGSEELRSL YNTVATLYCV HQRIEIKDTK EALDKIEEEQ
 NKSKKKAQQA AADTGHSNQV SQNYPIVQNI QGQMVHQAIS PRTLNAWVKV
 VEEKAFSPEV IPMFSALSEG ATPQDLNIML NTVGGHQAAM QMLKETINEE
 AAEDRVHPV HAGPIAPGQM REPRGSDIAG TTSTLQEQIG WMTNNPPIPV
 GEIYKRWILL GLNKIVRMY SPTSILDIRQG PKEPFRDYVD RFYKTLRAEQ
 ASQEVKNWMT ETLVQANANP DCKTILKALG PAATLEEMMT ACQGVGGPGH
 KARVLMGPIS PIETVSVKLK PGMDGPKVKQ WPLTEBKIKALVEICTEMEK
 EGKISKIGPE NPYNTPVFAI KKKDSTKWRK LVDFRELNKR TODFWEVOLG
 IPHPAGLKKK KSVTVLDVGD AYFSVPLDED FRKYTAFTIP SINNETPGIR
 YQYNVLPQGW KGSPAIFQSS MTKILEPFRK QNPDIVIYQY MDDLTVGSDL
 EIQHRTKIE ELRQHLLRWG LTPDKKHQK EPPFLWNGYE LHPDKWTVQP
 IVLPEKDSWT VNDIQKLVGK LNWASQIYPG IKVRQLCKLL RGTKALTEVI
 PLTEEALEL AENREILKEP VHGVYYDPSK DLIAEIQKQG QGQWYQIYQ
 EPFKNLKTGK YARMRGAHTN DVKQLTEAVQ KITTESIVIW GKTPKFKLPI
 QKETWETWWT EYWOATWIPE WEFVNTPLV KLWYQLEKEP IVGAETFYVD
 GAANRETKLG KAGYVTNRGR QKVVTLTDIT NQKTELQAIY LALQDSGLEV
 NIVTDSQYAL GIIQAQPDQS ESELVNOIIE QLIKKEKYYL ANVPAHKGIG
 GNEQVDKLV SAGIRKVL*

[SEQ ID NO: 78]

