

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 875**

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2004** **E 04784389 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2012** **EP 1667523**

54 Título: **Composiciones de vacunas de ADN y procedimientos para su uso**

30 Prioridad:

16.09.2003 US 503197 P
15.09.2004 US 941164

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
04.04.2013

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF KANSAS MEDICAL CENTER
(100.0%)
3901 RAINBOW BOULEVARD
KANSAS CITY, KS 66160, US

72 Inventor/es:

NARAYAN, OPENDRA y
LIU, ZHENQIAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 399 875 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

Composiciones de vacunas de ADN y procedimientos para su uso.

Antecedentes de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al campo de las vacunas profilácticas para generar protección frente a la infección y la enfermedad inducida por el VIH-1. De modo más específico, la presente invención se refiere a vacunas de ADN contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

10 Para el final del año 2000, se calculó que 36,1 millones de personas en el mundo estaban infectadas por el VIH. Sólo en ese año, las enfermedades asociadas con VIH/SIDA se cobraron la vida de aproximadamente 3 millones de personas en el mundo. Se calcula que 500.000 de estas muertes corresponden a niños menores de 15 años. La importancia de una vacuna para el VIH con respecto a la salud mundial no puede exagerarse.

15 Se reconoce que unas vacunas eficaces que inhiban o eviten la infección por VIH-1 o la enfermedad inducida por VIH-1 en seres humanos serían útiles para el tratamiento de ciertas poblaciones de alto riesgo, y como vacunación profiláctica general para la población general que pueda estar en riesgo de una infección por VIH-1 o una enfermedad inducida por VIH-1. Una vacuna que confiera una protección a largo plazo frente a la transmisión del VIH-1 sería lo más útil. Por desgracia, existen muchos problemas que interfieren en el desarrollo de vacunas eficaces para la prevención de la infección y la enfermedad por VIH-1. Es muy probable que ciertos problemas sean el resultado de la naturaleza exclusiva del virus VIH-1 y sus propiedades funcionales, y hasta ahora no se ha desarrollado una vacuna eficaz (para una visión general, véase: Berzofsky et al., *Developing Synthetic Peptide Vaccines for HIV-1*, *Vaccines*, 95, pp. 135-142, 1995; Cease y Berzofsky, *Toward a Vaccine for AIDS: The*

20 *Emergence of Immunobiology-Based Vaccine Design*, *Annual Review of Immunology*, 12:923-989; Berzofsky, *Progress Toward Artificial Vaccines for HIV*, *Vaccines*, 92, pp. 40-41, 1992).

25 El documento US2003/0158131 informan sobre una vacuna de ADN que comprende vectores para la producción de partículas víricas de VIH no infecciosas. Las partículas no infecciosas se obtienen introduciendo una serie de mutaciones de inactivación en un genoma vírico nativo, es decir, en al menos una posición de un aminoácido de la proteína de la transcriptasa inversa (RT) o de la proteína de la integrasa (IN). Además, la mutación en el genoma del VIH nativo puede introducirse en agrupaciones, en las que se realizan dos o más mutaciones en la proteína NC, la proteína RT, la proteína IN, o cualquiera de sus combinaciones.

30 Smith, J.M. et al. (*Viral Imm.*, 13, nº 3, pp. 343-351, 2000) informan sobre el análisis de un genoma de VIS mutante que revela una delección de 1,6 kb que está dentro de marco y abarca a *integrasa*, *vif*, *vpx*. Esta delección se introdujo en el clon molecular patogénico de origen, y la región U3 de la 5' LTR se reemplazó por un promotor de citomegalovirus para producir un candidato a vacuna de ADN, pIV.

Kotsopoulou, E. et al. (*J. Virol.*, vol. 74, nº 10, 4839-4852, 2000) informan sobre un módulo de expresión de VIH-1-gag-pol sintético (SYNGP). Este módulo de expresión no comprende una secuencia que codifique las proteínas gag, pro, vpx, vpr, net o tat de SIV o VIH.

35 Seth, A. et al. (*J. Virol.*, vol. 74, nº 6, 2502-2509, 2000) informan sobre un virus vaccinia modificado (virus de Ankara) que expresa de modo recombinante las proteínas Gag-Pol del virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS).

40 Seth, A. et al. (*PNAS*, vol. 95, 10112-10116, 1998) informan sobre la utilidad de un virus vaccinia modificado (virus de Ankara) (MVA) como vector para inducir SIDA. Después de dos inmunizaciones intramusculares con MVA-SIV_{SM} gag pol, el modelo de mono rhesus/virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) desarrolló una respuesta de CTL específica de epitopo de Gag que puede detectarse con facilidad en linfocitos de sangre periférica utilizando un ensayo de muerte funcional.

45 Barouch, D.H. et al. (*Science*, vol. 290, 486-492) y Barouch, D.H. et al. (*PNAS*, vol. 97, nº 8, 4192-4197, 2000) informan sobre la eficacia protectora de respuestas inmunológicas inducidas por vacunas frente a una exposición a SHIV-89.6P patogénico en monos rhesus. Las respuestas inmunológicas fueron inducidas por vacunas de ADN que expresan Gag de SIVmac239 y Env de HIV-189.6P.

50 El VIH es un retrovirus, lo cual significa que su genoma consiste en ARN en lugar de ADN. Existen dos cepas principales del virus, denominadas VIH-1 y VIH-2, siendo el VIH-1 la cepa principalmente responsable de la infección en seres humanos. El genoma de ARN del VIH está rodeado por una cubierta de proteínas. La combinación del genoma de ARN y la cubierta de proteínas se conoce como nucleocápsida, que a su vez está rodeada por una envuelta de proteínas y lípidos.

La infección de las células hospedantes por el VIH comienza cuando la proteína gp120 del VIH, una proteína muy glicosilada localizada en la envuelta vírica, se une a la molécula receptora CD4 de una célula hospedante. Esta interacción inicia una serie de acontecimientos que permiten la fusión entre las membranas vírica y celular y la posterior entrada del virus en la célula.

5 Después de entrar en la célula hospedante, el ARN del VIH es transcrito en ADN bicatenario por una enzima transcriptasa inversa vírica. Tras integrarse en el genoma hospedante, el VIH se expresa a través de transcripción por la enzima ARN polimerasa II del hospedante. A través de un control transcripcional y un procesamiento de la transcripción postranscripcional, el VIH es capaz de ejercer un alto nivel de control sobre el grado en el que se expresa.

10 Los estudios del virus del VIH han revelado mucha información acerca de la biología molecular del virus, incluyendo información acerca del número de genes y de las regiones genéticas importantes para la patogenicidad del VIH. Entre estos genes y regiones importantes se encuentran *rt*, *int*, *vif*, y la 3' LTR del VIH.

El gen *rt* del VIH codifica la transcriptasa inversa vírica. Esta enzima utiliza el genoma de ARN del VIH para producir una correspondiente molécula de ADN bicatenario lineal que puede incorporarse al genoma del hospedante.

15 El gen *int* del VIH codifica una integrasa. Esta es la enzima que realmente cataliza la inserción del ADN vírico bicatenario lineal producido por la transcriptasa inversa, en el genoma del hospedante. Para completar la integración del ADN vírico en el genoma del hospedante, la maquinaria de reparación del ADN de la célula hospedante realiza un acoplamiento entre los ADN del hospedante y vírico.

20 El gen *vif* del VIH codifica una proteína conocida como "factor de infectividad vírica". Esta proteína es necesaria para la producción de viriones infecciosos. Es probable que la proteína domine a un inhibidor celular que de otra forma inhibiría al VIH-1, y también puede potenciar la estabilidad del núcleo vírico y del complejo de preintegración.

25 Las regiones LTR ("long terminal repeat", repetición terminal larga) del VIH-1 contienen regiones de promotores necesarias para conducir la expresión de los genes del VIH. La 5' LTR del VIH-1 contiene el promotor que es principalmente responsable de conducir la expresión génica del VIH-1, aunque si la secuencia de 5' LTR es alterada, la 3' LTR puede asumir esta función. La 3' LTR es necesaria para la integración del ADN vírico en el genoma del hospedante.

Otros genes importantes del VIH-1 son *gag*, *pol*, *nef*, y *vpu*.

30 El gen *gag* codifica, entre otras cosas, la proteína de la cápsica p27 del VIH. Esta proteína es importante para el ensamblaje de las nucleocápsidas víricas. También se sabe que la proteína p27 interacciona con la proteína celular CyA del VIH, que es necesaria para la infectividad vírica. Se ha demostrado que la alteración de la interacción entre p27 y CyA inhibe la replicación vírica.

El gen *pol* contiene las secuencias *rt* e *int* del VIH-1, por tanto codifica, entre otras cosas, la transcriptasa inversa y la integrasa.

35 El producto del gen *nef* (conocido como factor negativo, o Net) tiene una serie de propiedades potencialmente importantes. Nef tiene la capacidad de infrarregular las proteínas de clase I de MHC y CD4, siendo ambas importantes para la capacidad del cuerpo para reconocer a las células infectadas por el virus. También se ha demostrado que Nef activa a proteína quinasas celulares, interfiriendo con ello en los procesos de señalización de la célula. Quizás de modo más importante, la delección de *nef* de un clon patógeno del virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS) hace que el virus no sea patogénico en monos macacos adultos. Así, un gen *nef* funcional es crucial para la capacidad del VIS para provocar enfermedad *in vivo*. Otros estudios han demostrados que individuos VIH-positivo con grandes delecciones en el gen *nef* permanecen sanos durante bastante más de diez años, sin reducción en los recuentos de células CD4.

45 El gen *vpu* codifica una proteína con una función antes desconocida (conocida como proteína vírica, desconocida, o Vpu) pero que ahora se sabe que infrarregula la expresión de proteínas de clase I de MHC y CD4, así como estimula la gemación vírica. Vpu también es similar a otra proteína vírica que actúa como canal iónico. El gen *vpu* está presente en el VIH-1, pero está ausente en el VIH-2.

