

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 330**

51 Int. Cl.:

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 35/76 (2015.01)

C07K 14/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2006 E 06743016 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 1880012**

54 Título: **Composición de vacuna**

30 Prioridad:

12.05.2005 US 680389 P

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

22.09.2015

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ERTL, PETER FRANZ;
TITE, JOHN PHILIP y
VAN WELY, CATHERINE ANN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 546 330 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

Composición de vacuna

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a vectores de virus que comprenden oligonucleótidos que codifican polipéptidos de VIH, más en particular, aquellos en los que el vector de virus es un adenovirus. En particular, tales adenovirus son adenovirus de primate no humano tales como adenovirus de simios, más en particular adenovirus de chimpancé. En particular, la invención se refiere a vectores de adenovirus que comprenden secuencias polinucleotídicas de VIH que codifican múltiples antígenos diferentes del VIH, por ejemplo dos o tres o más antígenos del VIH. La invención se refiere además a procedimientos para preparar los vectores de virus, a los vectores de virus producidos por los procedimientos y al uso de los vectores en medicina, en especial para la vacunación profiláctica o terapéutica.

10 El VIH-1 es la causa principal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que se considera como uno de los mayores problemas mundiales de salud. Aunque se ha llevado a cabo una extensiva investigación en todo el mundo, los esfuerzos por producir una vacuna no han tenido éxito hasta la fecha.

15 El VIH-1 es un virus ARN de la familia Retroviridae. El genoma del VIH codifica al menos nueve proteínas que se dividen en tres clases: las principales proteínas estructurales Gag, Pol y Env, las proteínas reguladoras Tat y Rev, y las proteínas accesorias Vpu, Vpr, Vif y Nef. El genoma del VIH presenta la organización 5'LTR-gag-pol-env-LTR3' de todos los retrovirus.

20 El adenovirus es un virus ADN de doble cadena con un tamaño de genoma de aproximadamente 36 kb que se ha usado extensamente para aplicaciones de transferencia génica debido a su capacidad para alcanzar una transferencia génica de alta eficacia en una diversidad de tejidos diana y una gran capacidad del transgén. Convencionalmente, los genes E1 de adenovirus se eliminan o reemplazan por un casete transgénico consistente en el promotor de elección, secuencia de ADNc del gen de interés y una señal de poliA, dando lugar a un virus recombinante de replicación defectuosa.

25 Los adenovirus tienen una morfología característica con una cápside icosaédrica consistente en tres proteínas principales, hexón (II), base pentón (III) y una fibra con protuberancias (IV), junto con una serie de otras proteínas minoritarias, VI, VIII, IX, IIIa y IVa2 (Russell W.C. 2000, Gen Virol, 81:2573-2604). El genoma del virus es un ADN de doble cadena lineal con una proteína terminal unida covalentemente al extremo 5', que tiene repeticiones terminales invertidas (ITR). El virus ADN está íntimamente asociado con la proteína altamente básica VII y un pequeño péptido denominado mu. Otra proteína, V, está compactada con este complejo ADN - proteína y proporciona una unión estructural a la cápside a través de la proteína VI. El virus también contiene una proteasa codificada por el virus que es necesaria para procesar parte de las proteínas estructurales para producir virus infecciosos maduros.

30 Se han aislado más de 100 serotipos distintos de adenovirus que infectan diversas especies de mamíferos, 51 de los cuales son de origen humano. Ejemplos de tales adenovirus de origen humano son Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad24, Ad34, Ad35. Los serotipos humanos se han clasificado en seis subgéneros (A-F) basándose en una serie de criterios biológicos, químicos, inmunológicos y estructurales. [página 1, documento WO 04018627]

35 Aunque los vectores basados en Ad5 se han usado extensamente en una serie de ensayos de terapia génica, pueden existir limitaciones sobre el uso de Ad5 y otros vectores de adenovirus del grupo C debido a la inmunidad preexistente en la población general debida a la infección natural. El Ad5 y otros miembros del grupo C tienden a estar entre los serotipos más seroprevalentes. Se puede desarrollar inmunidad a vectores existentes como resultado de exposición al vector durante el tratamiento. Estos tipos de inmunidad preexistente o desarrollada a vectores seroprevalentes pueden limitar la eficacia de la terapia génica o los esfuerzos de vacunación. Serotipos de adenovirus alternativos constituyen de este modo importantes dianas en la búsqueda del sistema de liberación génica capaces de evadir la respuesta inmunitaria del huésped.

40 Una de tales áreas de serotipos alternativos son los de primates no humanos, en especial adenovirus de chimpancé. Véase la patente de Estados Unidos 6.083.716 que describe el genoma de dos adenovirus de chimpancé.

45 Se ha mostrado que los vectores adenovíricos del chimpancé ("Pan" o "C") inducen potentes respuestas inmunitarias a productos transgénicos de forma tan eficaz como los vectores adenovíricos humanos (Fitzgerald y col. J. Immunol. 170:1416).

50 Las proteínas de VIH Tat y Nef son proteínas tempranas, es decir, éstas son expresadas tempranamente en la infección y en ausencia de proteína estructural.

55 El gen Nef codifica una proteína de VIH accesoria temprana que ha demostrado poseer diversas actividades. Por ejemplo, la proteína Nef se conoce por causar la supresión de CD4, el receptor de VIH, de la superficie celular, aunque la importancia biológica de esta función se está debatiendo. Además, Nef interacciona con la vía de señalización de los linfocitos T e induce un estado activo, que a su vez puede promover una expresión génica más eficiente. Algunos aislados de VIH tienen mutaciones en esta región, lo que causa que éstos no codifiquen proteína

funcional y están gravemente comprometidos en su replicación y patogénesis in vivo.

El gen Gag se traduce desde el ARN de longitud completa proporcionando una poliproteína precursora que seguidamente se escinde en las proteínas de la cápside 3 – 5; la proteína de matriz, proteína de cápside y proteína de unión a ácido nucleico y proteasa. (Fundamental Virology, Fields BN, Knipe DM y Howley M 1996 2. Fields Virology vol 2 1996).

El gen Gag da lugar a la proteína precursora Gag de 55 kilodalton (kD), también denominada p55, que se expresa a partir del ARNm vírico sin ayustar. Durante la traducción, el extremo terminal N de p55 se miristoíla, desencadenando su asociación con el aspecto citoplásmico de las membranas celulares. La poliproteína Gag asociada a la membrana recluta dos copias del ARN genómico vírico junto con otras proteínas víricas y celulares que desencadenan la generación de la partícula vírica de la superficie de una célula infectada. Después de generar, el p55 se escinde por la proteasa codificada víricamente (un producto del gen Pol) durante el proceso de maduración vírica en cuatro proteínas más pequeñas denominadas MA (matriz [p17]), CA (cápside [p24]), NC (nucleocápside [p9]) y p6.(4).

Además de las 3 proteínas Gag principales (p17, p24 y p9), todos los precursores Gag contienen otras regiones diferentes, que se escinden y permanecen en el virión como péptidos de diversos tamaños. Estas proteínas tienen diferentes funciones, por ejemplo, la proteína p2 tiene una función propuesta en la regulación de la actividad de la proteasa y contribuye a la correcta programación del procesado proteolítico.

El polipéptido MA deriva del extremo N-terminal miristoilado de p55. La mayoría de moléculas MA permanece unida a la superficie interna de la bicapa lipídica del virión, estabilizando la partícula. Un subgrupo de MA es reclutado en el interior de capas más profundas del virión en las que forma parte del complejo que escolta el ADN vírico al núcleo. Estas moléculas de MA facilitan el transporte nuclear del genoma vírico debido a que una señal cariográfica en MA es reconocida por la maquinaria de importación nuclear celular. Este fenómeno permite al VIH infectar células no divisibles, una propiedad inusual para un retrovirus.

La proteína p24 (CA) forma el núcleo cónico de partículas víricas. Se ha demostrado que la ciclofilina A interacciona con la región p24 de p55 conduciendo a su incorporación en partículas del VIH. La interacción entre Gag y ciclofilina A es esencial debido a que la interrupción de esta interacción por ciclosporina A inhibe la replicación vírica.

La región NC de Gag es responsable de reconocer específicamente la señal denominada de compactación del VIH. La señal de compactación consiste en cuatro estructuras en forma de horquilla y bucle situadas cerca del extremo 5' del ARN vírico y es suficiente para mediar en la incorporación de un ARN heterólogo en viriones de VIH-1. NC se une a la señal de compactación por medio de interacciones mediadas por dos motivos de cinco aminoácidos. NC también facilita la transcripción inversa.

La región del polipéptido p6 media en las interacciones entre Gag de p55 y la proteína Vpr accesoria, conduciendo a la incorporación de Vpr en viriones ensamblados. La región p6 también contiene un dominio denominado tardío que es requerido para una liberación eficaz de viriones generados desde una célula infectada.

El gen Pol codifica tres proteínas que tienen las actividades necesarias por el virus en la infección temprana, transcriptasa inversa RT, proteasa y la proteína integrasa necesaria para la integración de ADN vírico en el ADN celular. El producto primario de Pol se escinde por la proteasa del virión proporcionando un péptido RT amino terminal que contiene actividades necesarias para la síntesis de ADN (ADN polimerasa dirigida por ARN y ADN, ribonucleasa H) y proteína integrasa del extremo carboxilo 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 ARNasa del extremo carboxilo.

RT es una de las proteínas más altamente conservadas codificadas por el genoma retrovírico. Dos actividades fundamentales de RT son la ADN Pol y Ribonucleasa H. La actividad ADN Pol de RT usa ARN y ADN como moldes de forma indistinta y, al igual que todas las ADN polimerasas conocidas es incapaz de iniciar la síntesis de ADN *de novo*, sino que requiere una molécula preexistente que sirva como cebador (ARN).

La actividad ARNasa H intrínseca en todas las proteínas RT desempeña la función esencial temprana en la replicación de eliminar el genoma del ARN a medida que transcurre la síntesis de ADN. Esto degrada de forma selectiva el ARN de todas las moléculas híbridas ARN - ADN. Estructuralmente, la polimerasa y ribo H ocupan dominios separados no solapados en el Pol que cubre los dos tercios amino del Pol.

La subunidad p66 catalítica se pliega en 5 subdominios distintos. Los 23 extremos amino terminales de estos tienen la porción con actividad RT. El extremo carboxilo terminal para estos es el dominio ARNasa H.

Después de la infección de la célula huésped, el genoma del ARN retrovírico se copia en dsADN lineales por la transcriptasa inversa que está presente en la partícula infecciosa. La integrasa (revisada en Skalka AM '99 Adv in Virus Res 52 271-273) reconoce los extremos del ADN vírico, los recorta y acompaña al ADN vírico a un sitio cromosómico 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*, ésta no es la única proteína

asociada con ADN vírico *in vivo* - el complejo ADN vírico - proteína grande aislado de las células infectadas se ha denominado complejo preintegración. Esto facilita la adquisición de los genes de células huésped por genomas víricos de la progeie.

5 La integrasa está constituida por 3 dominios distintos, el dominio N-terminal, el núcleo catalítico y el dominio C-terminal. El dominio del núcleo catalítico contiene todos los requerimientos para la química de transferencia de polinucleótido.

10 Los vectores de virus y en particular los vectores de adenovirus que contienen varios genes extraños no son siempre fáciles de producir. Pueden existir problemas con la estabilidad de los vectores, y dificultades con obtener una expresión eficaz de los genes insertados. En particular, no se han producido con éxito los adenovirus que contienen más de uno o más de dos polinucleótidos de VIH que se podrían usar en una vacuna.

15 Los adenovirus de primates no humanos se pueden aislar de los ganglios linfáticos mesentéricos de chimpancés. Los adenovirus de chimpancé son suficientemente similares al subtipo C de adenovirus humano para permitir la replicación del virus con E1 eliminado en células HEK 293. Todavía los adenovirus de chimpancé son filogenéticamente distintos de los serotipos humanos más comunes (Ad2 y Ad5). Pan 6 está relacionado menos estrechamente y es serológicamente distinto de Pan 5, 7 y 9.