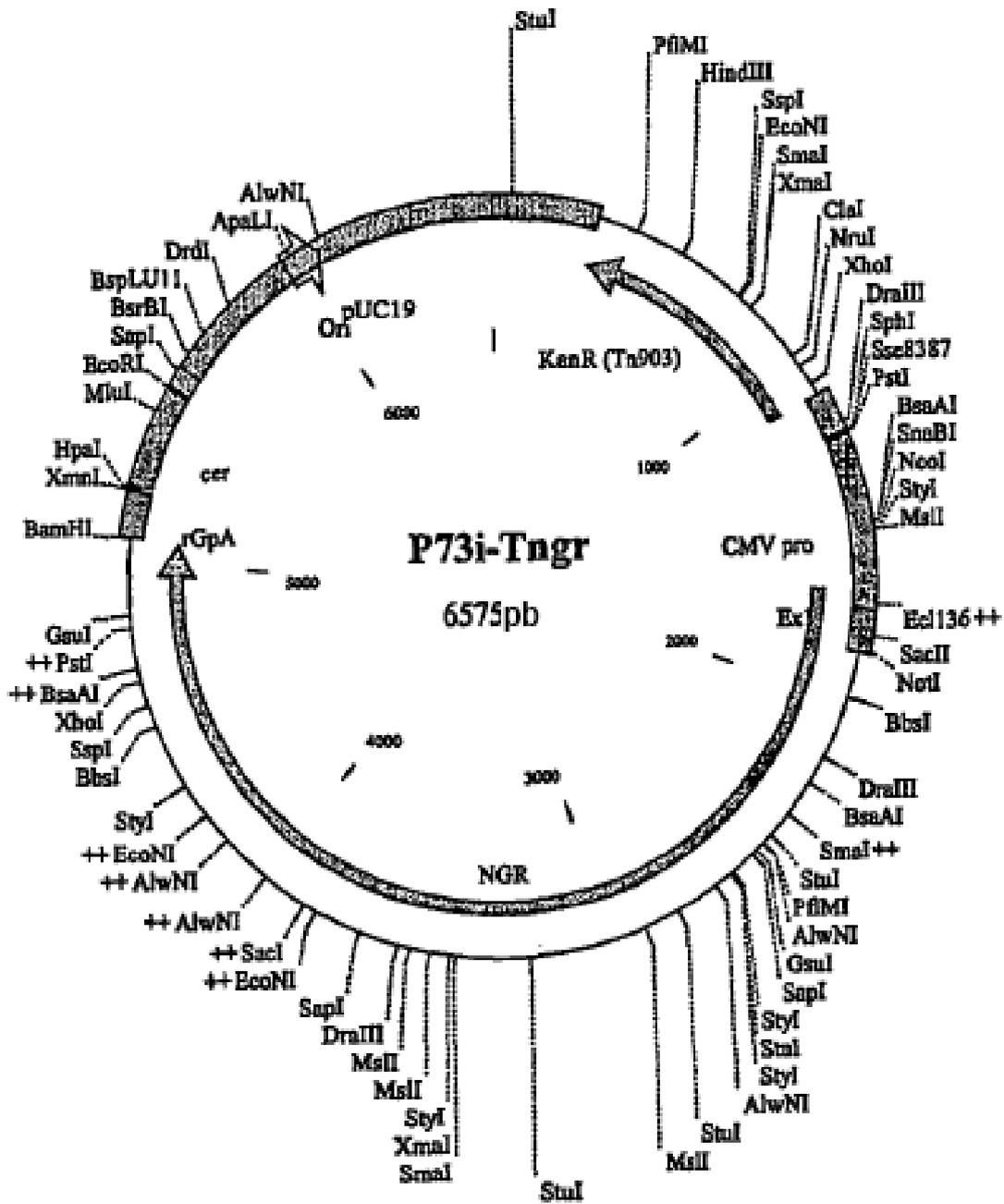


Figura 17

Secuencia del inserto Trgn n° 6

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGAC
 GGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAG
 ATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCCA
 TACAACACCCCGTGTGTTGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTG
 GTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGC
 ATCCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGC
 GACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACC
 ATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCC
 CAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAG
 CCGTTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTAC
 GTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAG
 CATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCA
 TTCTTgaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTC
 CTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTC
 AACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTG
 CGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAG
 CTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCC
 TCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATAACAG
 ATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACC'TCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGC
 GCCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACGACCGAG
 TCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACC
 TGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCAGTGGGAGTTC
 GTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTG
 GCGCGGACACATTCTACCTCCACCGCCCGGCCAACCCCGAAACAAACCTCCGGAG
 GCCGGGTACGTACCAACCGGGGCCCGCAGAAGGTCGTCACCCCTGACCGACACCACC
 AACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAG
 GTGAACATCGTGACCGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTACAGGCCAGCCGGAC
 CAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAG
 GTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGAC
 AAGCTGGTGAGTGCGGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTG
 TCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAG
 AAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTG
 AACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAG
 CCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCPTGTATAACACAGTGGCTACC
 CTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAA
 ATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACT
 GGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTACAGGGCCAG
 ATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGT'TGTGAA
 GAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAAGGGGCC
 ACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATG

CAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCC
 GTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATT
 GCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCC
 ATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTG
 CGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTT
 AGGGATTACGTCGACCCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAG
 GTCAAAAAGTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAA
 ACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGT
 CAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTTGATGGTGGGTTTTCCAGTC
 ACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCAC
 TTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACTCCCAAAGAAGACAAGAT
 ATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTAC
 ACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTA
 CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTA
 CACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGG
 TTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTC
 AAGAACTGCTGA [SEQ ID NO: 79]

MGPISPIETV SVKCLKPGMDG PKVKQWPLTE EKIKALVEIC TEMEKEGKIS
 KIGPENPYNT PVFAIKKKDS TKWRKLVDFR ELNKRTQDFW EVQLGIPHPA
 GLKKKKSVTV LDVGDAYFSV PLDEDFRKYT AFTIPSINNE TPGIRYQYNV
 LPQGWKGSFA IFQSSMTKIL EPFRKQNPDI VIYQYMDDL YVSDLEIGQH
 RTKIEBLRQH LLRWGLTTPD KKHQKEPPFL WMGYELHPDK WTVQPIVLPE
 KDSWTVNDIQ KLVGKLNWAS QIYPGIKVRQ LCKLLRGTKA LTEVIPLTEE
 AELELAENRE ILKEPVHGVY YDPSKDLIAB IQKQGQGWY YQIYQEPFKN
 LKTGKYARMR GAHTNDVKQL TEAVQKITTE SIVINGKTPK FKLPIQKETW
 ETWTEYWQA TWIPEWBFVN TPPLVKLWYQ LEKEPIVGAE TFYVDGAANR
 ETKLGKAGYV TNRGRQKVVT LTDTTNQKTE LQAIYLALQD SGLEVNIVTD
 SQYALGIIQA QPDQSESELV NQIEQLIKK EKVYLAWVPA HKGIGGNEQV
 DKLVSAGIRK VLMGARASVL SGGELDRWEK IRLRPGGKKK YKLKHIVWAS
 RELERFAVNP GLEETSEGCR QILGQLQPSL QTGSEELRSL YNTVATLYCV
 HQRIBIKDTK EALDKIEBEQ NKSKKKAQQA AADTGHSNQV SQNYPIVQNI
 QGQMVHQAIS PRTLNAWVKV VEEKAFSPEV IPMFSALSEG ATPQDLNMTL
 NTVGGHQAM QMLKETINEE AAEWDRVHPV HAGPIAPGQM REPRGSDIAG
 TTSTLQEQIG WMTNNPPIPV GEIYKRWIIIL GLNKIVRMYS PTSILDIRQG
 PKEPFRDYVD RPYKTLRAEQ ASQEVKNWMT ETLLVQANANP DCKTILKALG
 PAATLEEMMT ACQGVGGPGH KARVLMVGFP VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF

GWCYKLVPE PDKVEEANKG ENTSLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFDSRL
 AFHHVARELH PEYFKNC * [SEC ID N° 80]