En casi todas las infecciones víricas, ciertos segmentos de la población infectada se recuperan y se convierten en inmunes frente a una futura infección vírica por el mismo patógeno. Los ejemplos de patógenos víricos típicos incluyen el sarampión, la poliomielitis, la varicela, la hepatitis B, y la viruela. La alta tasa de mortalidad de la infección

por VIH-1, y la incidencia extremadamente infrecuente de recuperación e inmunidad protectora frente a la infección por VIH-1, ha sembrado dudas sobre la capacidad de los primates para generar una inmunidad natural frente a la infección por VIH-1 cuando el VIH-1 patogénico es el patógeno vírico de tipo salvaje no modificado. Por tanto, es muy necesaria una vacuna que confiera a poblaciones de primates una inmunidad protectora frente al virus VIH-1.

5 Una característica de la resistencia a una futura infección vírica es la generación de “anticuerpos neutralizantes” capaces de reconocer al patógeno vírico. Otra medida es la inmunidad celular frente a células infectadas. En las infecciones víricas típicas, la generación de anticuerpos neutralizantes e inmunidad celular anuncia la recuperación de la infección. Sin embargo, en la infección por VIH-1, los anticuerpos neutralizantes y la inmunidad celular aparecen en un momento muy temprano de la infección y se han asociado con una disminución sólo transitoria en la carga vírica. A pesar de la generación de anticuerpos neutralizantes y de inmunidad celular, la replicación vírica en la infección por VIH-1 rebota y se desarrolla SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida). Así, en la infección por VIH-1, los anticuerpos neutralizantes y la inmunidad celular no son medidas precisas de la inmunidad protectora.

15 Otro problema en el desarrollo de una vacuna eficaz para el VIH-1 es la diversidad antigénica del virus de tipo salvaje. Existe una gran posibilidad de que las vacunas generadas por medio de proteínas de la envuelta del VIH-1 recombinantes confieran resistencia a fenotipos específicos del virus y no produzcan una inmunidad de amplio espectro. El desarrollo de vacunas que utilicen el péptido gp120 de VIH-1 recombinante, una proteína de la envuelta del virus VIH-1, ha pasado los ensayos clínicos de fase 1 sin mostrar toxicidad. Sin embargo, los datos indican que apartecen anticuerpos neutralizante sólo de modo transitorio. Así, las vacunas del péptido gp-120 de VIH-1 recombinante pueden actuar sólo a corto plazo, produciéndose en el futuro una reversión a la susceptibilidad.

20 En general, se acepta que las vacunas con virus vivos inducen una inmunidad mejor frente a virus patógenos que las proteínas víricas aisladas (véase, por ejemplo, Putkonen et al., Immunization with Live Attenuated SIVmac Can Protect Macaques Against Mucosal Infection with SIVsm, Vaccines, 96, pp. 200-210, 1996; Dimmock y Primrose, Introduction to Modern Virology, 4ª ed., Blackwell Science, 1994). Hay una resistencia al uso de vacunas de lentivirus vivos, tales como la vacuna del VIH-1, porque existe una gran preocupación de que el virus persista indefinidamente en la población inoculada debido a la integración del ADN vírico en el ADN hospedante de los individuos inoculados (véase, por ejemplo, Haaft et al., Evidence of Circulating Pathogenic SIV Following Challenge of Macaques Vaccinated with Live Attenuated SIV, Vaccines, 96, pp. 219-224, 1996). Por tanto, una vacuna segura y eficaz frente al VIH-1 incluirá una modificación para evitar el desarrollo de una infección patógena virulenta que se produciría por una mutación aleatoria o por otro cambio en el virus de vacuna inicialmente no patogénico. Una posibilidad para esta vacuna podría venir en forma de una vacuna de ADN contra el VIH-1.

35 La publicación de patente de EEUU nº 2003/0158131 A1 divulga una vacuna que comprende partículas víricas de VIH no infecciosas mutadas. Las partículas no infecciosas se obtienen introduciendo una serie de mutaciones inactivadoras en el genoma vírico nativo. Las mutaciones se introducen en al menos una posición de un aminoácido de la proteína NC (nucleocápsida) en combinación con al menos otra mutación en un aminoácido de la proteína RT (transcriptasa inversa) o en la proteína In (integrasa). Las mutaciones pueden introducirse en agrupaciones, en las que se realizan dos o más mutaciones en la proteína NC, la proteína RT, la proteína IN, o cualquiera de sus combinaciones.

40 Smith et al., Viral Immunology, 13(3), pp. 343-351 (2000) informan sobre un análisis de un genoma de VIS mutante que revela una delección de 1,6 kb que está dentro de marco, abarca a *integrasa*, *vif*, *vpx*, y la mayor parte de *vpr*, y produce una fusión génica *pol/vpr*. Esta delección se introdujo en el clon molecular patogénico de origen, y la región U3 de la 5' LTR se reemplazó por un promotor de citomegalovirus para producir un candidato a vacuna de ADN.

45 Las vacunas de ADN en general se inyectan en tejidos del hospedante en forma de moléculas de ARN o ADN plasmídico con una aguja o mediante bombardeo de partículas. Después de ser transportado, el ADN induce la expresión de proteínas antigénicas dentro de las células transfectadas. La patente de EEUU nº 6.194.389 informan sobre procedimientos para transferir ADN a células de vertebrado para producir inmunorrespuestas fisiológicas que producen proteínas en un sujeto animal.

50 El ensayo de la eficacia de una vacuna en general requiere la exposición de un sujeto a un virus vivo o a ADN. Resulta difícil, desde un punto de vista ético y práctico, intentar realizar estudios preliminares con sujetos humanos. El uso de sistemas de modelos para el diseño preliminar y el ensayo de candidatos a vacunas se ha visto dificultado por diversas características específicas de especie del virus. En la actualidad, se sabe que el propio virus VIH-1 infecta sólo a ciertas especies amenazadas de chimpancés y en ciertas tasas, además de seres humanos. La viabilidad de obtener un número suficiente de dichos animales amenazados para un estudio preliminar completo de vacunas del virus VIH-1 es muy baja. Es preferible utilizar sistemas de modelos animales análogos validados.

Un sistema de modelo análogo para el VIH-1 ha sido el sistema SIV_{mac} (siglas en inglés del virus de la inmunodeficiencia de simio, macaco). El VIS infecta a una diversidad de simios, incluyendo los macacos, pero la diferencia entre VIS y VIH hace que el VIS tenga un uso limitado como vacuna humana potencial. Por tanto, es necesaria una vacuna fabricada a partir de virus que estén muy relacionados con el VIH, pero que sigan siendo infecciosos en un modelo animal para poder realizar ensayos.

Se ha desarrollado un virus VIS-VIH quimérico colocando las proteínas de la envuelta del VIH-1 en un entorno de SIV_{mac}. El virus quimérico demostró ser infeccioso en monos, pero no produjo SIDA en su estado más avanzado ni resulta un modelo preciso para imitar la infección por VIH-1 en monos.

Tal como se describe a continuación, la presente invención informan sobre construcciones de ADN específicas. Además, se describen procedimientos que son eficaces para generar una respuesta inmunológica frente al VIH-1 en un hospedante vacunado.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige a una vacuna de ADN para la inmunización frente el VIH. La invención comprende una molécula de ADN que tiene una secuencia que codifica una pluralidad de proteínas víricas capaces de estimular una respuesta inmunológica contra el VIH. La molécula de ADN se convierte en segura para su uso como vacuna mediante la alteración de genes que codifican la transcriptasa inversa, la invertasa, y Vif. La molécula de ADN se hace aún más segura mediante una delección al menos parcial de la 3' LTR.

La molécula de ADN de la presente invención incluye también una secuencia de poliadenilación de SV40. Además, la molécula de ADN de la presente invención es regulada preferiblemente por una secuencia de promotor de VIS natural.

La presente invención se dirige también a una vacuna contra múltiples subtipos de VIH, así como a virus distintos del VIH, produciéndose dicha vacuna sustituyendo genes de dichos otros virus por los genes de VIH y/o VIS ortólogos descritos en la presente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama esquemático de la construcción de ADN Δ 4-SHIV_{ku2} de la presente invención.

La figura 2 es un diagrama circular de la construcción de ADN Δ 4-SHIV_{ku2} de la presente invención.

Descripción detallada

El objeto de la presente invención es proporcionar composiciones de vacunas de ADN que proporcionan inmunidad protectora a individuos no infectados o inmunidad terapéutica a sujetos infectados. También se describen procedimientos que proporcionan una respuesta inmunológica protectora a sujetos no infectados o una inmunidad terapéutica a sujetos infectados.

Un aspecto de la presente invención se dirige a moléculas de ADN que codifican proteínas víricas capaces de estimular una respuesta inmunológica contra el VIH. En realizaciones preferidas, la vacuna de ADN codifica las proteínas *gag*, *pro*, *vpx*, *vpr*, *nef*, *tat* del VIH o VIS.

De manera importante, las moléculas de ADN de la presente invención se han alterado desde el punto de vista funcional, de modo que se elimina la capacidad de codificar proteínas que son importantes para la patogenicidad. De modo más específico, las realizaciones preferidas alteran desde el punto de vista funcional a los genes *vif*, *int* y *rt* de la vacuna de ADN. Otras realizaciones alteran desde el punto de vista funcional al gen *rt*. Se anticipa que el ADN puede alterarse desde el punto de vista funcional insertando o delecionando al menos un nucleótido, de modo que el número de nucleótidos en las secuencias alteradas difiere con respecto a las secuencias no alteradas. También se anticipa que el ADN que codifica proteínas relacionadas con la patogenicidad pueda alterarse desde el punto de vista funcional sustituyendo uno o más nucleótidos que codifican aminoácidos funcionales por uno o más nucleótidos diferenciados que codifican aminoácidos no funcionales. En una realización preferida de la presente invención, la alteración funcional del ADN que codifica proteínas relacionadas con la patogenicidad se produce a través de la delección de los genes *rt*, *int* y *vif*.