Existen ciertas restricciones de tamaño asociadas con la inserción de ADN heterólogos en adenovirus. Los adenovirus humanos tienen la capacidad de compactarse hasta un 105 % de la longitud del genoma de tipo silvestre (Bett y col 1993, J Virol 67 (10), 5911-21). El límite de compactación inferior para adenovirus humanos se ha demostrado que es un 75% de la longitud del genoma de tipo silvestre (Parks y col 1995, J Virol 71(4), 3293-8).

20 Existe todavía la necesidad de descubrir una vacuna eficaz frente al VIH.

25 La presente invención proporciona un vector de adenovirus que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican al menos antígenos RT, Net y Gag de VIH o fragmentos inmunogénicos de los mismos dispuestos de modo que se transcriban en el orden Gag, RT, Net, de modo que la porción Gag se encuentre en el extremo N terminal de la proteína de fusión resultante, caracterizado porque el virus es un adenovirus de primate no humano y el virus es un adenovirus de chimpancé seleccionado de Pan 5, Pan 6 y Pan 7.

30 Se proporciona un vector de adenovirus con supresiones en una o más regiones, comprendiendo dicho vector un polinucleótido o polinucleótidos que codifican al menos tres antígenos o derivados inmunógenos de VIH o fragmentos inmunógenos de los mismos, siendo el vector capaz de expresar los antígenos o fragmentos o derivados en un huésped mamífero y siendo el tamaño de la supresión y el tamaño del polinucleótido o polinucleótidos de VIH tales que la longitud total del genoma del vector varía entre el 85 % y el 105 % de la longitud del genoma del virus de tipo silvestre.

35 En una realización de la presente invención, los antígenos de VIH codificados por el polinucleótido o polinucleótidos pueden ser Gag, Nef y Pol. En otra realización, Pol puede comprender sólo la porción RT. En otra realización más de la invención, el polinucleótido o polinucleótidos que codifican los antígenos de VIH pueden disponerse de modo que estos se transcriban en el orden Gag, RT, Nef, es decir, de modo que la porción Gag esté en el extremo N-terminal de la proteína de fusión resultante.

El tamaño del genoma del vector total puede variar por ejemplo de 90 a 100 % del tamaño del genoma del virus tipo silvestre, o de 95 a 100 % del tamaño del genoma de tipo silvestre. En una realización, el tamaño total del vector puede ser aproximadamente 96 % del tamaño del genoma del virus de tipo silvestre.

40 Antígenos de VIH particulares para la inclusión en los vectores de adenovirus son Pol, Nef y Gag o fragmentos inmunógenos de los mismos.

Dichos vectores de adenovirus se pueden formular con excipientes, vehículos, diluyentes o coadyuvantes farmacéuticamente aceptables para producir composiciones inmunógenas que incluyen medicamentos o composiciones de vacuna adecuadas para el tratamiento y/o la prevención de infección por VIH y SIDA.

45 Son de uso adenovirus que se diferencian de los serotipos prevalentes de origen natural en la población humana tal como Ad2 y Ad5. Esto evita la inducción de potentes respuestas inmunitarias contra el vector que limita la eficacia de las posteriores administraciones del mismo serotipo bloqueando la absorción del vector a través de la neutralización del anticuerpo e influyendo en la toxicidad.

50 Así, el adenovirus puede ser un adenovirus que no sea un serotipo de virus humano de origen natural prevalente. Los adenovirus aislados de animales tienen componentes de la cápside, hexón, pentón y fibra inmunológicamente diferenciados aunque filogenéticamente están muy relacionados. De forma específica, el virus puede ser un adenovirus no humano, tal como un adenovirus de simio en particular un adenovirus de chimpancé, tal como Pan 5, 6, 7 o 9. Ejemplos de dichas cepas se describen en el documento WO03/000283 y están disponibles en la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, y de otras fuentes. Cepas de adenovirus de chimpancé deseables son Pan 5 [ATCC VR-591], Pan 6 [ATCC VR-592] y Pan 7 [ATCC VR-593].

- Otros adenovirus adecuados incluyen, aunque sin limitación, adenovirus de chimpancé C1 y C68 (Pan9), descritos en la patente de Estados Unidos No. 6.083.716; y adenovirus de simios que incluyen, aunque sin limitación, SV1 [VR-195]; SV25 [SV-201]; SV35; SV15; SV-34; SV-36; SV-37, y adenovirus de babuino [VR-275], entre otros. Las secuencias de Pan 5 (también denominado C5), Pan 6 (también denominado C6), Pan 7 (también denominado C7), SV1, SV25 y SV39 se han descrito [documento WO 03/046124, publicado el 5 de junio de 2003]. Véase también la publicación de patente internacional No. WO 04/16614, que describe vectores de adenovirus híbridos y vectores construidos a partir de adenovirus SA18 de simio.
- Se cree que los adenovirus de chimpancé son ventajosos con respecto a los serotipos de adenovirus humanos por la falta de inmunidad preexistente, en particular, la falta de anticuerpos de neutralización cruzada, hacia adenovirus en la población diana. La reacción cruzada de los adenovirus de chimpancé con respuestas de anticuerpos neutralizantes preexistentes sólo está presente en el 2 % de la población diana comparado con el 35 % en el caso de ciertos vectores de adenovirus humanos candidatos. Los adenovirus de chimpancé son distintos de los subtipos humanos más comunes Ad2 y Ad5, pero están más estrechamente relacionados con el Ad4 humano del subgrupo E, que no es un subtipo prevalente. Pan 6 está menos estrechamente relacionado con Pan 5, 7 y 9.
- El adenovirus puede ser defectuoso en la replicación. Esto significa que tiene una capacidad reducida para replicarse en células sin complemento, comparado con el virus de tipo silvestre. Esto puede estar provocado por la mutación del virus, por ejemplo, eliminando un gen implicado en la replicación, por ejemplo, la supresión del gen E1a, E1b, E3 o E4.
- Los vectores de adenovirus pueden ser adenovirus defectuosos en la replicación que comprenden una supresión funcional E1. Así, los vectores de adenovirus pueden ser defectuosos en la replicación debido a la ausencia de la capacidad para expresar los genes E1a y E1b adenovíricos, es decir, se ha eliminado funcionalmente E1a y E1b. Los adenovirus recombinantes también pueden portar supresiones funcionales en otros genes [véase el documento WO 03/000283], por ejemplo, supresiones en los genes E3 o E4. El gen E3 temprano retardado de adenovirus se puede eliminar de la secuencia de adenovirus de simio que forma parte del virus recombinante. La función de E3 no es necesaria para la producción de la partícula de adenovirus recombinante. Así, es innecesario reemplazar la función de este producto génico con el fin de compactar un adenovirus de simio recombinante útil en la invención. En una realización particular, los adenovirus recombinantes (simio) tienen suprimidos funcionalmente los genes E1 y E3. La construcción de tales vectores se describe en Roy y col., Human Gene Therapy 15:519-530, 2004.
- También se pueden construir adenovirus recombinantes que tengan una supresión funcional del gen E4, aunque puede ser deseable retener la función ORF6 de E4. Los vectores de adenovirus también pueden contener una supresión en el gen temprano tardío E2a. También pueden realizarse supresiones en cualquiera de los genes tardíos L1 a L5 del genoma de adenovirus de simio. De igual modo, pueden ser útiles supresiones en los genes intermedios IX y IVa.
- Se pueden realizar otras supresiones en otros genes de adenovirus estructurales o no estructurales. Las supresiones anteriores se pueden usar individualmente, es decir, una secuencia de adenovirus para usar en la presente invención puede contener supresiones únicamente de E1. De forma alternativa, se pueden usar en cualquier combinación supresiones de genes completos o porciones de los mismos eficaces para destruir su actividad biológica. Por ejemplo, en un vector de ejemplo, las secuencias de adenovirus pueden tener supresiones de los genes E1 y el gen E4, o de los genes E1, E2a y E3, o de los genes E1 y E3 (tales como supresiones funcionales en E1a y E1b, y una supresión de al menos parte de E3), o de los genes E1, E2a y E4, con o sin supresión de E3 y así sucesivamente. Tales supresiones pueden ser supresiones parciales o completas de estos genes y se pueden usar en combinación con otras mutaciones, tales como mutaciones sensibles a la temperatura para conseguir un resultado deseado.
- Los vectores adenovíricos se pueden producir en cualquier línea de células adecuada en la que el virus sea capaz de replicarse. En particular, se pueden usar líneas de células complementarias que proporcionan los factores que faltan del vector vírico que dan como resultado sus características de replicación alteradas. Por ejemplo, una línea de células complementaria puede expresar E1, o E1 y E3, o E1, E3 y E4. Sin limitación, dicha línea de células puede ser células HeLa [No. de acceso de la ATCC CCL 2], A549 [No. de acceso de la ATCC CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo, Detroit 510, CCL 72] y WI-38 [CCL 75] entre otras. Estas líneas de células están disponibles todas de la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Se pueden obtener otras líneas de células precursoras adecuadas de otras fuentes, tales como células PER.C6© que se representan por las células depositadas con el número de ECACC 96022940 en la European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) en el Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR, Reino Unido).
- Se proporciona en otro aspecto un vector adenovírico que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican al menos antígenos de VIH RT, Nef y Gag o fragmentos inmunógenos de los mismos en el orden Gag, RT, Nef, es decir, un vector de adenovirus que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifica al menos antígenos de VIH RT, Nef y Gag o derivados inmunógenos o fragmentos inmunógenos de los mismos dispuestos de modo que estos se transcriban en el orden Gag, RT, Nef.