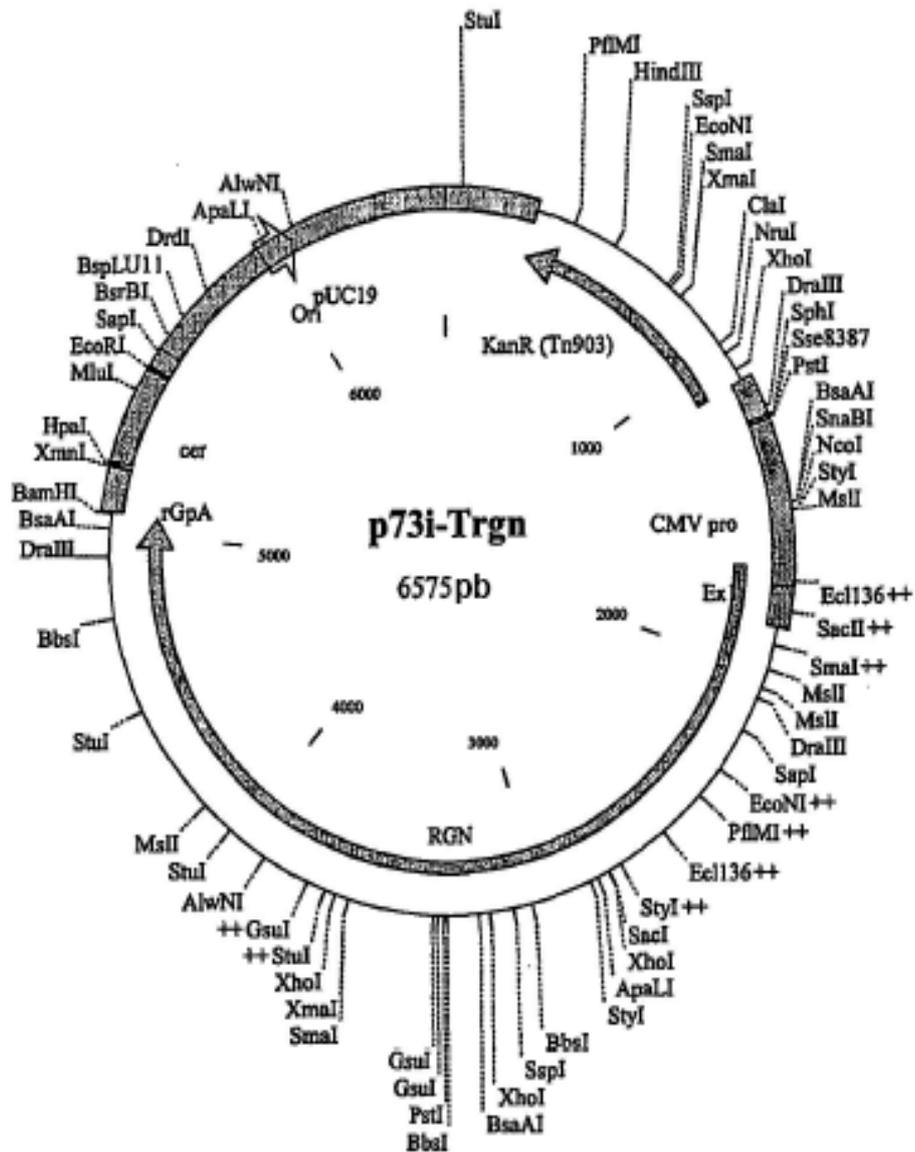


Figura 18

Secuencia del inserto de Trgn nº 11

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGAC
 GGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAG
 ATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCGGAGAACCCA
 TACAACACCCCCGTGTTTGGCCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTG
 GTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGC
 ATCCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGC
 GACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACC
 ATCCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCCCC
 CAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAG
 CCGTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTAC
 GTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAG
 CATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCA
 TTCCTgaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTC
 CTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTC
 AACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTG
 CGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAG
 CTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCCTGCACGGCGTGTACTATGACCCC
 TCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATAACAG
 ATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCC GCATGAGGGGC
 GCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCGCTCCAGAAGATCACGACCGAG
 TCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACC
 TGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTC
 GTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTG
 GCGCGGAGACATTTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAAG
 GCCGGGTACGTACCAACCGGGGCCCGCCAGAAGGTCGTCACCCTGACCGACACCACC
 AACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAG
 GTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTATTAGGCCAGCCGGAC
 CAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAG
 GTCTACCTCGCCTGGGTCCC GGCCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGAC
 AAGCTGGT GAGTGC GGGGATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTACACCT
 CAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAA
 AAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTTACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTT
 GATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGA ACTACACACCA
 GGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTT
 GAGCCAGATAAGGTAGAAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCT
 GTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGAC
 AGCCGCCTAGCATTTTCATCACGTGGCCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAC
 TGCTGAATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAG
 AAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCCAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGG
 GCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTTGCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAG
 GGATGTGCGCAGATCCTGGGGCAATGTCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAG
 CTGAGGTCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAG

ATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAG
 AAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAAC
 TATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGG
 ACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATC
 CCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTT
 AATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAG
 GAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCCGA
 CAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCCACTCTACACTGCAAGAG
 CAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGG
 TGGATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTT
 GACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAG
 ACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACTC
 CTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCT
 GCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAA
 GCCAGAGTGTG [SEQ ID NO: 81]

MGPISPIETV SVKCLKPGMDG PKVKQWPLTE EKIKALVEIC TEMEKEGKIS
 KIGPENPYNT PVFAIKKDS TKWRKLVDFR ELNKRTQDFW EVQLGIPHPA
 GLKKKKSQTV LDVGDAYFSV PLDEDFRKYT AFTIPSINNE TPGIRYQYNV
 LPQGWKQSPA IFQSSMTKIL EPFRKQNPDI VIYQYMDDLY VGSLEIGQH
 RTKIEELRQH LLRWGLTTPD KKHQKEPPFL WMGYELHPDK WTVQPIVLPE
 KDSWTVNDIQ KLVGKLNWAS QIYPGIKVRQ LCKLLRGTKA LTEVIPLTEE
 AELELAENRE ILKEPVHGVY YDPSKDLIAB IQKQGQGWY YQIYQEPFKN
 LKTGKYARMR GAHTNDVKQL TEAVQKITTE SIVIWGKTPK FKLPIQKETW
 ETWWTYEQA TWIPEWQFN TPPLVKLWYQ LEKEPIVGAE TFYVDGAANR
 BTKLGKAGYV TNRGRQKVVT LTDTTNQKTE LQAIYLALQD SGLEVNIVTD
 SQYALGIIQA QPDQSESELV NQIIEQLIKK EKVYLAWVPA HKGIGGNEQV
 DKLVSAGIRK VLMVGFPVTP QVPLRPMTYK AAVDLSHFLK EKGLEGLIH
 SQRRQDILD L WYHTQGYFP DWQNYTPGPG VRYPLTFGWC YKLVPVEPDK
 VEEANKGENT SLLHPVSLHG MDDPEREVLE WRFDSRLAFH HVARELHPEY
 FKNCMGARAS VLSGGELDRW EKIRLRPGGK KKYKCLKHIVW ASRELERFAV
 NPGLLETSEG CRQILGQLQP SLQGTSEELR SLYNTVATLY CVHQRIEIKD
 TKEALDKIEE EQNKSKKKAQ QAAADTGHNS QVSQNYPIVQ NIQQQMVHQA
 ISPRTLNAWV KVVEEKAFSP EVIPMFSAIS EGATPQDLNT MLNTVGGHQ
 AMQMLKETIN EEAAEWDRVH PVHAGPIAPG QMREPRGSDI AGTTSTLQEQ
 IGWMTNPPPI PVGEIYKRWI ILGLNKIVRM YSPTSILDIR QGPKEPFRDY
 VDRFYKTLRA EQASQEVKNW MTETLLVQNA NPDCKTILKA LGPAATLEEM
 MTACQGVGGP GHKARVL [SEQ ID NO: 82]

Figura 19

Secuencia de TngR (F1):

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGCTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATT
 AGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCG
 AGGGAGCTTGAACGGTTTGGCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGT
 CGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGG
 TCCTTGTATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAG
 GATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAG
 GCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCT
 ATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTC
 AATGCCTGGGTGAAGGTTGTGCGAAGAGAAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATG
 TTCTCCGCTTTGAGTGAAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACC
 GTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCA
 GCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCCGACAGATG
 CGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATC
 GGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATC
 ATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCGCATGFACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTG
 CGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTGGTA
 CAGAACGCTAACCCCGACTGCAAAACAATCTGAAGGCCTAGGCCCGGCTGCCACC
 CTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGA
 GTGTTGATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTAC
 AAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTA
 ATTCACTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGC
 TACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACC
 TTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGGCCAAT
 AAAGGAGAGAACACCAGCTTGTTACACCCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCG
 GAGAGAGAAGTGTTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCACGTGGCC
 CGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAG
 ACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCA
 CTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAG
 GGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCATAACAACCCCCGTGTTTGCCATC
 AAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAG
 CGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAG
 AAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTG
 GACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCTATCAACAACGAGACC
 CCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCC
 ATTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAAACCCGAT
 ATCGTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGG
 CAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACC
 ACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCCCTgaaGATGGGCTACGAGCTC
 CATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACC
 GTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCC
 GGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAG

GTGATTCCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTG
AAGGAGCCCCTGCACGGCGTGTACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATC
CAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATAACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAAC
CTCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAG
CTGACCGAGGCCGTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACA
CCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATAT
TGGCAGGCCACCTGGATTCCCAGTGGGAGTTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAG
CTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTGGCGCGGAGACATTCTACGTGGAC
GGCGCGGCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTACCAACCGGGGC
CGCCAGAAGGTCGTACCCTGACCGACACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCC
ATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAG
TACGCGCTGGGCATTATTCAGGCCAGCCGGACCAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAAC
CAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCC
CATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTCGACAAGCTGGTGAGTGCGGGGATTAGA
AAGGTGCTGTAA [SEQ ID NO: 83]