Otro aspecto importante de esta invención es que proporciona vacunas de ADN que alteran las secuencias 3' LTR que permiten la integración indeseable de secuencias de ADN en el genoma del hospedante. La función de la 3' LTR también puede abolirse sustituyendo nucleótidos funcionales por nucleótidos no funcionales diferenciados. La región 3' LTR delecionada es reemplazada preferiblemente por una secuencia de poliadenilación de SV40. Los expertos en la técnica reconocerán que también pueden utilizarse sitios de poliadenilación derivados de una diversidad de fuentes distintas al SV40 como sustitutos de las secuencias 3' LTR.

Otro aspecto de la invención es la regulación de la molécula de ADN de la presente invención mediante el uso del promotor SHIV_{ku2} o SIV 5' LTR (SEQ ID NO:7). Este promotor dirige la expresión de proteínas víricas capaces de estimular una respuesta inmunológica contra el VIH presente en la vacuna de ADN. Los expertos en la técnica reconocerán que en realizaciones alternativas de esta invención, se pueden sustituir otras secuencias de promotores funcionales que también dirijan la expresión de la proteínas víricas deseadas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Construcción de la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2}

La figura 1 es un diagrama esquemático de la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2} (SEQ ID NO:1) de la presente invención. La construcción de la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2} de la presente vacuna de ADN (SEQ ID NO:1) se realiza como sigue. El vector utilizado para la presente vacuna es pET-9a. El fragmento EcoR I/Xmn I de 2,3 kb de pET-9a se reemplaza por el genoma del provirus SHIV_{ku2} modificado de aproximadamente 7,4 kb y la secuencia señal de poliadenilación de aproximadamente 0,5 kb de SV40 para producir un vector intermedio. Se crean sitios de restricción EcoR I y Not I inmediatamente cadena arriba de 5' LTR y al final del gen *nef*, respectivamente, en otro vector intermedio. Los genes de la transcriptasa inversa (*rt*), la integrasa (*int*), y *vif* se eliminan mediante la delección de un fragmento de ADN de aproximadamente 2,5 kb entre el extremo corriente abajo del gen *pro* y cadena arriba del gen *vpx*. La secuencia de nucleótidos de aproximadamente 3,8 kb que codifica la proteína de la envuelta (*env*), *nef*, y los genes de 3' LTR del genoma del provirus SHIV_{ku2} entonces se reemplaza por el fragmento de ADN EcoR V/Not I de aproximadamente 3,2 kb que codifica los genes *env*, y *nef* del VIH-1. El fragmento de ADN Nar I/BstE II de aproximadamente 2,5 kb que codifica la secuencia conductora, los genes *gag* y *pro* de SIV_{mac239} en SHIV_{ku2} se reemplaza por un fragmento Nar I/BstE II de aproximadamente 2,4 kb que codifica la secuencia conductora del VIH-1, los genes *gag* y *pro* del VIH-1, para producir la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2} (SEQ ID NO:1). Por tanto, la 5' LTR, los genes *vpx* y *vpr* de la presente vacuna provienen de SIV_{mac239}, y los genes *gag*, *pro*, *tat*, *rev*, *vpu*, *env* y *nef* provienen del VIH-1. La secuencia de una realización preferida de la presente vacuna de ADN Δ4-SHIV_{ku2} se denomina SEQ ID NO:1.

Se proporciona la siguiente información para detallar la estructura de la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2} (SEQ ID NO:1) de forma más completa. Un fragmento de 4.981 pb de SHIV_{ku2} que codifica los genes *gag* y *pol* completos (que, por tanto, incluye las porciones *rt* e *int* del genoma), así como las primeras 472 pb del gen *vif*, se reemplaza por un fragmento de ADN de 2.376 pb del VIH-1 en la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2}. Este fragmento de 2.379 pb codifica el gen *gag* de VIH-1 completo, y una porción del gen *pol* de VIH-1 (se incluye la región completa que codifica una proteasa; se han eliminado los nucleótidos que corresponden a los primeros 104 aminoácidos de la transcriptasa inversa; los genes *int* y *vif* se han eliminado por completo). El fragmento de 4.981 pb de SHIV_{ku2} que ha sido reemplazado se denomina SEQ ID NO:2. La secuencia de ADN de los primeros 472 pb del gen *vif* de SHIV_{ku2}, que también ha sido reemplazado, se denomina SEQ ID NO:3. La secuencia de ADN del fragmento de 2.376 pb del VIH-1 utilizada para reemplazar las secuencias delecionadas de 4.981 pb y 472 pb de SHIV_{ku2} (SEQ ID NO:2 y SEQ ID NO:3, respectivamente) se denomina SEQ ID NO:4.

Además de lo anterior, un fragmento de ADN de 411 pb se deleciona de la 3' LTR de SHIV_{ku2} para producir la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2} (SEQ ID NO:1). Esta secuencia de 3' LTR delecionada se denomina SEQ ID NO:5. En la construcción de ADN Δ4-SHIV_{ku2}, las secuencias 3' LTR delecionadas se reemplazan por una secuencia de ADN de 481 pb de la secuencia señal de poliadenilación de SV40 que se denomina SEQ ID NO:6.

Ejemplo 2. Eficacia de la vacuna de ADN Δ2-SHIV_{ku2}

Antes de detallar los aspectos funcionales de la presente invención y los resultados experimentales derivados de su uso, es necesario establecer la eficacia de la presente invención mediante comparación con la eficacia de las que han aparecido antes. Antes de la invención de la presente vacuna y su posterior ensayo, su utilidad como vacuna era desconocida.

Se sabe, a partir de estudios anteriores realizados por el inventor de la presente invención, que una vacuna de virus vivos contra el VIH es muy eficaz para inducir una protección frente al virus. Para comprobar si una vacuna de ADN

sería igual de eficaz para proporcionar esta protección se realizó un experimento con cinco macacos. Tres de los animales recibieron inyecciones de un ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2}, en el que se ha deletado *rt* y 3' LTR para aumentar la seguridad de la vacuna. El ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2} también reemplaza la secuencia 3' LTR deletada por la secuencia de poliadenilación de SV40. Los otros dos animales fueron inmunizados con una vacuna de virus vivos. Los tres animales vacunados con la vacuna de ADN recibieron cada uno 2 mg del ADN, inyectados por vía intradérmica, seguido de una inyección intramuscular de 5 mg de ADN seis semanas más tarde, y una tercera inyección de 0,5 mg de ADN intramuscular doce semanas después. Los macacos se expusieron por vía intravenosa a una preparación madre sin diluir de SHIV 89.6P doce semanas después de la inmunización final. Es importante advertir que la misma dosis de SHIV 89.6P provoca enfermedad en 100% de los animales control inoculados. Los dos macacos vacunados con el virus vivo se expusieron diez semanas después de la vacunación al mismo virus SHIV.

Cuando los animales fueron estudiados posteriormente, se hizo evidente que la vacuna de ADN induce respuestas ELISPOT™ (Cellular Technology Limited, Cleveland, Ohio) contra epitopos en los péptidos Env y Gag, así como anticuerpos neutralizantes contra SHIV_{ku2}. Las respuestas ELISPOT™ se definen en la presente como mediciones del número de células que expresan un epítipo indicado. Los tres animales vacunados con la vacuna de ADN se infectaron con SHIV 89.6P, pero cada uno desarrolló sólo niveles bajos de ARN vírico en el plasma, sin pérdida de células T CD4. Los animales vacunados con la vacuna de ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2} desarrollaron una masiva respuesta ELISPOT anamnésica después de la exposición. La infección en estos animales se controló durante más de 28 semanas. A las 28 semanas, los tres animales que fueron inmunizados con la vacuna de ADN mostraron una protección que era tan eficaz como en los animales inmunizados con la vacuna viva. Así, la vacuna de ADN demostró ser tan eficaz como la vacuna viva para inducir una protección frente a SHIV 89.6P heterólogo. Además, los animales que recibieron la vacunación de ADN no tuvieron que soportar la carga de una infección anterior con un virus de vacuna vivo.

Ejemplo 3. Eficacia *in vivo* de las vacunas de ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2} y $\Delta 4$ -SHIV_{ku2}

Aunque el experimento descrito en el ejemplo 2 indica la eficacia de la vacuna de ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2} que carece del gen *rt* y de 3' LTR, no está claro si la presente vacuna, $\Delta 4$ -SHIV_{ku2}, sería eficaz como vacuna. La duda surge del hecho de que la presente vacuna $\Delta 4$ -SHIV_{ku2} contiene cuatro delecciones (*rt*, *int*, *vif*, y la 3' LTR), correspondiendo cada delección a una porción del genoma vírico importante para la infectividad del virus. Las delecciones se realizaron para hacer que el virus no sea infeccioso y sea seguro para su uso, pero se desconoce si estas cuatro delecciones, además del hecho de que se está utilizando ADN en lugar de un virus vivo, harían que la vacuna fuera incapaz de proporcionar protección frente al VIH-1. De manera sorprendente, el presente virus demostró ser igual de eficaz para inducir una protección frente a SHIV 89.6P heterólogo que la vacuna de ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2} descrita en la comparación con virus vivos del ejemplo 2.