- 5 Por ejemplo, un vector de adenovirus de acuerdo con la invención puede comprender un polinucleótido que codifica Gag o un derivado inmunógeno o fragmento inmunógeno del mismo, fusionado con una secuencia polinucleotídica que codifica RT o un derivado inmunógeno o fragmento inmunógeno del mismo, fusionado con Nef o un derivado inmunógeno o fragmento inmunógeno del mismo y bajo el control de un único promotor heterólogo, en el que la porción Gag del gen está presente en el extremo 5' terminal del polinucleótido.
- 10 En una realización alternativa, cada uno de los tres antígenos se expresa a través de su propio promotor, cada uno de dichos promotores puede ser igual o distinto. En otra realización más de la invención, dos de los tres antígenos forman una fusión, unida a un único promotor y el tercer antígeno está unido a un segundo promotor, que puede ser igual o distinto del primer promotor. Por ejemplo, Gag y RT pueden estar unidos a un primer promotor y Nef puede estar unido a un segundo promotor.
- 15 El polinucleótido o los polinucleótidos que codifican al menos tres antígenos de VIH o fragmentos inmunógenos de los mismos pueden insertarse en cualquiera de las regiones con supresiones Adeno, por ejemplo, en la región con supresión E1.
- Aunque dos o más polinucleótidos que codifican antígenos pueden estar unidos como una fusión, la proteína resultante se puede expresar como una proteína de fusión, o puede expresarse como productos proteicos separados, o puede expresarse como una proteína de fusión y luego romperse seguidamente en subunidades más pequeñas.
- 20 En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína de fusión expresada por un vector de acuerdo con la invención, por ejemplo, una proteína de fusión producida en el cuerpo humano.
- Una o más de las secuencias de VIH incluidas en el vector de acuerdo con la invención que codifican, por ejemplo Nef, Gag o RT, pueden experimentar optimización de codón para células de mamífero, por ejemplo, de modo que ésta/éstas se asemejen a un gen humano expresado a alto nivel en su uso de codón. La optimización de codones de estas secuencias de VIH se describe con detalle en el documento WO 03/025003.
- 25 Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican Gag y/o RT en los vectores de adenovirus pueden experimentar optimización de codón como se ha descrito antes.
- La secuencia Gag en el vector de adenovirus puede excluir la secuencia que codifica el polipéptido Gag p6. Un ejemplo particular de secuencia de Gag para su uso en la invención comprende secuencias que codifican p17 y/o p24.
- 30 La secuencia RT puede codificar una mutación para inactivar sustancialmente cualquier actividad transcriptasa inversa. Una mutación de inactivación particular implica la sustitución del triptófano W 229 por K (lisina), véase el documento WO03/025003.
- 35 El gen RT es un componente del gen Pol más grande en el genoma del VIH como se ha descrito antes. Se entenderá que la secuencia que codifica RT incluida en el vector de adenovirus de acuerdo con la invención puede estar presente en el contexto de Pol, o un fragmento de Pol que codifique al menos RT. Tales fragmentos de Pol retienen los epítopes CTL principales de Pol. En un ejemplo específico, RT está incluido como el fragmento p51 o el p66 de RT.
- 40 Opcionalmente, la secuencia Nef para su uso está truncada para eliminar la secuencia que codifica la región N terminal, es decir, eliminar de 30 a 85 aminoácidos, por ejemplo, de 60 a 85 aminoácidos, en particular, los 65 aminoácidos del extremo N terminal (el último truncamiento se denomina en el presente documento trNef). De forma alternativa o adicionalmente, el Nef se puede modificar para eliminar uno o más sitios de miristilación. Por ejemplo, el sitio de miristilación Gly 2 se puede eliminar por supresión o sustitución. De forma alternativa o adicionalmente, el Nef se puede modificar para alterar el motivo dileucina de Leu 174 y Leu 175 mediante supresión o sustitución de una o ambas leucinas. La importancia del motivo dileucina en la regulación a niveles inferiores de CD4 se describe por ejemplo en Bresnahan P.A. y col (1998) Current Biology, 8(22): 1235-8.
- 45 Una construcción puede comprender Gag, Pol y Nef en las que está presente al menos 75 %, o al menos 90 % o al menos 95 %, por ejemplo 96 % de los epítopes CTL de estos antígenos nativos.
- En una construcción que comprende p17/p24 Gag, p66 RT, y Nef truncado como se ha definido antes, está presente el 96 % de los epítopes CTL de los antígenos nativos Gag Pol y Nef.
- 50 Una realización proporciona un vector de adenovirus que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican p17, p24 (optimizado) Gag, p66 RT (optimizado), Nef truncado (exento de nucleótidos que codifican aminoácidos terminales 1-85 – "trNef") en el orden Gag, RT, Nef.

Las construcciones incluyen:

1. p17, p24 (codón optimizado) Gag - p66 RT (codón optimizado) - Nef truncado;

2. Nef truncado - p66 RT (codón optimizado) - p17, p24 (codón optimizado) Gag;
3. Nef truncado - p17, p24 (codón optimizado) Gag - p66 RT (codón optimizado);
4. p66 RT (codón optimizado) - p17, p24 (codón optimizado) Gag - Nef truncado;
5. p66 RT (codón optimizado) – Nef truncado - p17, p24 (codón optimizado) Gag;
- 5 6. p17 , p24 (codón optimizado) Gag - Nef truncado - p66 RT (codón optimizado).

El polinucleótido o polinucleótidos pueden tener secuencias enlazadoras presentes entre las secuencias que codifican Gag, RT y Nef. Dichas secuencias enlazadoras pueden tener, por ejemplo, hasta 20 aminoácidos de longitud. En un ejemplo particular, éstas pueden ser de 1 a 10 aminoácidos, o de 1 a 6 aminoácidos, por ejemplo, de 2 a 4 aminoácidos.

- 10 Los polinucleótidos pueden contener secuencias de VIH adicionales. En particular, éstos pueden incluir proteínas env de VIH o derivados inmunógenos o fragmentos inmunógenos de las mismas. Formas adecuadas de env son gp120, gp140 y gp160. Otras secuencias adecuadas de VIH incluyen, pero sin limitación, Tat, Rev, Vpu, Vpr y Vif. Así, la invención proporciona además un vector de adenovirus que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican antígenos de VIH RT, Nef y Gag o derivados inmunógenos o fragmentos inmunógenos de los mismos
- 15 en el orden Gag, RT, Nef, junto con una proteína env de VIH o un derivado inmunógeno o un fragmento inmunógeno de la misma.

La presente invención comprende además una composición inmunógena que comprende un vector adenovírico de acuerdo con la presente invención en combinación con un segundo vector adenovírico que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican uno o más antígenos de VIH.

- 20 Se entenderá que para todas las secuencias de VIH incluidas en la invención, estas no representan necesariamente secuencias que codifican las proteínas de longitud completa o nativas. También se contemplan los fragmentos inmunógenos tales como proteínas truncadas, como son fragmentos que codifican al menos un epítipo de VIH, por ejemplo, un epítipo CTL, de forma típica un péptido de al menos 8 aminoácidos. Los polinucleótidos que codifican un fragmento de al menos 8, por ejemplo, 8 a 10 aminoácidos o hasta 20, 50, 60, 70, 100, 150 o 200 aminoácidos de
- 25 longitud se considera que están dentro del alcance de la invención siempre que el oligo o polipéptido codificado demuestre antigenicidad VIH, es decir, que se retengan los epítopes CTL principales por el oligo o el polipéptido. Los epítopes CTL principales se definen en el presente documento como aquellos que pueden obtener una respuesta inmunitaria *in vivo*. Las moléculas de polipéptidos VIH codificadas por las secuencias polinucleotídicas de acuerdo con la invención pueden representar un fragmento de al menos el 50 % de la longitud de la proteína nativa, pudiendo
- 30 contener dicho fragmento mutaciones pero reteniendo al menos un epítipo de VIH y demostrando antigenicidad VIH. Dicha antigenicidad VIH puede medirse por ejemplo midiendo las respuestas mediadas por anticuerpos o por células. De igual modo, los derivados inmunógenos divulgados deberán demostrar antigenicidad VIH. Los derivados inmunógenos pueden proporcionar cierta ventaja potencial sobre la proteína nativa tal como reducción o eliminación de una función de la proteína nativa que es indeseable en un antígeno de vacuna tal como actividad enzimática (RT)
- 35 o regulación a niveles inferiores de CD4 (Nef). Las secuencias polinucleotídicas pueden experimentar optimización de codón para células de mamífero en línea con aspectos de optimización de codón de la invención que se describen en el presente documento.

La presente invención proporciona además un procedimiento para preparar un vector de acuerdo con la invención que comprende las etapas de:

- 40 a) proporcionar un vector de adenovirus;
- b) proporcionar un plásmido que porta las secuencias de antígeno de VIH unidas de forma operativa a un promotor adecuado;
- c) transfectar células con el plásmido y el vector;
- d) dejar que pase tiempo suficiente para que se produzca la recombinación; y
- 45 e) recuperar el vector vírico recombinante que tiene las secuencias del antígeno del VIH.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para desarrollar una respuesta inmunitaria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar al mamífero una cantidad adecuada de una composición inmunógena de acuerdo con la invención.

- 50 La invención se puede referir en particular a VIH-1. Las construcciones descritas en el presente documento pueden derivarse de cualquier subtipo de VIH, por ejemplo subtipo B o subtipo C, en particular subtipo B.

Un promotor para usar en el vector de adenovirus de acuerdo con la invención puede ser el promotor del gen HCMV IE, por ejemplo, en el que está incluida la región sin traducir 5' del gen HCMV IE que comprende el exon1, como se

describe en el documento WO 02/36792.

La composición farmacéutica se puede administrar en cantidades suficientes para la transducción de las células diana y proporcionar niveles suficientes de transferencia génica y expresión génica para proporcionar un beneficio terapéutico sin efectos adversos inadecuados o con efectos fisiológicos médicamente aceptables, que se pueden determinar por los expertos en la técnica médica. Vías convencionales y farmacéuticamente aceptables de administración incluyen, pero sin limitación, la liberación directa en la retina y otros procedimientos de liberación intraocular, la liberación directa en el hígado, inhalación, intranasal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, rectal, oral y otras vías parenterales de administración. Las vías de administración se pueden combinar, si se desea, o ajustarse dependiendo del producto génico o del estado patológico. La vía de administración dependerá fundamentalmente de la naturaleza de la afección que se esté tratando.

Las dosis del vector vírico dependerán fundamentalmente de factores tales como la afección que se trate, la edad, peso y salud del paciente y puede variar de este modo entre diferentes pacientes. Por ejemplo, una dosificación humana o veterinaria para un adulto terapéuticamente eficaz del vector vírico varía por lo general en el intervalo de aproximadamente 100 μ l a aproximadamente 100 ml de un vehículo que contiene concentraciones de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{15} partículas, de aproximadamente 1×10^{11} a 1×10^{13} partículas, o de aproximadamente 1×10^9 a 1×10^{12} partículas de virus. Las dosificaciones variarán dependiendo del tamaño del animal y de la vía de administración. Por ejemplo, una dosis humana o veterinaria adecuada (para un animal de aproximadamente 80 kg) para inyección intramuscular varía en el intervalo de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 5×10^{12} partículas por ml, para un único sitio. Opcionalmente, pueden liberarse en varios sitios de administración. En otro ejemplo, una dosis humana o veterinaria adecuada puede estar en el intervalo de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{15} partículas para una formulación oral. Un experto en la técnica puede ajustar estas dosis, dependiendo de la vía de administración, y de la aplicación terapéutica o de vacuna para la que se usa el vector recombinante. Los niveles de expresión del producto terapéutico, o para un inmunógeno, el nivel de anticuerpo circulante, se pueden controlar para determinar la frecuencia de la administración de la dosis. Otros procedimientos adicionales para determinar la programación de la frecuencia de administración serán evidentes para los expertos en la técnica.

La administración de la composición farmacéutica puede adoptar la forma de una o más de una dosis individuales, por ejemplo, como dosis repetidas del mismo polinucleótido que contiene adenovirus, o en una pauta de vacunación de "sensibilización - recuerdo" heteróloga. Una pauta de sensibilización - recuerdo heteróloga usa la administración de diferentes formas de vacuna en la sensibilización y en el recuerdo, cada una de las cuales puede incluir ella misma dos o más administraciones. La composición de sensibilización y la composición de recuerdo tendrán al menos un antígeno en común, aunque no es necesariamente una forma idéntica del antígeno, puede ser una forma diferente del mismo antígeno.

Un régimen de sensibilización - recuerdo de uso con los vectores de la presente invención puede adoptar la forma de un ADN heterólogo y una sensibilización - recuerdo de vector adenovírico, por ejemplo, una dosis de sensibilización de ADN desnudo (no asociado a proteínas), seguida por un recuerdo de vector adenovírico, o por ejemplo, una sensibilización de vector adenovírico seguida por uno o más recuerdos de ADN desnudo. Dichos recuerdos de ADN se pueden administrar por administración intramuscular o intradérmica de ADN o por técnicas de aceleración de partículas. De forma alternativa, dicho régimen de sensibilización - recuerdo comprendería por ejemplo una proteína y un vector adenovírico de acuerdo con la presente invención, comprendiendo la dosis de sensibilización la proteína y comprendiendo la dosis de recuerdo el vector adenovírico o por ejemplo, en el que la dosis de sensibilización comprende un vector adenovírico y la dosis de recuerdo comprende una proteína.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Construcción del adenovirus Pan 6 y 7 con supresión E1/E3

1. Generación del vector recombinante SV-25 con supresión E1

Se construyó un plásmido que contenía el genoma de SV-25 completo salvo por una supresión de E1 diseñada por modificación genética. Se insertaron en el sitio de la supresión de E1 sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción I-CeuI y PI-SceI que permitirían la inserción del gen transformado desde un plásmido lanzadera en el que el casete de expresión del gen transformado está flanqueado por estos dos sitios de reconocimiento de enzima.