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIBIKDTKEA
LDKIEEBEQNK SKKKAQQA AAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMLNT VGGHQAMQM
LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMR PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
TNNPPIPVGE IYKRWIILGL NKIVRMYSP SILDIRQGP EPFRDYVDRF
YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANANPDC KTILKALGPA ATLEMMTAC
QGVGGPGHKA RVL MVGFPVT PQVPLRPMTY KAAVDLSHFL KEKGGLEGLI
HSQRRQDILD LWIYHTQGYF FDWQNYTFGP GVRYP LTFGW CYKLVFV BFD
KVEEANKGEN TSL LHPVSLH GMDDPEREVL EWRFD SRLAF HHVARELHPE
YFKNCMGPIS PIETVSVK LK PGMDGPKVKQ WPLTEEKIKA LVEICTEMEK
EGKISKIGPE NPYNTPVFAI KKKDSTKWRK LVDFRELNKR TQDFWEVQLG
IPHPAGLKKK KSVTVLDVGD AYFSVPLDED FRKYTAFTIP SINNETPGIR
YQYNVLPQGW KGSPAIFQSS MTKILEPFRK QNPDIYIYQY MDDL YVGS DL
EIQHRTKIE ELRQHLLRWG LTPDKKHQK EPPFLWMGYE LHPDKWTVQP
IVLPEKDSWT VNDIQKLVGK LNWASQIYPG IKVRQLCKLL RGTKALTEVI
PLTEEALEL AENREILKEP VHG VYYDPSK DLIABIQKQG QGQWTYQIYQ
EPFKNLKTGK YARMRGAHTN DVKQLTEAVQ KITTESIWIW GKTPKFKLPI
QKETWETWWT EYWQATWIPE WEFVNTPLV KLWYQLEKEP IVGAETFYVD
GAANRETKLG KAGYVTNRGR QKVVTLTDTT NQKTELQAIY LALQDSGLEV
NIVTDSQYAL GIIQAQPDQS ESELVNQIIE QLIKKEKVYL AWPVPAHKIGIG
GNEQVDKLV S AGIRKVL*

[SEQ ID NO: 84]

Figura 20.

Respuestas al péptido Gag medidas usando Elispot: IFN-gamma a los 5 días del refuerzo