Tres macacos recibieron una inyección intramuscular de 5 mg del ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2}, mientras que otros tres macacos recibieron una inyección intramuscular de 5 mg del presente ADN $\Delta 4$ -SHIV_{ku2}. Las inyecciones se repitieron once semanas después, y los animales se expusieron por vía intravenosa a una disolución madre sin diluir de SHIV 89.6P seis semanas después de la segunda inmunización. Los seis animales desarrollaron respuestas ELISPOT™ a la vacuna tres semanas después de la primera inyección, disminuyendo las respuestas aproximadamente tres semanas después hasta niveles indetectables. Las respuestas aparecieron una vez más sólo una semana después de la segunda inyección, y de nuevo disminuyeron hasta niveles bajos. Sólo se detectaron respuestas mínimas en el momento de la exposición. A la semana después de la exposición, cada uno de los animales había desarrollado unas titulaciones altas de replicación vírica, que se correspondían con una poderosa respuesta CMI (respuesta inmunológica mediada por células). A las dos semanas después de la exposición, la carga vírica en los animales disminuyó hasta niveles entre diez y veinte veces menores que las concentraciones observadas una semana antes. Ninguno de los animales había perdido células T CD4. La capacidad del ADN para inducir protección después de tan solo dos inyecciones subraya la potencia de las vacunas de ADN, y los resultados del experimento demuestran claramente que, a pesar de las delecciones adicionales, la vacuna de ADN de la construcción de ADN $\Delta 4$ -SHIV_{ku2} (SEQ ID NO:1) de la presente invención es tan eficaz como la vacuna de ADN $\Delta 2$ -SHIV_{ku2}, que a su vez es tan eficaz como la vacuna de virus vivos.

Ejemplo 4. Utilidad de la secuencia de poliadenilación de SV40 como sustituto para la 3' LTR

Se realizó otro experimento para comparar la utilidad de las secuencias de poliadenilación de SV40 como sustitutos para la secuencia 3' LTR. Esto se realizó comparando la capacidad de la realización V5 de la vacuna de ADN SHIV_{ku2} con una 3' LTR intacta, y la realización V6 de la vacuna de ADN SHIV_{ku2} que tiene la 3' LTR reemplazada por una secuencia de poliadenilación de SV40 (SEQ ID NO:6) para expresar proteínas víricas codificadas por un vector. Se comparó la actuación de las dos moléculas de ADN en fibroblastos humanos primarios transfectados, la línea de células epiteliales de riñón embrionario humano 293, y en células Jurkat, para la expresión de proteínas

víricas en compartimentos intra- y extracelulares. Los ADN también se compararon para la duración de la expresión y para la cantidad de producción de proteína, así como para la modificación postraducciona y la ruptura de las proteínas precursoras. Se determinó que la realización V6 de la construcción de la vacuna de ADN SHIV_{ku2} con 3' LTR delecionada, de modo sorprendente, era más eficaz para producir proteínas víricas que la realización V5 de la construcción de la vacuna de ADN SHIV_{ku2} que tiene ambas LTR. La duración de la producción de proteínas también fue mayor en la vacuna con la 3' LTR delecionada. Un análisis de inmunoprecipitación reveló que la deleción de la 3' LTR dio como resultado una rápida ruptura del precursor gag, doblando la cantidad de p27 exportada hacia el compartimento extracelular. Tomados conjuntamente, estos datos indican que la deleción de la 3' LTR no sólo calma la preocupación acerca de la integración del genoma vírico en el ADN hospedante, sino que también produce una expresión más eficaz de las proteínas víricas.

Ejemplo 5. Coadministración de citoquinas con la vacuna de ADN Δ 4-SHIV_{ku2}

A continuación se realizó un estudio para determinar si la respuesta inmunológica inducida por la presente vacuna puede potenciarse mediante la coadministración de ADN de citoquinas (por ejemplo, GM-CSF). Se inmunizaron ratones BALB/C por vía intramuscular con una mezcla de 100 µg de ADN de Δ 4-SHIV_{ku2} y 25 µg de ADN de GM-CSF de ratón. Las inyecciones se administraron dos veces, con un intervalo de dos semanas, y los ratones se sacrificaron una semana después de la segunda inmunización. Los esplenocitos se ensayaron para la respuesta a los péptidos Gag de VIS divididos en cinco grupos en el ensayo ELISPOT™. Aunque las dosis de inmunización fueron bajas y las muestras de tejido se recolectaron temprano, antes de que las respuestas de CMI alcanzasen el máximo, los cuatro animales que recibieron el ADN de GM-CSF junto con la vacuna de ADN desarrollaron respuestas ELISPOT™, que varían de 20 a 40 células/10⁶ esplenocitos, mientras que sólo 50% de los animales que recibieron la vacuna de ADN sola desarrollaron estas respuestas. El GM-CSF provocó un impresionante efecto quimiotáctico, según demostró el gran número de células mononucleares que se concentraron en el sitio de la inyección. Este efecto atrajo muchas más células dendríticas presentadoras de antígenos al sitio de la inyección que en los animales que sólo recibieron la vacuna de ADN. Sin embargo, de modo sorprendente, los ratones que recibieron la vacuna de ADN y GM-CSF desarrollaron unas titulaciones de CMI menores que los que recibieron sólo la vacuna de ADN. Es decir, el número de células positivas a ELISPOT™ específico de proteínas víricas generado por la vacuna sola fue significativamente mayor que el generado por la vacuna más GM-CSF. Se concluye que la coadministración de la vacuna de ADN Δ 4-SHIV_{ku2} con una citoquina, tal como GM-CSF, puede ser deseable en los casos en que resulta deseable, desde el punto de vista profiláctico o terapéutico, aumentar el número de sujetos inyectados que desarrollen esplenocitos activados.

Así, la presente vacuna de ADN es útil para proporcionar protección frente al VIH. El ADN utilizado en la presente invención proviene de SHIV_{ku2}, un virus que tiene una estrategia de replicación muy eficaz, haciendo que sea muy patogénico. La maquinaria transcripcional del ADN se mantuvo conservando la 5' LTR que alberga las secuencias de promotores/potenciadores del ADN vírico. Además, la 5' LTR contiene sitios de unión para factores de transcripción, tales como NFkB, NFAT, SP-1 y similares, y el sitio de unión para el ARN de tat, una molécula exclusiva del VIH y del lentivirus responsable de la transactivación del ADN vírico. El gen de la integrasa y la 3' LTR se delecionaron para minimizar la capacidad del ADN para integrarse en el ADN de la célula hospedante. Así, el ADN no puede persistir indefinidamente en los tejidos. Además, la deleción de la transcriptasa inversa y los genes *vif* inutiliza la capacidad del genoma para codificar virus infecciosos. Al mismo tiempo, las proteínas víricas codificadas por los genes *env*, *gag*, *vpu*, *tat*, y *nef* se expresan en gran medida en células transfectadas con el ADN. La presente vacuna de ADN es muy inmunogénica en macacos e induce una inmunidad protectora frente a virus heterólogos. De manera importante, la presente vacuna no sólo puede utilizarse de modo profiláctico sino también terapéutico en individuos que ya están infectados por el VIH, porque el ADN puede inyectarse en cualquier momento durante un periodo en el que se esté desarrollando una terapia con fármacos antirretrovíricos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Narayan, Opendra Liu, Zhenqian

<120> Composiciones de vacunas de ADN y procedimientos para su uso.