Se clonó un enlazador sintético que contenía los sitios de restricción Swal-SnaBI-SpeI-AflII-EcoRV-Swal en pBR322 que se cortó con EcoRI y NdeI. Esto se realizó por reasociación conjunta de dos oligómeros sintéticos SV25T (5'-AAT TTA AAT ACG TAG CGC ACT AGT CGC GCT AAG CGC GGA TAT CAT TTA AA-3') y SV25B (5'-TAT TTA AAT GAT ATC CGC GCT TAA GCG CGA CTA GTG CGC TAC GTA TTT A-3') e insertándolo en pBR322 digerido con EcoRI y NdeI. El extremo izquierdo (pb1 a 1057) de Ad SV25 se clonó en el enlazador anterior entre los sitios SnaBI y SpeI. El extremo derecho (pb 28059 a 31042) de Ad SV25 se clonó en el enlazador entre los sitios AflII y EcoRV. El adenovirus E1 se cortó entonces entre el sitio EcoRI (pb 547) a XhoI (pb 2031) desde el extremo izquierdo clonado como sigue. Se insertó un casete I-CeuI-PI-SceI generado por PCR de pShuttle (Clontech) entre

los sitios EcoRI y SpeI. El fragmento XhoI de 10154 pb de Ad SV-25 (pb 2031 a 12185) se insertó seguidamente en el sitio SpeI. El plásmido resultante se digirió con HindIII y la construcción (pSV25) se completó insertando el fragmento de Ad SV-25 HindIII de 18344 pb (pb 11984 a 30328) para generar un clon molecular completo de adenovirus SV25 con una supresión E1 adecuado para la generación de adenovirus recombinantes. Opcionalmente, se inserta un gen transformado deseado en los sitios I-CeuI y PI-SceI del plásmido del vector pSV25 recién creado.

Para generar un AdSV25 que porte un gen marcador, se separó un casete de expresión GFP (proteína fluorescente verde) clonado previamente en el plásmido pShuttle (Clontech) con las enzimas de restricción I-CeuI y PI-SceI y se ligó en pSV25 (u otro de los plásmidos Ad de chimpancé descritos en el presente documento) digerido con las mismas enzimas. El plásmido resultante (pSV25GFP) se digirió con SmaI para separar la estructura plasmídica bacteriana y se transfectó a la línea de células complementaria de E1 HEK 293. Aproximadamente 10 días después, se observó un efecto citopático que indicaba la presencia de virus replicativo. La generación con éxito de un vector adenovírico a base de Ad SV25 que expresa GFP se confirmó aplicando el líquido sobrenadante del cultivo transfectado sobre cultivos celulares nuevos. La presencia de células infectadas secundariamente se determinó por observación de la fluorescencia verde en una población de las células.

2. Construcción de vectores Pan-6 y Pan-7 con supresión E3.

Con el fin de potenciar la capacidad de clonación de los vectores adenovíricos, se puede eliminar la región E3 debido a que esta región codifica genes que no son requeridos para la propagación del virus en cultivo. En este sentido, se han realizado versiones con supresión E3 de Pan-5, Pan-6, Pan-7 y C68 (se elimina un fragmento NruI-AvrII de 3,5 kb que contiene E31-9).

Delección E3 en vector a base de Pan 6

Se digirió el clon molecular pPan6- pkGFP con supresión E1 con Sbf I y Not I para aislar el fragmento de 19,3 kb y volver a ligar en el sitio Sbf I. La construcción resultante pPan6-Sbf I-E3 se trató con Eco 47 III y Sma I, generando pPan6-E3. Finalmente, se subclonó el fragmento Sbf I de 21 kb de la digestión con Sbf I de pPan6- pkGFP en pPan6-E3 para crear pPan6-E3-pkGFP con una supresión de 4 kb en E3.

Vector Pan7 con supresión E3

Se usó la misma estrategia para conseguir supresiones E3 en Pan 7. Primero, un fragmento Avr II de 5,8 kb que abarca la región E3 se subclonó en pSL-1180, seguido por la supresión de E3 por digestión con Nru I. Los plásmidos resultantes se trataron con Spe I y Avr II para obtener fragmentos de 4,4 kb y se clonó en pPan7- pkGFP en los sitios Avr II para reemplazar el E3 original que contenía fragmentos Avr II, respectivamente. La construcción final pPan7-E3- pkGFP tenía una supresión E3 de 3,5 kb.

En el documento WO 03/0046124 se presenta una descripción detallada de la construcción de supresiones E1, E3 y E4 en estos y otros serotipos de adenovirus Pan. También hay disponible más información en Human Gene Therapy 15:519-530 (documento WO03/046124).

Ejemplo 2.

Construcción de la secuencia de Gag, RT, Nef.

Esto se describe con detalle en el documento WO03/025003

Plásmido p73i-Tgrn

1. Plásmido: p73i-GRN2 Clon No. 19 (p17/p24(opt)/RT(opt)trNef) - reparado

Gen de interés:

La porción p17/p24 de Gag de codón optimizado, RT de codón optimizado y gen Nef truncado de la cepa HXB2 de subtipo B de VIH-1 cadena abajo de un promotor HCMV de longitud lowa + exon1, y cadena arriba de una señal de poliadenilación de β -globina de conejo.

Plásmidos que contienen el gen trNef derivado del plásmido p17/24trNef1 contienen un error en la PCR que origina un cambio de aminoácido R a H 19 aminoácidos desde el extremo de Nef. Esto se corrigió mediante mutagénesis por PCR, la PCR de Nef corregida se unió a RT de codón optimizado de p7077-RT3, y el fragmento unido se cortó con ApaI y BamHI, y se clonó en el corte con ApaI/BamHI, p73i-GRN.

Cebadores:

PCR coRT de p7077-RT3 usando cebadores:

(Polimerasa = PWO (Roche) en todo el proceso.

Codificante: U1

GAATTCGCGGCCGCGATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGAT

AScoRT-Nef

GGTGTGACTGAAAACCCACCATCAGCACCTTTCTAATCCCCGC

Ciclo: 95 °C (30 s) luego 20 ciclos 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (180s), luego 72 °C (120 s) y manteniendo a 4 °C

5 El producto de PCR de 1,7 kb se purificó en gel.

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

Codificante: S-Nef

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACC

No codificante: ASNef-G:

10 GATGAAATGCTAGGCGGCTGTCAAACCTC

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

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

Codificante: SNEF-G

15 GAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATC

No codificante:

AStrNef (No codificante)

CGCGGATCCTCAGCAGTTCTTGAAGTACTCC

20 Ciclo: 95 °C (30 s) luego 15 ciclos 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (60 s), luego 72 °C (120 s) y manteniendo a 4 °C

Los productos de la 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) luego 15 ciclos 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (60 s), luego 72 °C (180s) y manteniendo a 4 °C .

El producto de la PCR se limpió por PCR y se unió al producto RT usando los cebadores U1 y AstrNef:

25 Ciclo: 95 °C (30 s) luego 20 ciclos 95 °C (30 s), 55 °C (30 s), 72 °C (180s), luego 72 °C (180s) y manteniendo a 4 °C.

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

2. Plásmido: p73I-RT w229k (RT inactivada)

30 **Gen de Interés:**

Generación de un gen RT inactivado cadena abajo de un promotor HCMV de longitud lowa + exon 1, y cadena arriba de una señal de poliadenilación de β -globina de conejo.

35 Debido a problemas con respecto al 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 en la posición aminoacídica 229 de RT (derivado de P73I-GRN2) desde Trp a Lys (R7271 p1-28).

Cebadores:

PCR 5' RT + mutación usando cebadores:

(polimerasa = PWO (Roche) en todo el proceso)

Codificante: RT3-u:1

40 GAATTCGCGGCCGCGATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGAT

No codificante: AScoRT-Trp229Lys

GGAGCTCGTAGCCCATCTTCAGGAATGGCGGCTCCTTCT

Ciclo:

1 x [94 °C (30 s)]

5 15 x [94 °C (30 s)/55°C (30 s)/72 °C (60 s)]

1 x [72 °C (180s)]

Purificar los productos de PCR en gel

PCR 3' RT + mutación usando cebadores:

No codificante: RT3- I:1

10 GAATTCGGATCCTTACAGCACCTTTCTAATCCCCGCACTCACCAGCTTGTCGACCTGCTCGTTGCCGC

Codificante: ScoRT-Trp229Lys

CCTGAAGATGGGCTACGAGCTCCATG

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 (180s)]

Purificar los productos de PCR en gel

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

20 Ciclo:

1 x [94 °C (30 s)]

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

1 x [72 °C (180s)]

25 El producto de PCR se purificó en gel y se clonó en p7313ie, utilizando los sitios de restricción NotI y BamHI, para generar p73I-RT w229k. (Véase la figura 13)

3. Plásmido: p73i-Tgrn

Gen de interés:

30 La porción p17/p24 de GAG de codón optimizado, RT de codón optimizado y gen Nef truncado de la cepa HXB2 del subtipo B del VIH-1 cadena abajo de un promotor HCMV de longitud lowa + exon1, y cadena arriba de una señal de poliadenilación de β -globina de conejo.

Construcciones de triple fusión que contienen una forma activa de RT pueden no ser aceptables para las autoridades reguladoras para uso humano, por ello se consiguió la inactivación de RT por inserción de un fragmento de corte con NheI y ApaI de p73i-RT w229k, en el corte con NheI/ApaI p73i-GRN2 n°19 (Figura 14). Esto da como resultado un cambio de W \rightarrow K en la posición 229 de la RT.

35 La secuencia completa del inserto plasmídico Tgrn se muestra en la Figura 7. Esta contiene p17 p24 (opt) Gag, p66 RT (opt e inactivado) y Nef truncado.

Construcciones alternativas de Gag, RT y Nef son las siguientes:

trNef - p66 RT (opt) - p17, p24 (opt) Gag,

trNef - p17, p24 (opt) Gag - p66 RT (opt),

40 p66 RT (opt) - p17, p24 (opt) Gag - trNef,

p66 RT (opt) – trNef - p17, p24 (opt) Gag,

p17 , p24 (opt) Gag - trNef - p66 RT (opt).

Las secuencias completas para estas construcciones se presentan en las Figuras 8 a 12 respectivamente.

Ejemplo 3.

5 Inserción de la secuencia Gag, RT, Nef en Adenovirus.

Subclonación del casete de expresión GRN en plásmido pShuttle.

10 El casete de expresión completo consistente en promotor, ADNc y señal de poliadenilación se aisló de construcciones pT-GRN por digestión doble con Sph I y EcoR I. El extremo Sph I del fragmento Sph I/EcoR I se rellenoó con Klenow y se clonó en el plásmido pShuttle en los sitios EcoR I y Mlu I en los que el extremo Mlu I era romo.

Durante el proceso de clonación quedó asociada con el casete de expresión del VIH una secuencia de flanqueo adicional. Esta secuencia se conoce como la secuencia Cer y no tiene función conocida.

Transferencia del casete de expresión GRN en clones moleculares con supresión de E1/E3 de vectores Pan6 y Pan7.

15 El casete de expresión se recuperó de digestiones de pShuttle por I-Ceu I y PI-Sce I y se clonó en los mismos sitios de los clones moleculares de vectores Pan6 y Pan7. Los clones recombinantes se identificaron por selección verde/blanco y se confirmó por análisis con enzimas de restricción extensivo.

Rescate y propagación de virus recombinantes.

20 Se trataron clones moleculares de vectores C6 y C7 con endonucleasas de restricción adecuadas (PmeI y PacI respectivamente) para liberar genomas de vectores lineales intactos y se transfectaron en células 293 usando el procedimiento de fosfato de calcio. Cuando se observó el efecto citopático completo en las células transfectadas, se recogieron los lisados víricos en bruto y se expandieron gradualmente hasta infecciones a gran escala en células 293 (1×10^9 células). Los virus de las infecciones a gran escala se purificaron por procedimiento de sedimentación con CsCl convencional.

25 Además, el plásmido pShuttle se puede recortar más cortando con EcoRI y XmnI para eliminar una secuencia enlazadora 3' y reducir el tamaño del plásmido para producir pShuttleGRNc. Este plásmido modificado se puede usar para generar un virus Pan7 adicional (C7-GRNc) usando el procedimiento que se ha descrito antes.