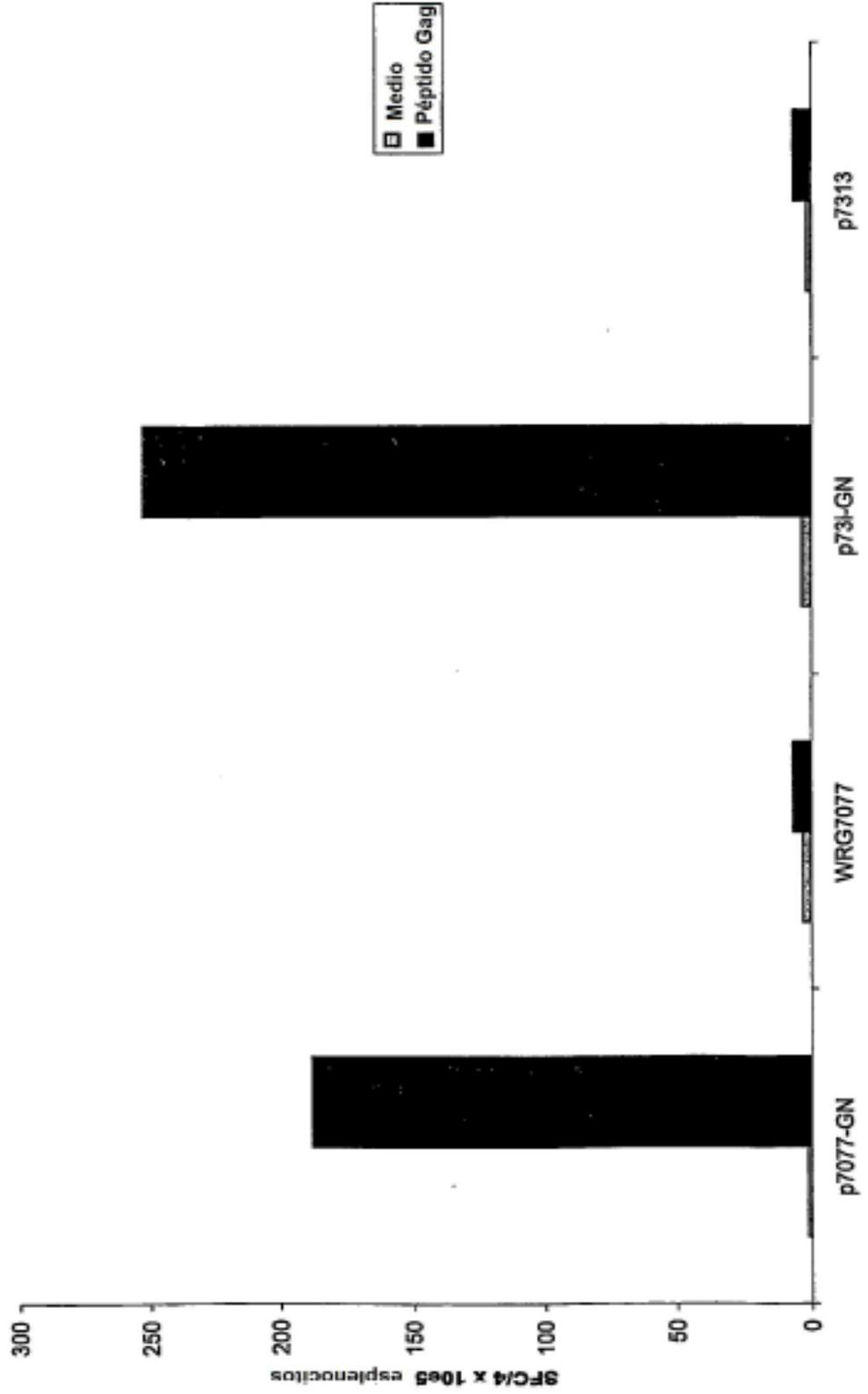
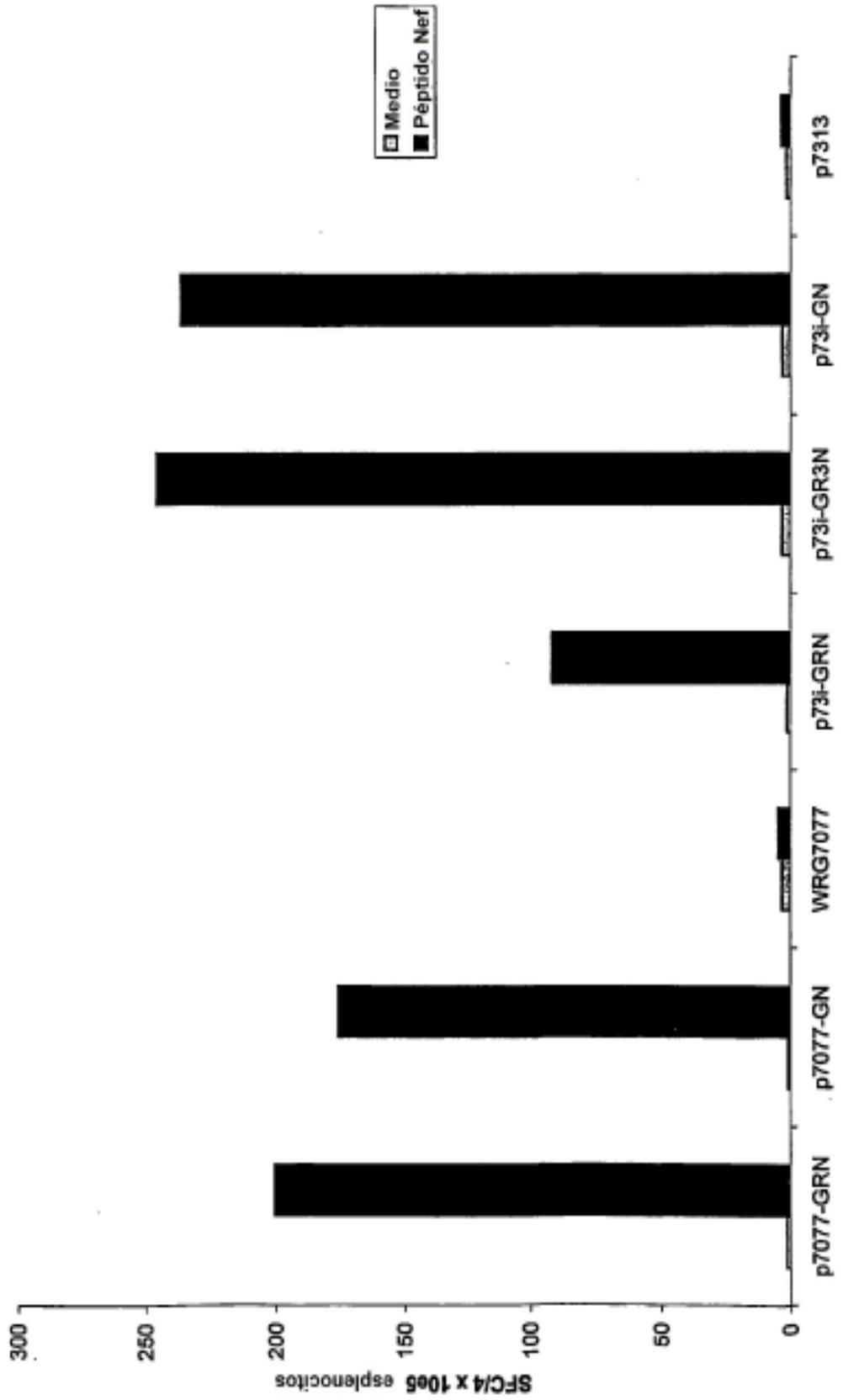


Figura 21

Respuestas al péptido Nef usando ELIspot-IFN-gamma medidas a los 5 días del refuerzo



PG4653

Figura 22.