5 <130> 15737.10

<150> documento 60/503.197

<151> 16 de septiembre de 2003

10 <160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

15 <211> 9994

<212> ADN

<213> VIS/VIH

<400> 1

tggaagggat ttattacagt gcaagaagac atagaatctt agacatgtac ttagaaaagg
60

aaaaagggcat cataccagat tggcaggatt acacctcagg accaggaatt agatacccaa
120

agacatttgg ctggctatgg aaattagtcct ctgtaaatgt atcagatgag gcacaggagg
180

atgaagagca ttatttaatg catccagctc aaacttccca gtgggatgac ccttgagagag
240

aggttctagc atggaagttt gatccaactc tggcctacac ttatgaggca tatgttagat
300

accagaaga gtttgaagc aagtcaggcc tgtcagagga agagggttaa agaaggctaa
360

ccgcaagagg ctttcttaac atggctgaca agaaggaaac tcgctgaaac agcagggact
420

ttccacaagg ggatgttacg gggagggtact ggggaggagc cggtcgggaa cgcccacttt
480

cttgatgtat aaatatcact gcatttcgct ctgtattcag tcgctctgag gagaggctgg
540

caggttgagc cctgggagggt tctctccagc actagcagggt agagcctggg tggtccctgc
600

tagactctca ccagcacttg gccggtgctg ggcagagtga ttccacgctt gcttgcttaa
660

agccctcttc aataaagctg ccattttaga agtaagctag tgtgtgttcc catctctcct
720

agccgccgcc tgggtcaactc ggtactcaat aataagaaga ccctgggtctg ttaggaccct
780

ttctgctttg ggaaaccgaa gcaggaaaat ccctagcaga ttggcgcccc aacagggagc
840

cgaaagcgaa agtagaacca gaggagctct ctcgacgcag gactcggctt gctgaagcgc
900

gcacggcaag aggcgagggg cggcgactgg tgagtacgcc atttttgact agcggaggct
960

agaaggagag agatgggtgc gagagcgtca atattaagcg ggggacaatt agatagatgg
1020

gaaaaaattc ggttacggcc aggggggaaag aaaagatata agttaaaca tatagtatgg
1080

gcaagcagag agctagaacg attcgcagtt aaccctggcc tgtagaaac agcagaaggc
1140

tgtagacaaa tactgggaca gctacaacca tcccttcaga caggatcaga ggaacttaaa
1200

tcattattta atacaatagc taccctctat tgtgtacatc aaagaataga gataaaagac
1260

accaaggaag ctttagataa gatagaggaa gagcaaaaca aaagtaagaa aaaagcacag
1320

caagcagcag ctgacacagg aaacagcagc agccaagtca gccaaaatta ccctatagtg
1380

cagaacgctc agggacaaat ggtacatcag gccatatcac ctagaacttt aatgcatgg
1440

gtaaaagtag tagaagaaaa ggcttttaac ccagaagtaa tacccatggt tgcagcattg
1500

tcagaaggag ccaccccaca agatttaaac accatgctaa acacagtggg gggacatcaa
1560

gcagccatgc aaatatttaa agagactatc aatgaggaag ctgcagaatg ggatagattg
1620

catccagtac atgcagggcc tattgcacca ggccaaatga gagaaccaag ggggaagtgc
1680

atagcaggaa ctactagtac ccttcaggaa caaataggat ggatgacaaa taatccacct
1740

atcccagtag gagaaatcta taaaaaatgg ataatcatgg gattaaataa aattgtaagg
1800

atgtatagcc ctaccagtat tctggacata agacaaggac caaaggaacc ctttagagac
1860

tatgtagacc ggttctataa aactctaaga gccgagcaag cttcacagga agtaaaaaat
1920

tggatgacag aaaccttggt ggtccaaaat tcaaaccctg attgtaagac tattttaaaa
1980

gcattaggac caggagctac actagaagaa atgatgacag catgccaggg agtgggagga
2040

cctggccata aagcaagagt tttggcagaa gcaatgagcc aagtaacaaa tccaacggcc
2100

gtgatgatgc agaaaagcaa ttttaggggc caaagaaaaa ttgttaagtg ttttaattgt

2160

ggcaaagaag ggcacatagc caaaaattgc agggctccta gaaaaaaggg ctgttggaag
2220

tgtggaaagg aaggacacca aatgaaagat tgtactgaaa gacaggctaa ttttttaggg
2280

aagatctggc cttcctacaa gggaaggcca gggaattttc ctcaaagcag gctagaacca
2340

acagccccac cagaagcgag cttcagggtt ggggaggaga caacaactcc ccctcagaag
2400

caggagacga tagacaagga ggtgtatcct ttaacctccc tcagatcact ctttggaac
2460

gacccctcgt cacaataaag ataggggggc aactaaaaga agctctatta gatacaggag
2520

cagatgatac agtggttagaa gacatgaatt tgccaggaaa atggaaacca aaaatgatag
2580

ggggaattgg aggatttatc aaagtaaaac agtatgatca gatacccata gaaatctgtg
2640

gacataaaac tataggtaca gtattaatag gacctacacc tgtcaacata attggaagga
2700

atttggtgac tcagcttggt tgcactttaa attttcccat tagtcctatt gaaactgtac
2760

cagtaaaatt aaagccagga atggatggcc caaaagttaa gcaatggcca ttgacagaag
2820

aaaaaataaa agcattaatg gagatatgca cagaaatgga aaaggaaggg aaaatttcaa
2880

aaattgggcc tgaaaatcca tacaatactc cagtgtttgc cataaagaaa aaagacagta
2940

ctaagtggag aaaattagta gatttcagag aacttaataa gaaaactcaa gacttctggg
3000

aggttcaatt aggaatacca catcccgcgg ggttaaaaaa gaaaaagtca gtaacagtac
3060

tggatgtggg tgatgcatac ttctcagttc ccttagatga agattttagg aagtatactg
3120

catttaccat acctagtata aacaatgaga catcaggaat tagatatcag tacaatgtgc
3180

ttccacaggg atggaaaggg tcaccatgtc agatcccagg gagagaatcc cacctggaaa
3240

cagtggagaa gagacaatag gagaggcctt cgaatggcta aacagaacag tagaggagat
3300

aaacagagag gcggtaaacc acctaccaag ggagctaatt ttccagggtt ggcaaaggtc
3360

ttgggaatac tggcatgatg aacaagggat gtcaccaagc tatgtaaaat acagatactt
3420

gtgtttaata caaaaggctt tatttatgca ttgcaagaaa ggctgtagat gtctagggga
 3480
 aggacatggg gcagggggat ggagaccagg acctctcct cctccccctc caggactagc
 3540
 ataaatggaa gaaagacctc cagaaaatga aggaccacaa agggaaccat gggatgaatg
 3600
 ggtagtggag gttttggaag aactgaaaga agaagcttta aaacattttg atcctcgctt
 3660
 gctaactgcc cttggtaatc atatctataa tcgtcacgga gacactctag agggagcagg
 3720
 agaactcatt agaatcctcc aacgagcgct cttcatgcat ttcagaggcg gatgcatcca
 3780
 ctccagaatc ggccaacctg agggaggaaa tcctctctca gctataccgc cctctagaag
 3840
 cattctgtag agcaagaaat ggagccagta gatcctagac tagagccctg gaagcatcca
 3900
 ggaagtaagc ctaaaactgc ttgtaccaat tgctattgta aaaagtgttg ctttcattgc
 3960
 caagtttgtt tcataacaaa agccttaggc atctcctatg gcaggaagaa gcggagacag
 4020
 cgacgaagag ctcatcagaa cagtcagact catcaagctt ctctatcaaa gcagtaagta
 4080
 gtacatgtaa tgcaacctat accaatagta gcaatagtag cattagtagt agcaataata
 4140
 atagcaatag ttgtgtggtc catagtaatc atagaatata ggaaaatatt aagacaaaga
 4200
 aaaatagaca ggtaattga tagactaata gaaagagcag aagacagtgg caatgagagt
 4260
 gaaggagaga tatcagaatt atcagcactt gtggagagag ggcattctgc tccttgggat
 4320
 attaatgata tgtagcactg caggacaatt gtgggtcaca gtctattatg gggtagctgt
 4380
 gtggagagaa gcaaccacca ctctattttg tgcacagat gctaaagcat atgatacaga
 4440
 ggtgcataat gtctgggcca cacatgcctg tgtaccaca gaccccagcc cacaagaaat
 4500
 ggcataggaa aatgtgacag aaaattttga catgtggaaa aataatatgg tagaacagat
 4560
 gcatgaagat ataatcagct tatgggatca aagcctaaag ccttgtgtaa aattaactcc
 4620
 actatgtgtt actttaaatt gcatgatgt aaagagaaat gctactagta acactagtag
 4680

tagctgggaa aggatggaac caggagaaat aaaaaactgc tctttcaatg tcacctcaaa
4740

tataagagat aagatgcgga aagaatatgc actcttttat aaacttgatg taataccaat
4800

aaataatact agtgataata gtgctaaata tagattgata agttgtaaca cctcagtcct
4860

tacacaagct tgtccaaaaa tctcctttga gcccaattcca atacattatt gtacccccggc
4920

tggttttgcg cttctgaagt gtaatgataa ggagttcaat ggaacgggac catgtaaaaa
4980

tgtcagcaca gtacaatgta cacatggaat caagccagta gtatcaactc aactgctggt
5040

aaatggcagt ctatcagaag gaggggttgt aattagatct caaaatttca caaacaatgc
5100

taaaaccata atagtacagc tgaatgaaac tgtagaaatt aattgtacaa ggcccaacaa
5160

caatacaaga agaagtataa atataggacc agggagagca ttttatgcag cagaacaaat
5220

aataggagat ataagacaag cacattgtaa cattagtaga gcaaaatgga ataacacttt
5280

aaaactgata gttggaaaat tacaagaaca atttgggaag aaaacaataa tctttaatca
5340

atcctcagga ggagaccctg agattgtaac acacagtttt aattgtggag ggggaattttt
5400

ctactgtgat tcaacacaac tgtttaacag tacttggacg aatgaaaata acgggtccaa
5460

cactaaaggg aatgacacaa tcatactacc atgcagaata aaacaaattg taaacctgtg
5520

gcaggaagta ggaaaagcaa tgtatgcccc tcccatcaga agaccaatta gatgctcatc
5580

aaatattaca gggctgctac taacaagaga tgggtggctct aataggacga acgagacatt
5640

cagacctgga ggaggagata tgagggacaa ttggagaagt gaattataca aatataaagt
5700

agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc caccaaggca aagagaagag tggtgcaaag
5760