Se insertaron otras construcciones de forma similar tanto en el adenovirus Pan 6 como Pan 7. No obstante no se produjo con éxito Pan 6 con un inserto p66 RT (opt) – trNef - p17, p24 (opt) Gag.

30 Ejemplo 4.

Modelo de inmunogenicidad en el ratón

35 Se ensayaron una serie de vectores Pan6 y Pan7 que contenían insertos reordenados de los antígenos de VIH RT, Nef y Gag (RGN, NRG, NGR, GRN, y GNR) para determinar las respuestas inmunitarias *in vivo*. Se llevaron a cabo tres experimentos para probar los virus Pan6 y dos para Pan7. Cada adenovirus se administró intramuscularmente en un volumen de 50 μ l en una única pata trasera de ratones Balb/c (K2^d) en una dosis de 1×10^8 partículas. Esta dosis se seleccionó puesto que había demostrado previamente inducir buenos niveles de respuestas inmunitarias celulares (no publicado).

La Tabla 1 muestra los adenovirus que se compararon en estos experimentos.

Tabla 1

Grupo	Inmunización Pan6	Inmunización Pan7
	Semana 0	Semana 0
1	Pan6-NRG 10 ⁸	Pan7-NRG 10 ⁸
2	Pan6-NGR 10 ⁸	Pan7-NGR 10 ⁸
3	Pan6-RGN 10 ⁸	Pan7-RNG 10 ⁸
4	Pan6-GRN 10 ⁸	Pan7-RGN 10 ⁸
5	Pan6-GNR 10 ⁸	Pan7-GRN 10 ⁸
6	ADN: P7313	Pan7-GNR 10 ⁸
7		ADN: P7313

5 Después de la estimulación *in vitro* con péptidos o proteínas a epítopes específicos en Gag, Nef y RT, se midió la generación de respuestas CD8 y CD4 por ensayo ELISpot en los 14 y 28 días después de la sensibilización. Los resultados proporcionan una fuerte evidencia de que todas las variantes pueden generar una respuesta inmunitaria primaria potente que se mide por la producción de IFN γ e IL-2 en comparación con el vector vacío control (datos no mostrados).

10 Los datos de estos estudios se analizaron estadísticamente (usando un análisis de variancia (ANOVA) de modelo mixto en Proc Mixed en SAS (versión 9.1.3 Service Pack 2) para determinar una clasificación de las variantes RNG en Pan6 y Pan7 en momentos temporales distintos. La suma de las respuestas a péptidos CD8 para la producción de IFN γ se cuantificó para Gag y RT, mientras que los datos de IL-2 ELISpot se evaluaron en base a la suma de respuestas a los péptidos CD4 para Gag, Nef y RT.

15 La clasificación del grupo de variantes se calculó usando el modelo Bayesiano (llevado a cabo usando la afirmación previa en Proc Mixed con un valor fijo antes de generar 100.000 muestras más; véase Tierney, L. (1994), "Markov Chains for Exploring Posterior Distributions" (con discusión), y *Annals of Statistics*, 22, 1701 - 1762. Gelfand, A.E., Hills, S.E., Racine-Poon, A., y Smith, A.F.M. (1990), "Illustration of Bayesian Inference in Normal Data Models Using Gibbs Sampling," *Journal of the American Statistical Association*, 85, 972 - 985) para pronosticar la probabilidad de cada una de las variantes como la "mejor", en base a los datos proporcionados por las condiciones experimentales investigadas.

20 La Figura 1 representa la suma de las respuestas Pan6 CD4 y CD8 para IFN γ e IL-2 con cada péptido el día 14 y 28 según se predijo por el procedimiento bayesiano.

La Figura 2 representa la suma de las respuestas Pan7 CD4 y CD8 para IFN γ e IL-2 con cada péptido el día 14 y 28 según se predijo por el procedimiento bayesiano.

25 Todos los insertos muestran un aumento significativo en las respuestas inmunitarias comparado con el vector vacío control. El análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas entre los diferentes virus.

Ejemplo 5.

Modelo de inmunogenicidad en el cerdo

30 Los resultados de varios estudios han indicado que el cerdo es un buen modelo para ensayar la inmunogenicidad de vacunas candidatas. Se diseñó un estudio para investigar la inmunogenicidad de cuatro adenovirus NHP candidatos en minicerdos. Se sensibilizaron grupos de 5 minicerdos con PAN6GRN, PAN6NGR, PAN7GRN o PAN7NGR (en la Tabla 2 pueden encontrarse detalles de los lotes). Cada animal recibió un total de 3×10^{10} partículas víricas de adenovirus por vía intramuscular (usando un volumen de 1,0 ml dividido igualmente entre cada músculo medio de la pata).

Tabla 2. Lotes de adenovirus NHP usados para el experimento con minicerdos

Grupo	Vector	
	Semana 0	Semana 12
1	PAN6GRN	PAN6GRN
2	PAN6NGR	PAN6NGR
3	PAN7GRN	PAN7GRN
4	PAN7NGR	PAN7NGR
5	PAN6NGR	PAN6NGR

5 Se recogieron muestras de sangre antes de la inmunización y a intervalos después de la inmunización de cada animal. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron y reestimularon *in vitro* con mezclas y proteínas de genotecas peptídicas de RT, Nef y Gag. Las mezclas de genotecas peptídicas consistían en péptidos 15-méricos solapando 11 aminoácidos que abarcan la secuencia completa de RT, Nef y Gag y eran los mismos que se usaron para los experimentos *in vivo* en ratones.

La producción de interferón-gamma por estas células porcinas se ha medido usando ensayos ELIspot. La Figura 3 muestra las respuestas a mezclas de genotecas peptídicas de RT, Nef y Gag en los 4 tiempos de muestreo.

10 Las respuestas se detectan para los cuatro virus siete días después de la inmunización. La respuesta celular a los cuatro virus NHP se mantiene hasta al menos 5 semanas después de la inmunización primaria. PAN6-GRN genera la respuesta más potente a los 7 días después de la inmunización primaria por IFN-gamma ELIspot.

Ejemplo 6.

Modelo de inmunogenicidad en primates

15 Los resultados de un estudio piloto en primates indicaron que la inyección intramuscular de adenovirus NHP que expresa RT, Nef y Gag indujo respuestas inmunitarias celulares en monos cinomolgos.

20 Se diseñó un estudio para investigar la inmunogenicidad de cuatro adenovirus NHP candidatos en monos cinomolgos. Los grupos de animales se inmunizaron con PAN6-GRN, PAN6-NGR, PAN7-GRN o PAN7-NGR (en la Tabla 3 pueden encontrarse detalles de los lotes de virus). Cada animal recibió un total de 10^{11} partículas víricas de adenovirus por vía intramuscular (usando un volumen de 1,0 ml dividido igualmente entre cada músculo medio de la pata).

Tabla 3. Lotes de adenovirus NHP usados para el experimento en primates

Grupo	Inmunización	Animal i/d
	Semana 0	
1	PAN6GRN	18173, 18180, 18240, 18217, 18221
2	PAN6NGR	18144, 18155, 18199, 18216, 18238
3	PAN7GRN	18156, 18188, 18192, 18215, 18237
4	PAN7NGR	18160, 18170, 18208, 18226, 18236
5	PAN7NGR	18165, 18168, 18189, 18234

25 Se recogieron muestras de sangre antes de la inmunización y a intervalos semanales posteriormente. Las células mononucleares de sangre periférica se aislaron y volvieron a estimular *in vitro* con mezclas de genotecas peptídicas RT, Nef y Gag. La producción de interferón-gamma por estas células de primates se midió usando ensayos ELIspot. La Figura 4 muestra la respuesta de cada grupo en los tres puntos temporales de muestreo.

30 Los resultados muestran que todos los grupos respondieron fuertemente una semana después de la inmunización primaria, con respuestas mantenidas hasta al menos 7 semanas después de la inmunización. Los resultados sugieren que existe poca diferencia entre los vectores cuando se usan a esta dosis (es decir 10^{11} partículas) en primates.

Ejemplo 7.

Respuestas inmunitarias después de la inmunización primaria a un intervalo de dosis de adenovirus NHP que codifican antígenos GRN de VIH liberados intramuscularmente (i.m.).

5 Para evaluar el impacto de la dosis de adenovirus en inmunización primaria, se inmunizaron un grupo de ratones (n=5) intramuscularmente (i.m.) con dosis crecientes de Adenovirus NHP (de 10^7 a 10^{10} partículas). Como control positivo se inmunizó un grupo de animales con ADN (2 μ g) usando liberación epidérmica mediada por partículas (ND5). El día 6 y el día 19 después de la inmunización, se programó la extirpación del bazo de los animales. Las respuestas inmunitarias se controlaron por ensayo IFN- γ ELISPOT usando una mezcla de genoteca peptídica para cada uno de los antígenos (GAG y RT) para estimular los esplenocitos durante la noche. La Figura 5 muestra las respuestas de cada grupo en los dos tiempos de muestreo.

Ejemplo 8

10 Respuestas inmunitarias después de la inmunización primaria a un intervalo de dosis de Adenovirus NHP que codifica antígenos GRN de VIH liberados intradérmicamente (i.d.).

15 Para evaluar el impacto de la dosis de adenovirus en la inmunización primaria, se inmunizó intradérmicamente (i.d.) con dosis crecientes de adenovirus NHP (de 10^7 a 10^{10} partículas) un grupo de ratones (n=5). Como control positivo se inmunizó un grupo de animales con ADN (1 μ g) usando liberación epidérmica mediada por partículas (PMED). El día 7 y el día 14 después de la inmunización se programó la extirpación del bazo en los animales. Las respuestas inmunitarias se controlaron por ensayo IFN- γ ELISPOT. Los esplenocitos se estimularon durante la noche usando péptidos bien definidos para cada antígeno (GAG y RT) que estimulan específicamente las células T CD4 o CD8. La Figura 6 muestra las respuestas de cada grupo en los dos tiempos de muestreo.

Estos resultados sugieren que ambas vías, i.m. e i.d. son eficaces para la administración de las composiciones de la invención.

20 Descripción de las figuras

Figura 1. Clasificación de Adenovirus Pan6 VIH. Esta representa la suma de las respuestas CD4 y CD8 de Pan6 para IFN γ e IL-2 con cada péptido el día 14 y 28, como se predijo por el procedimiento bayesiano. El eje y representa células que forman puntos por millón de esplenocitos.

25 Figura 2. Clasificación de Adenovirus Pan7 VIH. Esta representa la suma de las respuestas CD4 y CD8 de Pan7 para IFN γ e IL-2 con cada péptido el día 14 y 28, como se predijo por el procedimiento bayesiano. El eje y representa células que forman puntos por millón de esplenocitos.

Figura 3. Respuestas de minicerdos a mezclas de genotecas peptídicas de RT, Nef y Gag en las semanas 0, 1, 3 y 5 después de la inmunización primaria. Los resultados son la media \pm el error típico de la suma de respuestas a cada mezcla de genoteca peptídica para cada animal. Los datos se obtuvieron de la Universidad de Pensilvania.

30 Figura 4. Respuestas de primates a mezclas de genotecas peptídicas de RT, Nef y Gag en las semanas 0, 1 y 2 después de la inmunización primaria. Los resultados son la media \pm el error típico de la suma de respuestas a cada mezcla de genoteca peptídica para cada animal.

35 Figura 5: Respuestas inmunitarias después de la inmunización primaria a un intervalo de dosis de Adenovirus NHP que codifica antígenos GRN de VIH liberados intramuscularmente (i.m.). El grupo de ratones (n=5) se ha inmunizado con diversas dosis de adenovirus NHP (desde 10^7 a 10^{10} partículas) y se han controlado las respuestas inmunitarias celulares frente a una mezcla de genotecas peptídicas para cada antígeno (día 6 y día 19) usando ensayo IFN- γ ELISPOT.