Respuestas al péptido Rt medidas mediante ELISpot-IFN- gamma a los 5 días del refuerzo

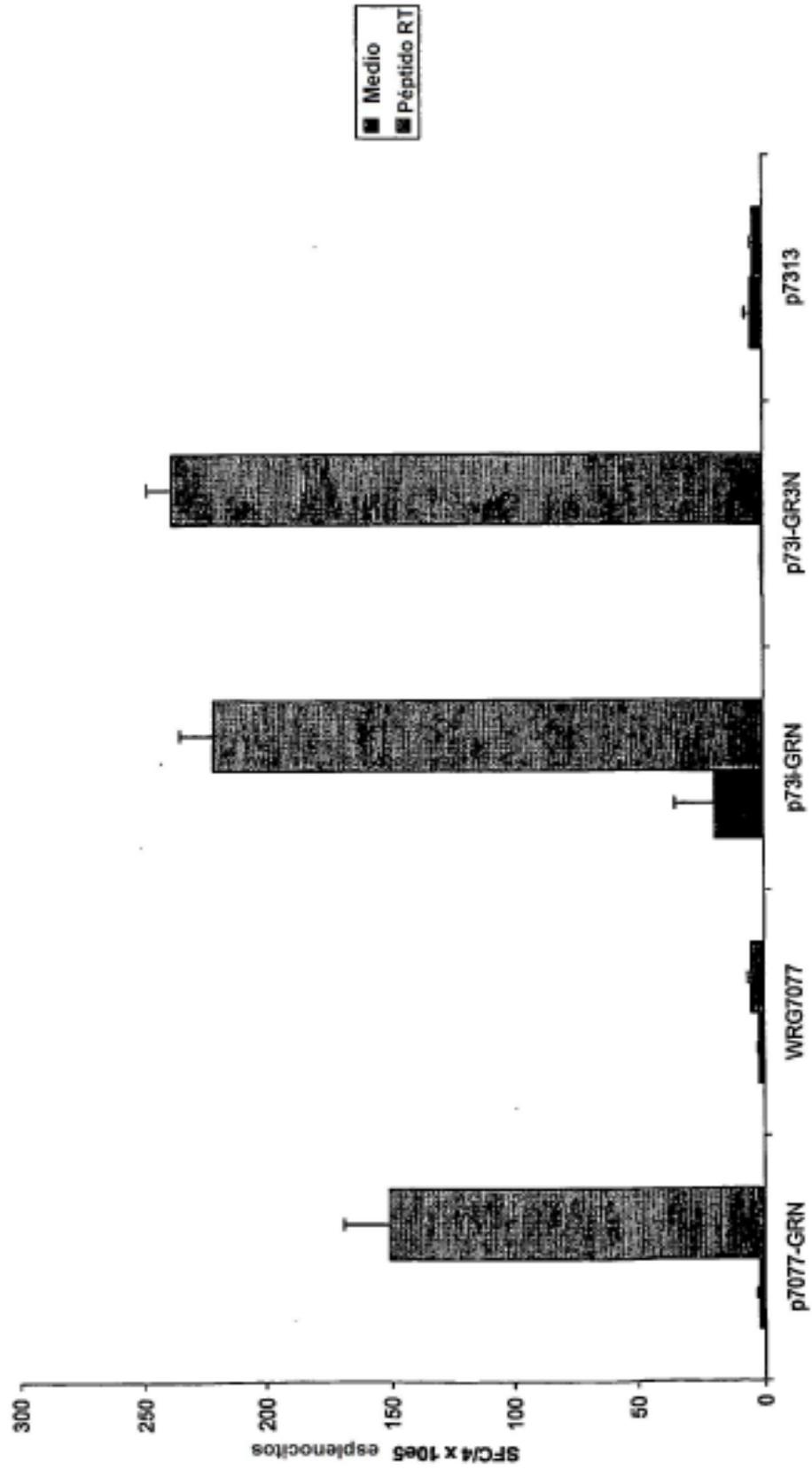
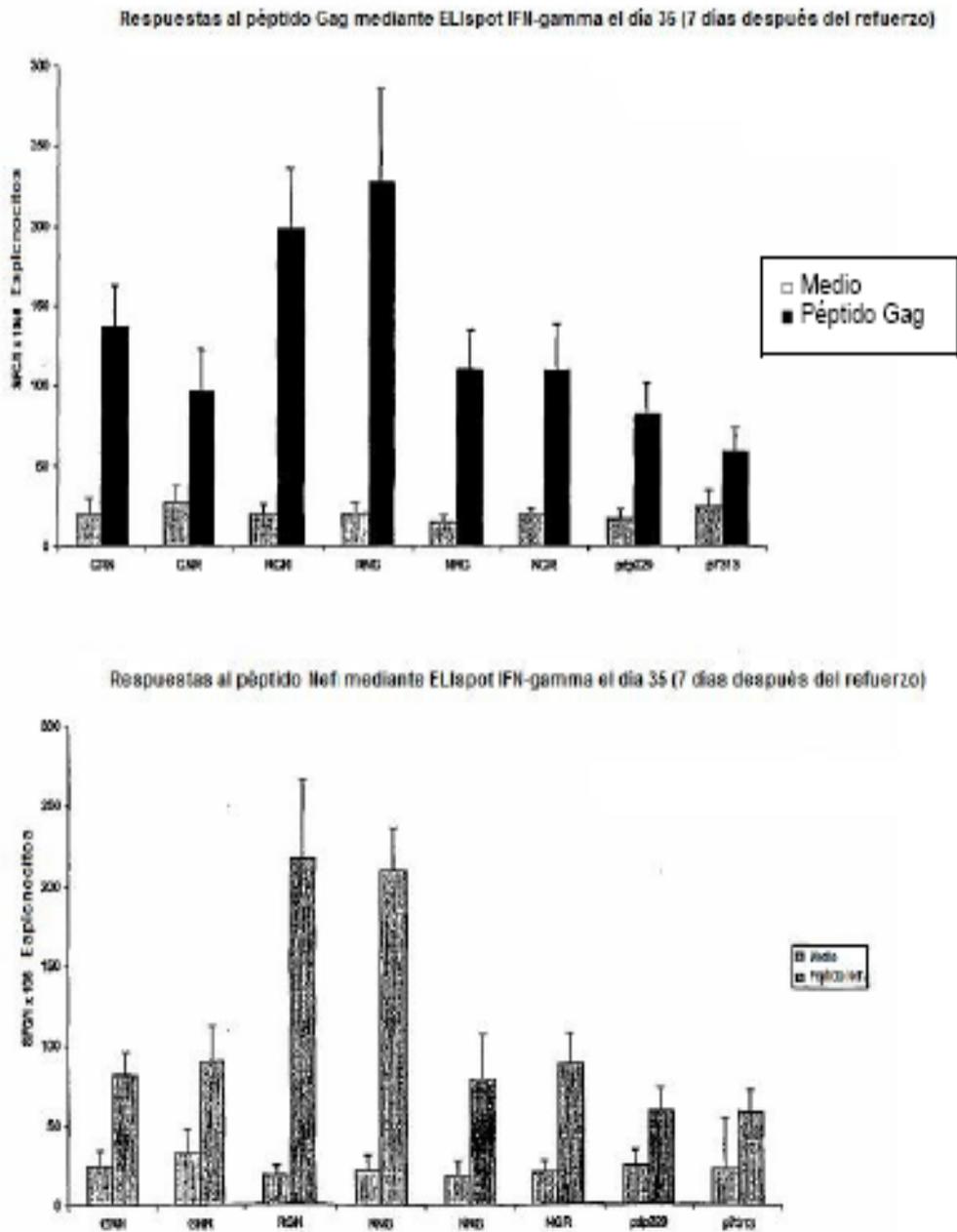