agaaaaaaga gcagtgggaa taggagctct gttccttggg ttcttgggaa cagcaggaag
5820

cactatgggc gcagcgtcac tgacgctgac ggtacaggcc agacaattat tgtctggtat
5880

agtgaacag cagaacaatt tgctgagagc tattgaagcg caacaacatc tgttgcagct
5940

cacagtctgg ggcacaaagc agctccaggc aagagtcctg gctgtggaaa gatacctaag

6000

ggatcaacag ctcttgggaa tttgggggtt ctctggaaaa ctcatattgca ccactgctgt
6060

gccttgggaa actagttgga gtaataaatc tctagatgac atttggaaca acatgacttg
6120

gatgcagtgg gaaagagaaa ttgacaatta cacaaacaca atatacacct tacttcagga
6180

atcacaaactc caacaagaac agaattgaaaa agaactattg gaattggata aatgggcaag
6240

tttgttggaa ttggttcgata taacaagttg gctgtggtat ataaaaatat tcataatgat
6300

agtaggaggc ttgatagggt taagaatagt ttttactgta ctttctatag tgaatagagt
6360

taggaaggga tactcaccat tatcgttcca gaccaccgc ccagctccag ggggacccga
6420

caggcccgaa ggaatcgaag aagaagggtg agagagagac agagaaagat ccaatcaatt
6480

agtggatgga ttcttagcaa ttatctgggt cgacctgcgg aacctgtgcc tcttcagcta
6540

ccaccgcttg agagacttac tcttgattgc aacgaggatt gtggaacttc tgggacgcag
6600

ggggtgggaa gccctcaaat attggtggaa tctcctgcag tattggagtc aggaactgaa
6660

gaatagtgtc gttagcttgc ttaatgccat agccatagca gtagctgagg ggacagatag
6720

aattatagaa gtagtacaaa gggggggttag agctgttctt aacataacca caagaataag
6780

acagggagcg gaaaggcttc ttgtataaga tgggtggcaa gttgtcaaaa agtaagatgc
6840

ctggatggtc tactataagg gaaagaatga gacgagctca gccagcagca gagccagcag
6900

cagttgggggt gggagcagca tctcgagacc tggaaagaca tggagcactc acaagtagca
6960

atacagcagc taacaatgct gattgtgcct ggctagaagc acaagaggac gaggaagtgg
7020

gttttccagt cagacctcag gtacctctta ggccaatgac ttacaaggga gctgtagatc
7080

ttagccactt tttaaaagaa aaggggggac tgggaagggt agtttactcc caaaaaagac
7140

aagacatcct tgatctgtgg gtctaccaca cacaaggcta cttccctgat tggcagaact
7200

acacaccagg gccagggatc agatatcccc tgacctttgg atggtgcttc aagctagtac
7260

cagttgatcc agataaggta gaagaggcca atgaaggaga gaacaactgc ttattacacc
 7320
 ctatggccca gcatgggatg gatgaccag agaaagaagt gttagtgtgg aagtttgaca
 7380
 gccgcctagc atttcatcac atggcccag agctgcatcc ggagtactac aaagactgct
 7440
 gagcgccgc cctgcaggtc gacctcgagg gggggcccgg taccttaatt aattaaggta
 7500
 ccaggtaagt gtaccaatt cgccctatag tgagtcgtat tacaattcac tcgatcgccc
 7560
 ttcccaacag ttgcgcagcc tgaatggcga atggagatcc aatttttaag tgtataatgt
 7620
 gttaaactac tgattctaatt tgttgtgta ttttagattc acagtcccaa ggctcatttc
 7680
 agggccctca gtcctcacag tctgttcag atcataatca gccataccac atttgtagag
 7740
 gttttacttg ctttaaaaaa cctcccacac ctccccctga acctgaaaca taaaatgaat
 7800
 gcaattgttg ttgttaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata aagcaatagc
 7860
 atcacaaatt tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtgtg tttgtccaaa
 7920
 ctcacaaatg tatcttaacg cgtaaattgt aagcgtaaat gcttcacgac cacgctgatg
 7980
 agctttaccg cagctgcctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc tgacacatgc
 8040
 agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc
 8100
 agggcgctc agcgggtggt ggcggtgtc ggggcgcagc catgaccag tcacgtagcg
 8160
 atagcggagt gtatactggc ttaactatgc ggcacagag cagattgtac tgagagtga
 8220
 ccatatatgc ggtgtgaaat accgcacaga tgcgtaagga gaaaataccg catcaggcgc
 8280
 tcttccgctt cctcgctcac tgactcgctg cgctcggtcg ttcggctgcg gcgagcggta
 8340
 tcagctcact caaaggcggg aatacgggta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag
 8400
 aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg
 8460
 tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg
 8520

tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg
 8580
 cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga
 8640
 agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc
 8700
 tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt
 8760
 aactatcgtc ttgagtccaa cccggttaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact
 8820
 ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg
 8880
 cctaactacg gctacactag aaggacagta tttggatatct gcgctctgct gaagccagtt
 8940
 accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcgg
 9000
 ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct
 9060
 ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg
 9120
 gtcataaaca ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat acaaggggtg ttatgagcca
 9180
 tattcaacgg gaaacgtctt gctcgaggcc gcgattaaat tccaacatgg atgctgattt
 9240
 atatgggtat aaatgggctc gcgataatgt cgggcaatca ggtgcgacaa tctatcgatt
 9300
 gtatgggaag cccgatgcgc cagagttggt tctgaaacat ggcaaaggta gcgttgccaa
 9360
 tgatgttaca gatgagatgg tcagactaaa ctggctgacg gaatttatgc ctcttccgac
 9420
 catcaagcat tttatccgta ctctgatga tgcattggtta ctaccactg cgatccccgg
 9480
 gaaaacagca ttccaggtat tagaagaata tcctgattca ggtgaaaata ttgttgatgc
 9540
 gctggcagtg ttcctgcgcc ggttgcatc gattcctgtt tgtaattgtc cttttaacag
 9600
 cgatcgcgta tttcgtctcg ctcaggcgca atcacgaatg aataacgggt tggttgatgc
 9660
 gagtgatctt gatgacgagc gtaatggctg gcctgttgaa caagtctgga aagaaatgca
 9720
 taagcttttg ccattctcac cggattcagt cgtcactcat ggtgatttct cacttgataa
 9780
 ccttattttt gacgagggga aattaatagg ttgtattgat gttggacgag tcggaatcgc