40 Figura 6: Respuestas inmunitarias después de la inmunización primaria a un intervalo de dosis de adenovirus NHP que codifica antígenos GRN de VIH liberados intradérmicamente (i.d.). El grupo de ratones (n=3) se ha inmunizado con diversas dosis de adenovirus NHP (de 10^7 a 10^{10} partículas) y se han controlado las respuestas inmunitarias celulares frente a péptidos específicos (día 7 y día 14) usando ensayo IFN- γ ELISPOT.

Figuras 7 a 12: Secuencias de polinucleótidos, secuencias de aminoácidos y mapas de restricción para las construcciones descritas en el Ejemplo 2.

En la Tabla 4 se establecen detalles de las secuencias

45 **Tabla 4:**

Descripción de aminoácido o polinucleótido	Identificador de secuencia (SEC ID N°)
polinucleótido Tgrn	1
aminoácido Tgrn	2

ES 2 546 330 T3

polinucleótido Tnrg	3
aminoácido Tnrg	4
polinucleótido Tngr	5
aminoácido Tngr	6
polinucleótido Trgn	7
aminoácido Trgn	8
polinucleótido Trng	9
aminoácido Trng	10
polinucleótido Tgnr	11
aminoácido Tgnr	12

REIVINDICACIONES

1. Un vector de adenovirus que comprende un polinucleótido o polinucleótidos que codifican al menos los antígenos de VIH RT, Nef y Gag o fragmentos inmunógenos de los mismos, dispuestos de forma que son transcritos en el orden Gag, RT, Nef, de modo que la porción Gag se encuentre en el extremo N terminal de la proteína de fusión resultante, **caracterizado porque** el virus es un adenovirus de primate no humano y el virus es un adenovirus de chimpancé seleccionado de Pan 5, Pan 6 y Pan 7.
2. El adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el RT está truncado.
3. El adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el Nef está truncado.
4. El adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el Gag es solamente p17 y p24.
5. El vector de adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tamaño del polinucleótido o polinucleótidos de VIH es tal que el tamaño total del vector es del 90 al 100 % del tamaño del virus.
6. El vector de adenovirus de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el adenovirus es pan 6.
7. El vector de adenovirus de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el adenovirus es pan 7.
8. El vector de adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el virus es defectuoso en la replicación.
9. El vector de adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el virus tiene delaciones en las regiones E1 y E3.
10. El vector de adenovirus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las secuencias de polinucleótidos que codifican los antígenos de VIH están dispuestas como una fusión.
11. El vector de adenovirus de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende las construcciones de polinucleótidos siguientes: p17, p24 (codón optimizado) Gag - p66 RT (codón optimizado) - Nef truncado;
12. Un vector de adenovirus de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el Adenovirus es Pan 6 o Pan 7.
13. Una composición inmunógena que comprende el vector de virus de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo o coadyuvante farmacéuticamente aceptable.
14. El uso de un vector de adenovirus de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de infección por VIH.
15. Un procedimiento de preparación de un vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende las etapas de: a) proporcionar un vector de adenovirus; b) proporcionar un plásmido que porte las secuencias de antígeno del VIH unidas de forma operativa a un promotor adecuado; c) transfectar células con el plásmido y el vector; d) dejar que pase tiempo suficiente para que se produzca la recombinación; y e) recuperar el vector de virus recombinante que porta las secuencias de antígenos del VIH.
16. Un procedimiento de producción de una respuesta inmunitaria en un mamífero, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un mamífero una cantidad adecuada de una composición inmunógena de acuerdo con la reivindicación 13.
17. Una proteína de fusión expresada por el vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
18. Una proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 17 producida dentro del cuerpo humano.

Figura 1

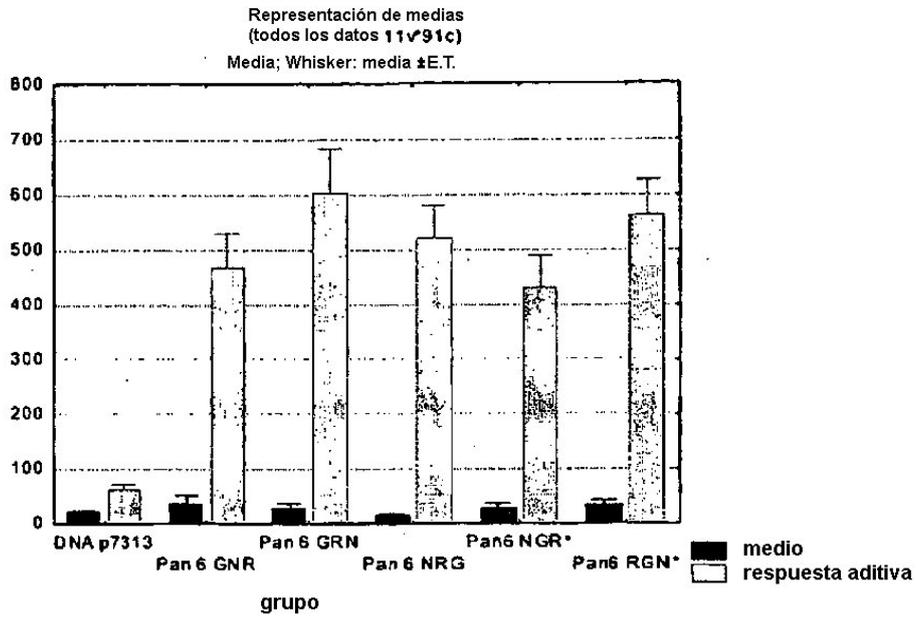


Figura 2

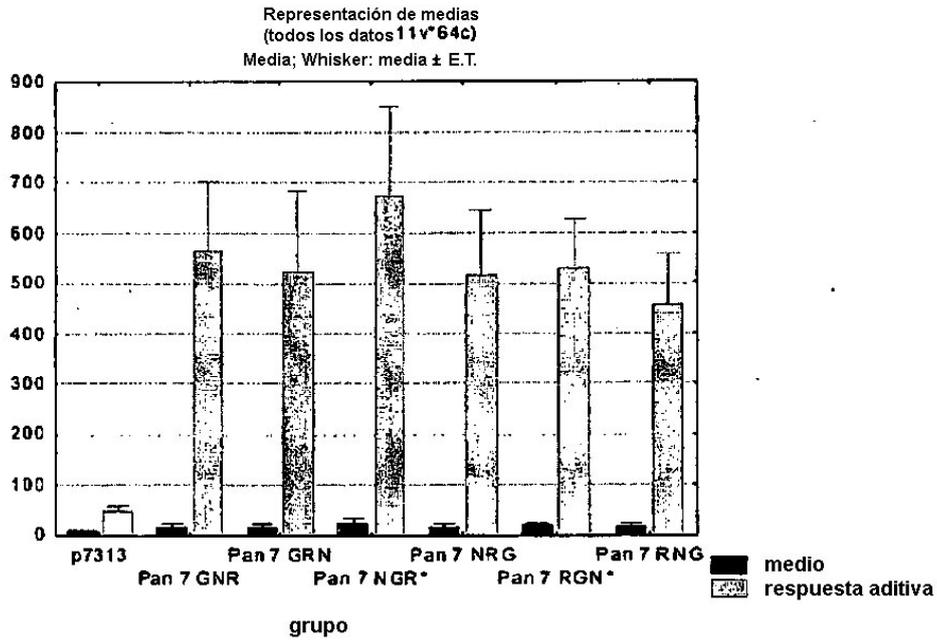
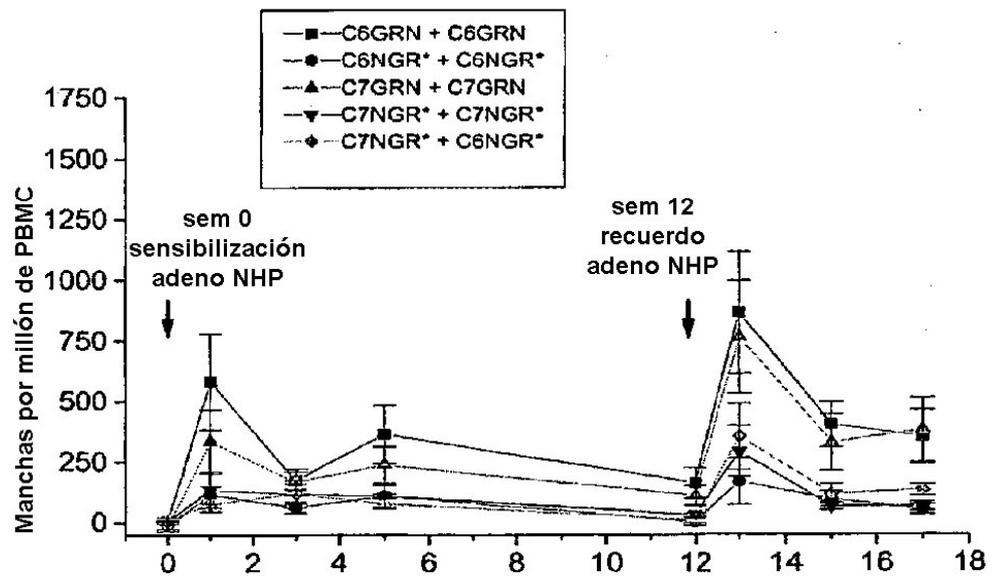