Figura 23

Ejemplo de la respuesta inmunitaria CD8 que se detecta en el modelo de ratón tras la inmunización con las construcciones reconfiguradas. Las construcciones comprenden Gag, RT y Nef como condensación triple. G es Gag, R es RT y N es Nef.



Respuestas al péptido RT mediante ELISpot IFN-gamma el día 35 (a los 7 días del refuerzo)

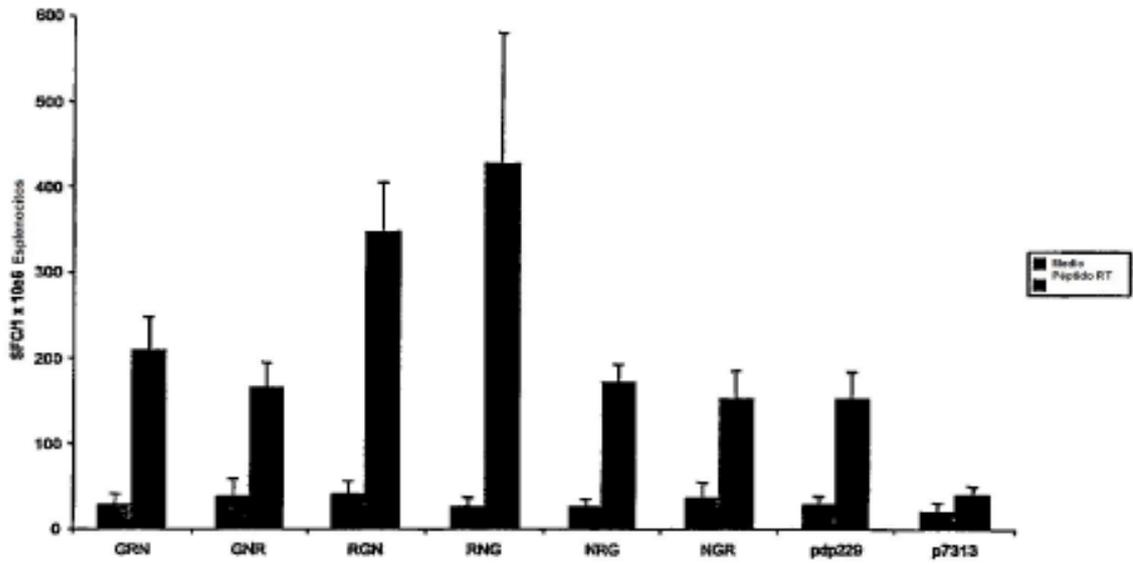


Figura 24