9840

agaccgatac caggatcttg ccatacctatg gaactgcctc ggtgagtttt ctccttcatt
9900

acagaaacgg ctttttcaaa aatatggtat tgataatcct gatatgaata aattgcagtt
9960

tcatttgatg ctcgatgagt ttttctaaga attc
9994

<210> 2

<211> 4981

<212> ADN

<213> VIS/VIH

<400> 2

cgcccgaaca gggacttgaa ggagagtgag agactcctga gtacggctga gtgaaggcag
60

taagggcggc aggaaccaac cacgacggag tgctcctata aaggcgcggg tcggtaccag
120

acggcgtgag gagcgggaga ggaagaggcc tccggttgca ggtgagtgca acacaaaaaa
180

gaaatagctg tcttttatcc aggaaggggt aataagatag agtgggagat gggcgtgaga
240

aactccgtct tgtcagggaa gaaagcagat gaattagaaa aaattaggct acgacccaac
300

ggaaagaaaa agtacatggt gaagcatgta gtatgggcag caaatgaatt agatagattt
360

ggattagcag aaagcctggt ggagaacaaa gaaggatgtc aaaaaatact ttcggtctta
420

gtccattag tgccaacagg ctcagaaaaat ttaaaaagcc ttataatac tgtctgcgtc
480

atctggtgca ttcacgcaga agagaaagtg aaacacactg aggaagcaaa acagatagtg
540

cagagacacc tagtggtgga aataggaaca acagaaacta tgccaaaaac aagtagacca
600

acagcaccat ctagcggcag aggaggaaat tacccagtac aacaaatagg tggtactat
660

gtccacctgc cattaagccc gagaacatta aatgcctggg taaaattgat agaggaaaag
720

aaatttggag cagaagtagt gccaggattt caggcactgt cagaagggtg cccccctat
780

gacattaatc agatgttaaa ttgtgtggga gaccatcaag cggctatgca gattatcaga
840

gatattataa acgaggaggc tgcagattgg gacttcagc acccacaacc agctccacaa
900

caaggacaac ttagggagcc gtcaggatca gatattgcag gaacaactag ttcagtagat

5

960

gaacaaatcc agtggatgta cagacaacag aaccccatac cagtaggcaa catttacagg
1020

agatggatcc aactgggggtt gcaaaaatgt gtcagaatgt ataaccaaac aaacattcta
1080

gatgtaaaac aagggccaaa agagccattt cagagctatg tagacagggtt ctacaaaagt
1140

ttaagagcag aacagacaga tgcagcagta aagaattgga tgactcaaac actgctgatt
1200

caaaatgcta acccagattg caagctagtg ctgaaggggc tgggtgtgaa tcccacccta
1260

gaagaaatgc tgacggcttg tcaaggagta ggggggcccg gacagaaggc tagattaatg
1320

gcagaagccc tgaaagaggc cctcgcacca gtgcctatcc cttttgcagc agcccaacag
1380

aggggaccaa gaaagccaat taagtgttgg aattgtggga aagagggaca ctctgcaagg
1440

caatgcagag ccccaagaag acagggatgc tggaaatgtg gaaaaatgga ccatgttatg
1500

gccaaatgcc cagacagaca ggcgggtttt ttaggccttg gtccatgggg aaagaagccc
1560

cgcaatttcc ccatggctca agtgcacag gggctgatgc caactgctcc ccagaggac
1620

ccagctgtgg atctgctaaa gaactacatg cagttgggca agcagcagag agaaaagcag
1680

agagaaagca gagagaagcc ttacaaggag gtgacagagg atttgctgca cctcaattct
1740

ctctttggag gagaccagta gtcactgctc atattgaagg acagcctgta gaagtattac
1800

tggatacagg ggctgatgat tctattgtaa caggaataga gttagggtcca cattataccc
1860

caaaaatagt aggaggaata ggagggttta ttaatactaa agaatacaaa aatgtagaaa
1920

tagaagtttt aggcaaaagg attaaagga caatcatgac aggggacacc ccgattaaca
1980

tttttggtag aaatttgcta acagctctgg ggatgtctct aaattttccc atagctaaag
2040

tagagcctgt aaaagtgcgc ttaaagccag gaaagaatgg accaaaattg aagcagtggc
2100

cattatcaaa agaaaagata gttgcattaa gagaaatctg ggaaaagatg gaaaaggatg
2160

gtcagttgga ggaagctccc ccgaccaatc catacaacac cccacattt gctataaaga
2220

aaaaggataa gaacaaatgg agaatgctga tagatttttag ggaactaaat aggggtcactc
2280

aggacttttac ggaagtccaa ttaggaatac cacaccctgc aggattagca aaaaggaaaa
2340

gaattacagt actggatata ggtgatgcat atttctccat acctctagat gaagaattta
2400

ggcagtacac tgcctttact ttaccatcag taaataatgc agagccagga aaacgataca
2460

tttataaggt tctgcctcag ggatggaagg ggtcaccagc catcttccaa tacactatga
2520

gacatgtgct agaacccttc aggaaggcaa atccagatgt gaccttagtc cagtatatgg
2580

atgacatctt aatagctagt gacaggacag acctggaaca tgacagggta gttttacagt
2640

caaaggaact cttgaatagc atagggtttt ctaccccaga agagaaattc caaaaagatc
2700

ccccatttca atggatgggg tacgaattgt ggccaacaaa atggaagttg caaaagatag
2760

agttgccaca aagagagacc tggacagtga atgatataca gaagttagta ggagtattaa
2820

attgggcagc tcaaatttat ccaggtataa aaaccaaaca tctctgtagg ttaattagag
2880

gaaaaatgac tctaacagag gaagttcagt ggactgagat ggcagaagca gaatatgagg
2940

aaaataaaat aattctcagt caggaacaag aaggatgtta ttaccaagaa ggcaagccat
3000

tagaagccac ggtaataaag agtcaggaca atcagtgggc ttataaaatt caccaagaag
3060

acaaaatact gaaagtagga aaatttgcaa agataaagaa tacacatacc aatggagtga
3120

gactatttagc acatgtaata cagaaaatag gaaaggaagc aatagtgatc tggggacagg
3180

tcccaaaatt ccacttacca gttgagaagg atgtatggga acagtgggtg acagactatt
3240

ggcaggtaac ctggataccg gaatgggatt ttatctcaac accaccgcta gtaagattag
3300

tcttcaatct agtgaaggac cctatagagg gagaagaaac ctattataca gatggatcgt
3360

gtaataaaca gtcaaaagaa gggaaagcag gatatatcac agataggggc aaagacaaag
3420

taaaagtgtt agaacagact actaatcaac aagcagaatt ggaagcattt ctcatggcat
3480

tgacagactc agggccaaag gcaaataatta tagtagattc acaatatggt atgggaataa
 3540
 taacaggatg ccctacagaa tcagagagca ggctagttaa tcaaataata gaagaaatga
 3600
 ttaaaaagtc agaaatttat gtagcatggg taccagcaca caaagggtata ggaggaaacc
 3660
 aagaaataga ccacctagtt agtcaaggga ttagacaagt tctcttcttg gaaaagatag
 3720
 agccagcaca agaagaacat gataaatacc atagtaatgt aaaagaattg gtattcaaatt
 3780
 ttggattacc cagaatagtg gccagacaga tagtagacac ctgtgataaa tgccatcaga
 3840
 aaggagaggc tatacatggg caggtaaatt cagatctagg gacttggcaa atggattgta
 3900
 cccatctaga gggaaaaata atcatagttg cagtacatgt agctagtgga ttcatagaag
 3960
 cagaggtaat tccacaagag acaggaagac agacagcact atttctgtta aaattggcag
 4020
 gcagatggcc tattacacat ctacacacag ataatgggtg taactttgct tcgcaagaag
 4080
 taaagatggt tgcattggtg gcagggatag agcacacctt tggggtagca tacaatccac
 4140
 agagtcaggg agtagtgga gcaatgaatc accacctgaa aaatcaaata gatagaatca
 4200
 gggaacaagc aaattcagta gaaaccatag tattaatggc agttcattgc atgaatttta
 4260
 aaagaagggg aggaataggg gatatgactc cagcagaaag attaattaac atgatcacta
 4320
 cagaacaaga gatacaattt caacaatcaa aaaactcaaa atttaaaaat tttcgggtct
 4380
 attacagaga aggcagagat caactgtgga agggacccgg tgagctattg tggaaagggg
 4440
 aaggagcagt catcttaaag gtagggacag acattaaggt agtaccaga agaaaggcta
 4500
 aaattatcaa agattatgga ggaggaaaag aggtggatag cagttccac atggaggata
 4560
 ccggagaggg tagagagggt gcatagcctc ataaaatatt tgaaatataa aactaaagat
 4620
 ctacaaaagg tttgctatgt gccccatttt aaggtcggat gggcatgggt gacctgcagc
 4680
 agagtaattt tcccactaca ggaaggaagc catttagaag tacaagggtt ttggcatttg
 4740
 acaccagaaa aagggtggct cagtacttat gcagtggaga taacctggta ctcaaagaac

4800

ttttggacag atgtaacacc aaactatgca gacattttac tgcatagcac ttattttccct
4860

tgctttacag cgggagaagt gagaagggcc atcaggggag aacaactgct gtcttgctgc
4920

aggttcccga gagctcataa gcaccaggta ccaagcctac agtacttagc actgaaagta
4980

g
4981

<210> 3

<211> 472

<212> ADN

5 <213> VIS/VIH

<400> 3

atggaggagg aaaagagggtg gatagcagtt cccacatgga ggataccgga gaggttagag
60

agggtggcata gcctcataaa atatctgaaa tataaaacta aagatctaca aaaggtttgc
120

tatgtgcccc attttaaggt cggatgggca tgggtggacct gcagcagagt aatcttccca
180

ctacaggaag gaagccattt agaagtacaa gggatttggc atttgacacc agaaaaaggg
240

tggctcagta cttatgcagt gaggataacc tgggtactcaa agaacttttg gacagatgta
300

acaccaaact atgcagacat tttactgcat agcacttatt tcccttgctt tacagcggga
360

gaagtgagaa gggccatcag gggagaacaa ctgctgtctt gctgcagggt cccgagagct
420

cataagcacc aggtaccaag cctacagtac ttagcactga aagtagtaag cg
472

<210> 4

10 <211> 2376

<212> ADN

<213> VIH

<400> 4

cgcccgaaca gggacgcgaa agcgaaagta gaaccagagg agctctctcg acgcaggact
60

cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccattt
120

ttgactagcg gaggctagaa ggagagagat ggggtgcgaga gcgtcaatat taagcggggg
180

acaattagat agatgggaaa aaattcggtt acggccaggg ggaaagaaaa gatataagtt
240

15

aaaacatata gtatgggcaa gcagagagct agaacgattc gcagttaacc ctggcctgtt
 300
 agaaacagca gaaggctgta gacaaatact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg
 360
 atcagaggaa cttaaatacat tatttaatac aatagctacc ctctattgtg tacatcaaag
 420
 aatagagata aaagacacca aggaagcttt agataagata gaggaagagc aaaacaaaag
 480
 taagaaaaaa gcacagcaag cagcagctga cacaggaaac agcagcagcc aagtcagcca
 540
 aaattaccct atagtgcaga acgctcaggg acaaattgga catcaggcca tatcacctag
 600
 aacttttaaat gcatgggtaa aagtagtaga agaaaaggct ttttaaccag aagtaatacc
 660
 catgtttgca gcattgtcag aaggagccac cccacaagat ttaaacacca tgctaaacac
 720
 agtgggggga catcaagcag ccatgcaaatt attaaaagag actatcaatg aggaagctgc
 780
 agaattgggat agattgcatc cagtacatgc agggcctatt gcaccaggcc aaatgagaga
 840
 accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caggaacaaa taggatggat
 900
 gacaaataat ccacctatcc cagtaggaga aatctataaa aaatggataa tcatgggatt
 960
 aaataaaaatt gtaaggatgt atagccctac cagtattctg gacataagac aaggaccaa
 1020
 ggaacccttt agagactatg tagaccggtt ctataaaact ctaagagccg agcaagcttc
 1080
 acaggaagta aaaaattgga tgacagaaac cttgttggtc caaaattcaa accccgattg
 1140
 taagactatt ttaaaagcat taggaccagg agctacacta gaagaaatga tgacagcatg
 1200
 ccaggggagt ggaggacctg gccataaagc aagagttttg gcagaagcaa tgagccaagt
 1260
 aacaaatcca acggccgtga tgatgcagaa aagcaatttt aggggccaaa gaaaaattgt
 1320
 taagtgtttt aattgtggca aagaaggga catagccaaa aattgcaggg ctctagaaa
 1380
 aaagggtgtg tggaaatgtg gaaaggaagg acaccaaattg aaagattgta ctgaaagaca
 1440
 ggctaatttt ttagggaaga tctggccttc ctacaaggga aggccaggga attttcctca
 1500
 aagcaggcta gaaccaacag cccaccaga agcgagcttc aggtttgggg aggagacaac

1560

aactccccct cagaagcagg agacgataga caaggaggtg tatcctttaa cctccctcag
1620

atcactcttt ggcaacgacc cctcgtcaca ataaagatag gggggcaact aaaagaagct
1680

ctattagata caggagcaga tgatacagtg ttagaagaca tgaatttgcc aggaaaatgg
1740

aaacccaaaa tgataggggg aattggagga tttatcaaag taaaacagta tgatcagata
1800

cccatagaaa tctgtggaca taaaactata ggtacagtat taataggacc tacacctgtc
1860

aacataattg gaaggaattt gttgactcag cttgggtgca ctttaaattt tcccattagt
1920

cctattgaaa ctgtaccagt aaaattaaag ccaggaatgg atggcccaaa agttaagcaa
1980

tggccattga cagaagaaaa aataaaagca ttaatggaga tatgcacaga aatggaaaag
2040

gaagggaaaa tttcaaaaat tgggcctgaa aatccataca atactccagt gtttggcata
2100

aagaaaaaag acagtactaa gtggagaaaa ttagtagatt tcagagaact taataagaaa
2160

actcaagact tctgggaggt tcaattagga ataccacatc ccgcgggggtt aaaaaagaaa
2220

aagtcagtaa cagtactgga tgtgggtgat gcatacttct cagttccctt agatgaagat
2280

tttaggaagt atactgcatt taccatacct agtataaaca atgagacatc aggaattaga
2340

tatcagtaca atgtgcttcc acagggatgg aaaggg
2376

<210> 5

<211> 411

<212> ADN

<213> VIH

5

<400> 5

aacagcaggg actttccaca aggggatggt acggggaggt actggggagg agccggtcgg
60

gaacgccac tttcttgatg tataaatatc actgcatttc gctctgtatt cagtcgtctt
120

gcggagaggg tggcaggttg agccctggga ggttctctcc agcactagca ggtagagcct
180

gggtgttccc tgctagactc tcaccagcac ttggccggtg ctgggcagag tgattccacg
240

cttgcttgct taaagccctc ttcaataaag ctgccatttt agaagtaagc tagtgtgtgt

300

tcccatctct cctagccgcc gcctggtcaa ctcggtactc aataataaga agaccctggt
360

ctgttaggac cctttctgct ttgggaaacc gaagcaggaa aatccctagc a
411

<210> 6

<211> 481

<212> ADN

5 <213> SV40

<400> 6

tcgagggggg gcccggtacc ttaattaatt aaggtaccag gtaagtgtac ccaattcgcc
60

ctatagttag tcgtattaca attcactcga tcgcccttcc caacagttgc gcagcctgaa
120

tggcgaatgg agatccaatt tttaagtgtg taatgtgtta aactactgat tctaattggt
180

tgtgtatttt agattcacag tcccaaggct catttcaggc ccctcagtcc tcacagtctg
240

ttcatgatca taatcagcca taccacattt gtagagggtt tacttgcttt aaaaaacctc
300

ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttggtgt taacttggtt
360

attgcagctt ataatgggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac aaataaagca
420