Figura 3



5

Figura 4

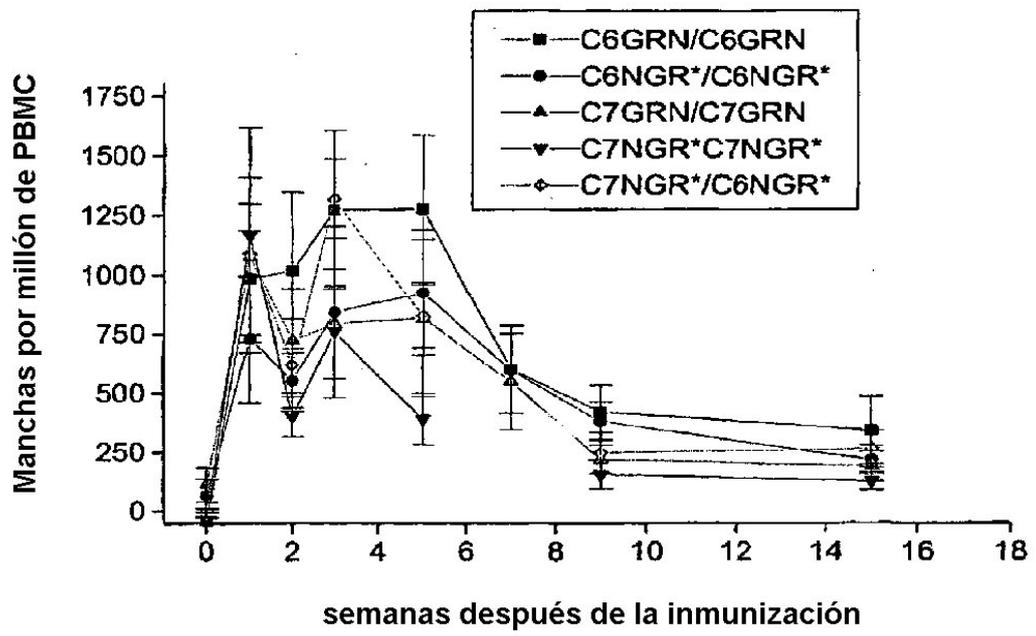


Figura 5

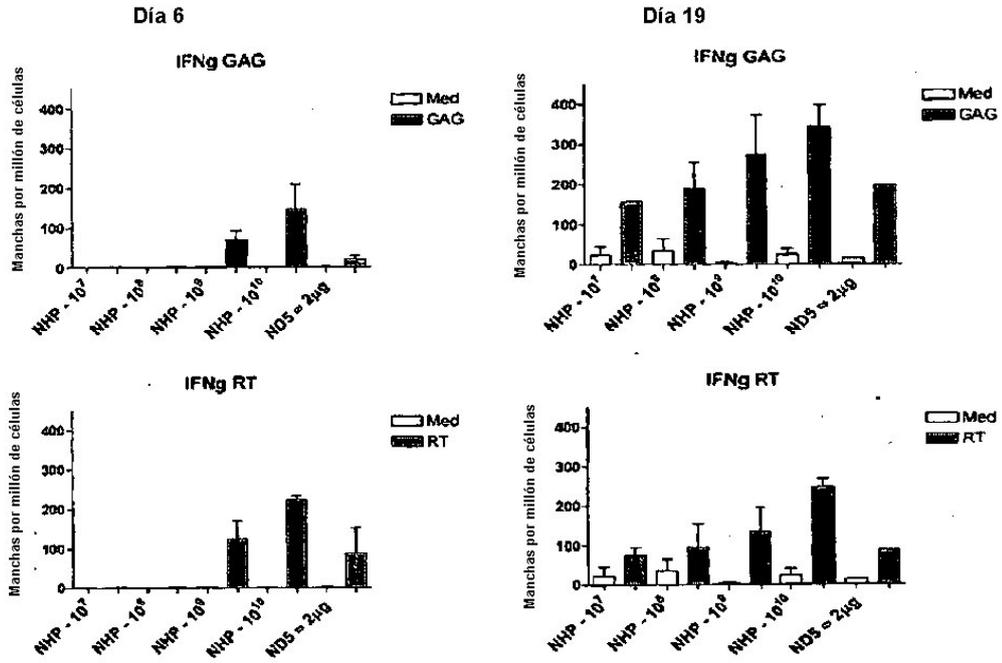


Figura 6

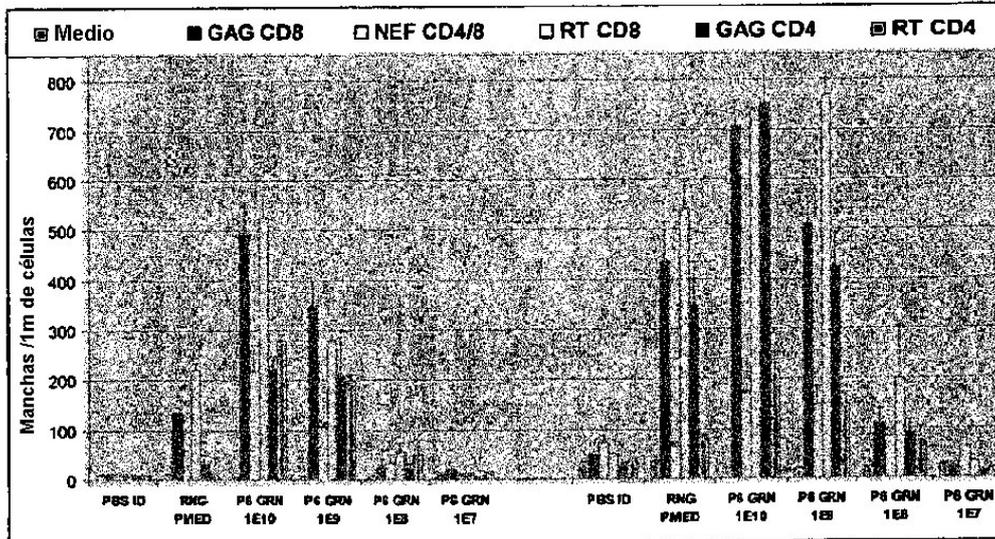


Figura 7

SEC ID N°: 1

ATGGGTGCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCG
GGAGGCCAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTG
AACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCCGCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAG
ACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCTTGATAACACAGTGGCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATC
GAGATTAAGGATACCAAGGAGCCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCC
CAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATT
CAGGGCCAGATGGTTCATCAGGCCATCAGCCCCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAG
AAGGCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTC
AATAACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGGCCGATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAG
GAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAG
CCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGCTCAACAAT
CCTCCCATCCAGTTCGAGAAATCTATAAACCGGATCATCCTGCGCCCTGAACAAGATCAGTGGCAGATG
TACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTGACCCGG
TTTTATAAGACCTGCGAGCAGAGCAGGCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTG
GTACAGAACCCTAACCCGACTGCAAAAACAATCTTGAAGGCATAGGCCCGGCTGCCACCTTGGAAAG
ATGATGGTGGATTGAGGAGTAGGCGGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGTGATGGGCCCATCAGT
CCCATCGAGACCGTGCCTGGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTC
ACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAG
ATCGGGCCTGAGAACCATAACAACCCCGGTTTGGCATTCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCCGC
AAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCCGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCAGCTGGCCATCCCC
CATCCGGCCGGCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTGGACGTGGGCGACGCTTACTTCAGCGCTC
CCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGC
ATCAGATATCAGTACAACGCTCCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTCCAGAGCTCCATG
AACAGATCCTGGAGCGTTCGGAAGCAGAACCCTGATATCGTCATCTACCAGTACATGGACCGACCTG
TACGTGGGCTCTGACCTGGAAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTG
AGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCCTGaaGATGGGCTACGAG
CTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCCTCCCGAGAAGGACAGCTGGACCCTGAACGAC
ATCCAGAAGCTGGTGGCAAGCTCAACTGGCTAGCCAGATCTATCCCGGATCAAGGTGCGCCAGCTC
TGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCTCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAG
CTGGCTGAGAACCAGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCCTCCAAGGACCTG
ATCCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCGAGTGGACATACCAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAAC
CCAGACCCGGCTGAGTACGCCCCGATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCCGAGCC
GTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAG
AAGGAGACCTGGGAGAGCTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTCTGTG
AATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCATCGTGGGCGCGGAGACATTCT
TACGTGGACCGGCGGCCCAACCGCAACAAGCTCGGGAAAGGCCGGGTACGTACCAACCCGGGCGGC
CAGAAGGTGCTCACCTGACCGACACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTC
CAGGACTCCGGCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACCGGCTGGGCATTATTCCAGGCCAG
CCGGACCAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAGAGAAGGTCTAC
CTCGCTGGGTCCTCCCGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGACAAAGCTGGTGGTGGCGGG
ATTAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAAGA
AGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACA
CCAGGGCCAGGGTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGAT
AAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACCAGCTTGTTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGAT
GACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTACAGCCGCTAGCATTTTATCACGTGGCCCGAGAG
CTGCATCCGGAGTACTCAAGAAGTGTGA

SEC ID N°: 2

MGARASVLSG GELDRWEKIR LRPGGKKKYK LKHIVWASRE LERFAVNPGL
LETSEGCRQI LGQLQPSLQT GSEELRSLYN TVATLYCVHQ RIEIKDTKEA
LDKIEEEQNK SKKKAQOAAA DTGHSNQVSQ NYPIVQNIQG QMVHQAI SPR
TLNAWVKVVE EKAFSPEVIP MFSALSEGAT PQDLNMLNT VGGHQAAMQM
LKETINEEAA EWDRVHPVHA GPIAPGQMR PRGSDIAGTT STLQEQIGWM
TNNPPIPVGE IYKRWILLGL NKIVRMYSP SILDIRQGP EPFRDYVDRF
YKTLRAEQAS QEVKNWMTET LLVQANPDC KTIKALGPA ATLEEMMTAC
QGVGGPGHKA RVLMPISPI ETVPVKLPKPG MDGPKVKQWP LTEBKIKALV

```

EICTEMEKEG KISKIGPENP YNTPVFAIKK KDSTKWRKLV DFRELNKRTQ
DFWEVQLGIP HPAGLKKKKS VTVLDVGDAY FSVPLDEDFR KYTAFTIPSI
NNETPGIRYQ YNVLPQGWK G SPAIFQSSMT KILEPFRKQN PDIIVIYQYMD
DLYVGSdleI GQHRTKIEEL RQHLLRWGLT TPDKKHQKEP PFLKMGYELH
PDKWTVQPIV LPEKDSWTVN DIQKLVGKLN WASQIYPGIK VRQLCKLLRG
TKALTEVIPL TEEAELELAE NREILKEPVH GVYYDPSKDL IAEIQKQGQG
QWTYQIYQEP FKNLKTGKYA RMRGAHTNDV KQLTEAVQKI TTESIVIWGK
TPKFKLPIQK ETWETWTEY WQATWIPEWE FVNTFPLVKL WYQLEKEPIV
GAETFYVDGA ANRETKLGKA GYVTNRGRQK VVTLTDTTNQ KTELQAIYLA
LQDSGLEVNI VTDSQYALGI IQAOPDQSES ELVNQIIEQL IKKEKVYLAW
VPAHKGIGGN EQVDKLVSAG IRKVLVGVGFP VTPQVELRPM TYKAAVDLSH
FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
GWCYKLVPE PDKVEEANKG ENTSLLLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFDSRL
AFHHVARELH PEYFKNC*
    
```