tttttttcac tgcattctag ttgtgggttg tccaaactca tcaatgtatc ttaacgcgta
480

a
481

<210> 7

10 <211> 818

<212> ADN

<213> VIS

<400> 7

15

tggaagggat ttattacagt gcaagaagac atagaatctt agacatgtac ttagaaaagg
 60
 aaaaaggcat cataccagat tggcaggatt acacctcagg accaggaatt agatacccaa
 120
 agacatttgg ctggctatgg aaattagtcc ctgtaaattgt atcagatgag gcacaggagg
 180
 atgaagagca ttattttaatg catccagctc aaacttccca gtgggatgac ccttggagag
 240
 aggttctagc atggaagttt gatccaactc tggcctacac ttatgaggca tatgttagat
 300
 acccagaaga gtttggaagc aagtcaggcc tgtcagagga agaggttaaa agaaggctaa
 360
 ccgcaagagg ctttcttaac atggctgaca agaaggaaac tcgctgaaac agcagggact
 420
 ttccacaagg ggatgttacg gggagggtact ggggaggagc cggtcgggaa cgcccacttt
 480
 cttgatgtat aaatatcact gcatttcgct ctgtattcag tcgctctgag gagaggctgg
 540
 caggttgagc cctgggaggt tctctccagc actagcaggt agagcctggg tgttccctgc
 600
 tagactctca ccagcacttg gccggtgctg ggcagagtga ttccacgctt gcttgcttaa
 660
 agccctcttc aataaagctg ccattttaga agtaagctag tgtgtgttcc catctctcct
 720
 agccgccgcc tgggtcaactc ggtactcaat aataagaaga ccctgggtctg ttaggaccct
 780
 ttctgctttg ggaaaccgaa gcaggaaaat ccctagca
 818

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición inmunogénica de ADN contra el VIH, que comprende una molécula de ADN aislada que tiene una secuencia que codifica una pluralidad de proteínas víricas seleccionadas del grupo que consiste en las proteínas gag, pro, vpx, vpr, nef y tat de VIH o VIS, capaz de estimular una respuesta inmunológica contra el VIH, en la que dicha molécula de ADN es incapaz de codificar proteínas funcionales de transcriptasa inversa, integrasa y Vif, y en la que además una repetición terminal larga 3' de dicha molécula de ADN está al menos parcialmente alterada.
- 2.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula de ADN comprende además una secuencia de promotor de VIS natural.
- 3.- Una composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, derivada de un genoma vírico que codifica al menos una proteína capaz de proporcionar una respuesta inmunológica contra el VIH y que tiene una repetición terminal larga 5' y una repetición terminal larga 3', un gen rt, un gen int, y un gen vif, en la que la composición inmunogénica de ADN se ha hecho no patogénica mediante la alteración del gen rt, el gen int, el gen vir, y la repetición terminal larga 3'.
- 4.- Una composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, que comprende la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:1.
- 5.- Una composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, que comprende: (a) la 5' LTR de VIS; (b) el gen gag de VIH; (c) el gen pro de VIH; (d) el gen vpx de VIS; (e) el gen vpr de VIS; (f) el gen nef de VIH; (g) el gen tat de VIH; (h) el gen rev de VIH; (i) el gen env de VIH; y (j) una secuencia de poliadenilación de SV40.
- 6.- Una composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 1 o la reivindicación 3, que comprende una molécula de ADN aislada que tiene: (a) una secuencia de promotor procedente de la 5' LTR de VIS que está unida operablemente; (b) una secuencia que codifica una pluralidad de proteínas víricas capaces de estimular una respuesta inmunológica contra el VIH seleccionada del grupo de secuencias codificadoras que consiste en los genes gag, pro, tat, rev, vpu, env, vpx, vpr y nef de VIS o VIH, en la que dicha molécula de ADN es incapaz de codificar proteínas funcionales de transcriptasa inversa, integrasa y Vif, y que contiene una alteración al menos parcial de la repetición terminal larga 3' de dicha molécula de ADN, y que está unida operablemente; y (c) una secuencia de poliadenilación de SV40.
- 7.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 6, en la que el promotor proviene de la 5' LTR de VIS identificada en la presente como SEQ ID NO:7.
- 8.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 6, en la que la secuencia que codifica la pluralidad de proteínas víricas capaces de estimular una respuesta inmunológica se selecciona del grupo de secuencias codificadoras que consiste en los genes gag, pro, tat, rev, vpu, env, y nef de VIH, y los genes vpx y vpr de VIS.
- 9.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 6, en la que la secuencia de poliadenilación es la secuencia de poliadenilación de SV40 identificada en la presente como SEQ ID NO:6.
- 10.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 3, que comprende además una secuencia de poliadenilación sustituida en la región de la repetición terminal larga 3' alterada.
- 11.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 1, en la que la molécula de ADN comprende además una secuencia que codifica una citoquina.
- 12.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 3, que comprende además una citoquina.
- 13.- La composición inmunogénica de ADN de la reivindicación 12, en la que la citoquina comprende GM-CSF.
- 14.- Una composición inmunogénica de ADN de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5, o la reivindicación 6, para su uso como una vacuna para inducir una respuesta inmunológica contra el VIH en un individuo.
- 15.- La composición según la reivindicación 14 para según la reivindicación 14, en el que el individuo es VIH-1 positivo.

16.- La composición según la reivindicación 14 para su uso según la reivindicación 14, en el que la vacuna comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

17.- La composición según la reivindicación 14 para su uso según la reivindicación 14, en el que la composición inmunogénica de ADN comprende además una citoquina, en la que la citoquina comprende GM-CSF.

Figura 1: Diagrama esquemático de la construcción de ADN $\Delta 4$ -SHIVku2

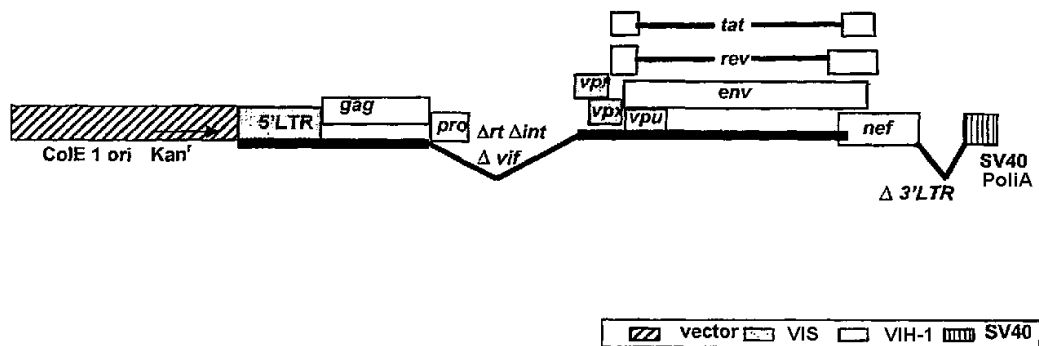
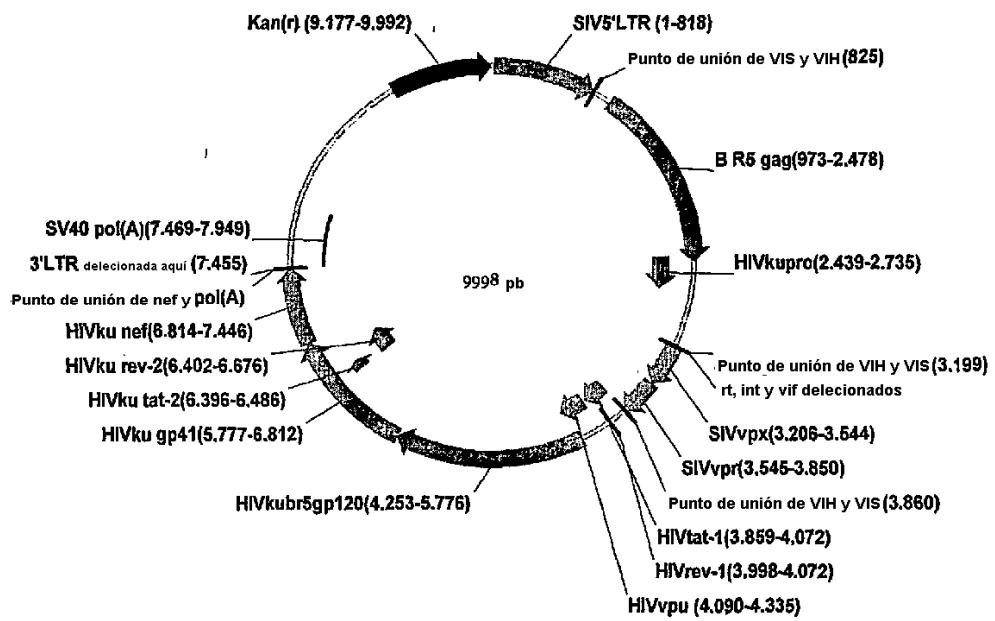


Figura 2. Diagrama circular de la construcción de ADN $\Delta 4$ -SHIV_{ku2}



Delta 4 SHIVku2 BR5gag/BR5env/nef