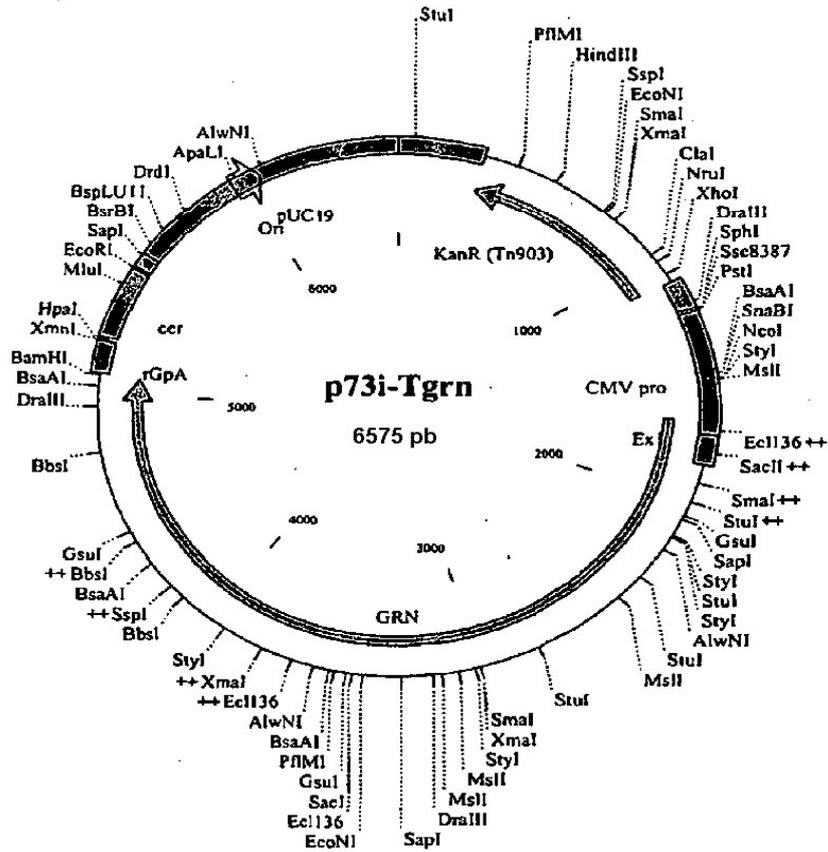


Figura 8

SEC ID N°: 3

ATGGTGGGTTTTCCAGTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTT
 AGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAAAGAAGACAAGATATCCTT
 GATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTC
 AGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTCTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCC
 AATAAAGGAGAGAACCACAGCTTGTACACCCCTGTGAGCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAA
 GTGTTAGAGTGGAGTTTTGACAGCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTAC
 TTCAAGAAGTGCATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCTGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGAC
 GGCCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAG
 ATGGAGAAAGAGGGCAAGATCAGCAAGATCGGGCTGAGAACCATAACAACACCCCGTGTGGCCATC
 AAGAAGGACAGCAGCACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCGGGAGCTGAATAAGCCGACCCAGGAT
 TTCTGGGAGGTCCAGCTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTG
 GACGTGGGCGACGCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAAGTACACCGCCTTTACCATC
 CCATCTATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCCAGGGCTGGAAGGGC
 TCTCCCGCAATTTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCTCGATATC
 GTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAG
 ATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAG
 CCGCCATTCCTGaaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCCCC
 GAGAAGGACAGCTGGCGGAGACATCCAGAACCTCAGAAAGTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATC
 TATCCCGGATCAAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATT
 CCCCTCACGGAGGAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGC
 GTGTACTATGACCCCTCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATAC
 CAGATTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCCTCAAGACCGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCC
 AACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCGCTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAG
 ACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCC
 ACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAG
 GAGCCATCAGTGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGCGCGCCCAACCGGAAACAAGCTCCGGGAAG
 GCCGGGTACGTACCAACCGGGGCGCCAGAAGTCCGTCACCCCTGACCGACACCACCAACAGAAGACG
 GAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAG
 TACGCGCTGGGCATTATTCAGGCCCGCGGACCAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAG
 CAGATTTACCAGGAGCCTTACTCGCTTACCTCGCCTGGTCCCGGCCATAAGGGCCATGGCGGCAACGAG
 CAGGTGCACAAGCTGGTGAAGTGGGGGATAGAAAAGTGGTGAAGGGTGCCTGGGAGCTTCGGTACTGTCT
 GGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAG
 CATATCGTGGGGCCTCGAGGGAGCTTGAACCGTTTGCCGTGAACCCAGGCCCTGTGGAAACATCTGAG
 GGATGTGCTCAGATCCTGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCCTTG
 TATAACACAGTGGCTACCCCTACTGCGTACACAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGCCCTTG
 GACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCAT
 AGCAACAGGATACAGAACTATCCTATGTGTCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATC
 AGCCCCCGACGCTCAATGCCGGGTGAAGGTTGTGCAAGAGAAGGCCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCC
 ATGTTCTCCGCTTTGAGTGAAGGGGGCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGC
 CATCAGGCCGCCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCAT
 CCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACC
 ACCTCTACACTGCAAGAGCAAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTAT
 AAACGGTGGATCATCCTGGGCTGAACAAGATCGTGGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
 AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTGACCGGTTTTATAAGACCCCTGCGAGCAGAGCAG
 GCCTCTCAGGAGGTCAAAAAGTGGATGACCGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAA
 ACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAGGC
 GGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGTGA

SEC ID N°: 4

MVGFVPTQV PLRPMYKAA VDLSHFLKEK GLEGLIHSQ RRQDILDLWI
 YHTQGYFPDW QNYTPGPGVR YPLTFGWYK LVPVEPKVE EANKGENTSL
 LHPVSLHGMD DPEREVLEWR FDSRLAPHHV ARELHPEYFK NCMGPISPIE
 TVPVKLPKM DGPVKVQWPL TEEKIKALVE ICTEMEKEGK ISKIGPENPY
 NTPVFAIKKK DSTKWRKLV DPRELNKRTQD FWEVQLGIPH PAGLKKKKS
 TVLDVGDYF SVPLDEDFRK YTAFTIPSIN NETPGIRYQY NVLPQGWKGS
 PAIFQSSMTK ILEPFRKQNP DIVIYQYMD LYVGSLEIG QHRTKIEELR
 QHLLRWGLTT PDKKHQKEPP FLKMGYELHP DKWTVQPIVL PEKDSWTVND
 IQKLVGKLNW ASQIYPGIKV RQLCKLLRGT KALTEVIPLT EEAELELAEN
 REILKEPVHG VYYDPSKDLI AEIQKQGGQ WTYQIYQEPF KNLKTGKYAR

```

MRGAHTNDVK QLTEAVQKIT TESIVIWGKT PKFKLPIQKE TWETWWT EYW
QATWIPWEF VNTPLVLKLW YQLEKEPIVG AETFYVDGAA NRETKLGKAG
YVTNRGRQKV VTLTDTTNQK TELQAIYLAL QDSGLEVNIV TDSQYALGI I
QAQPDQSESE LVNQIIEQLI KKEKVYLAWV PAHKGIGGNE QVDKLVSAGI
RKVLMGARAS VLSGGELDRW EKIRLRPGGK KKYKCLKHIVW ASRELERFAV
NPGLLETSEG CRQILGQLQP SLQTGSEELR SLYNTVATLY CVHQRIEIKD
TKEALDKIEE EQNKSCKKAQ QAAADTGHSN QVSNYPPIVQ NIQQQMVHQA
ISPRTLNAWV KVVEEKAFSP EVIPMFSALE EGATPQDLNT MLNTVGGHQA
AMQMLKETIN EEAAEWDVRV PVHAGPIAPG QMREPRGSDI AGTTSTLQEQ
IGWMTNNPPI PVGEIYKRWI ILGLNKIVRM YSPTSILDIR QGPKPEFRDY
VDRFYKTLRA EQASQEVKNW MTETLLVQNA NPDCKTILKA LGPAATLEEM

MTACQGVGGP GHKARVL*
    
```

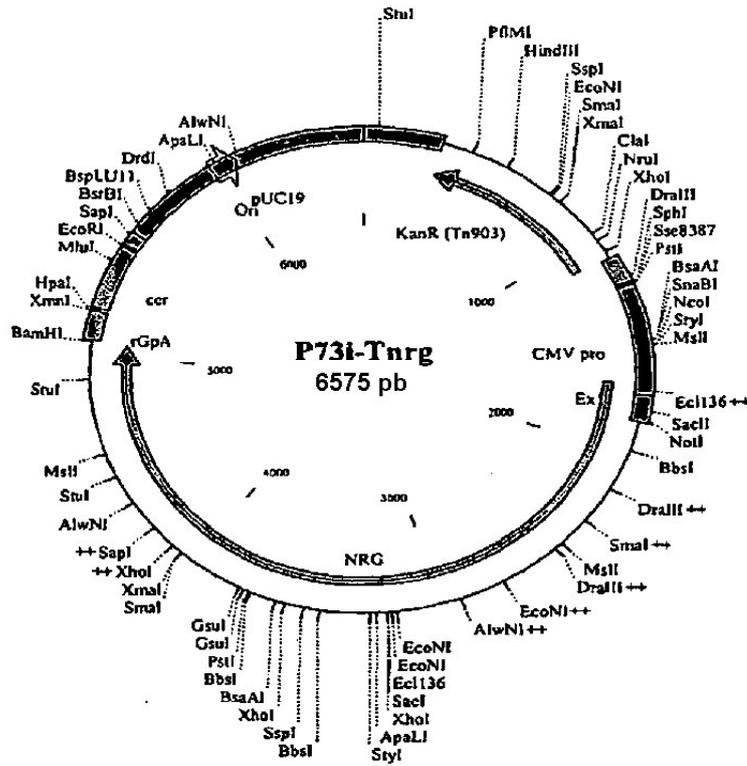


Figura 9

SEC ID N°: 5

ATGGTGGGTTTTCCAGTACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGT
 AGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCCAAAGAA
 GACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAAC
 TACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGGCTACAAGCTAGTACC
 AGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACCAGCTTGTACACCTG
 TGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGTTGACAGCCGC
 CTAGCATTTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAAGTGCATGGGTGC
 CCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGG
 GAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGCCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTT
 GCCGTGAACCCAGGCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCA
 GCCATCCCTCCAGACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTGGCTACCTCT
 ACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCTTGGACAAAATTGAGGAG
 GAGCAAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCA
 GGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCA
 GCCCCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGTTGTGGAAGAGAAGGCCCTTTCTCCTGAGGTT
 ATCCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATACAATGCTTAA
 TACCGTGGGCGGCATCAGGCCGCCATGCAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAG
 CCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATCGGGGAG
 CCTCGCGCTCTGACATTGCCCGCACCACTCTACACTGCAAGAGCAAATCGEATGGATGAC
 CAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAAATCTATAAACGGTGGATCATCCTGGGCCTGAACA
 AGATCGTGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCT
 TTTAGGGATTACGTCGACCGGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCCTCCTCAGGAGGT
 CAAAACTGGATGACGGAGACACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCTCGACTGCAAAAATCT
 TGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTGAGGGAGTAA
 GGACCCGGACACAAGCCAGAGTGTGATGGGCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGGCCGT
 GAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCAAGGTCAAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGA
 TCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAAGAGGCCAAGATCAGCAAGATCGGG
 CCTGAGAACCATAACAACACCCCGTGTGTCATCAAGAAGAAGGACAGCACCAAGTGGCG
 CAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAGCTGG
 GCATCCCCCATCCGGCCGGCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTGGACGTGGCCGAC
 GCTTACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCCAT
 TATCAACAACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCCTCCCCAGGGCTGGAAGG
 GCTCTCCCGCATTTCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAAC
 CCGGATATCCTCATCTACCAGTACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGG
 GCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTGAGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCTGACCACTC
 CGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCCTgaagATGGGCTACGAGCTCCATCCCGAC
 AAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCCCCGAGAAGGACAGCTGGACCGTGAACGACATCCA
 GAAGCTGGTGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAGGTGCGCCAGC
 TCTGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCTCCTCACGGAGGAAGCC
 GAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGA
 CCCCTCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATAACCAGA
 TTTACCAGGAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCAC
 ACCAACGATGTCAAGCAGCTGACCGAGGCCCTCCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGAT
 CTGGGGGAAGACACCCAAGTTCAAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGGA
 CCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAGTGGGAGTTCGTGAATACACCTCCTCTGGTG
 AAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCATCGTGGGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGG
 CGCGGCCAACCGGAAACAAAGCTCGGGAAAGGCCGGGTACGTCACCAACCGGGGCGCCAGA
 AGTTCGTACCCCTGACCGACACCAACCAAGCAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATCTATCTCGCT
 CTCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGCGCTGGGCATTAT
 TCAGGCCAGCCGGACAGTCCGAGAGCGAACTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCA
 AGAAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAG
 GTCGACAAGCTGGTGGTGGTGGGATTAGAAAGGTGCTGTAA

SEC ID N°: 6

Figura 10

SEC ID N°: 7

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTC
AAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAGAG
GGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCCATACAACACCCCGTGTGGCCATCAAGAAGAAGGAC
AGCACCAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTC
CAGCTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTGGACGTGGGGCAG
GCTTACTTCAGCGCTTGACCGAGGACTTTAGAAAAGTACACCGCCTTACCATCCCATCTATCAAC
AACGAGACCCCTGGCATCAGATACAGTACAACGTCCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATT
TTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAGCAGAACCCGATATCGTCATCTACCAG
TACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTG
AGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCTG
aaGATGGGCTGAGCTCCATCCCCACAAGTGGAGCTGTCAGCCTATCGTCTCCCGGAGAGGACAGC
TGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATC
AAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCTCACGGAG
GAAGCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCAGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGAC
CCCTCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCGAGTGGACATACCAGATTTACCAG
GAGCCTTTCAAGAACCTCAAGACCGGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAG
CAGCTGACCGAGGCCGTCAGAAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTC
AAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCC
GAGTGGGAGTTTCGTAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTG
GGCGCGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTC
ACCAACCGGGGCGCCAGAAGGTGCTCACCTGACCGACACCACCAACGAGAAGACGGAGCTGCAGGCC
ATCTATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACCGCTGGGC
ATTATTACGGCCAGCCGAGACCAGTCCGAGAGCGAAGCTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAG
AAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGACAAAG
CTGGTGGTGCAGGGATTAGAAAAGGTGCTGATGGGTGCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTG
GACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGGAGGCCAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGG
GCCTCGAGGGCTGGAACGGTTTGCCGTGAACCCAGGCCCTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAG
ATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCTTGTATAACACAGTG
GCTACCCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCCTTGGACAAAATTGAG
GAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCAGCAGGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTA
TACAGAGACTATCCTATTGTCCAAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACG
CTCAATGCCTGGGTGAAGGTTGTGGAAGAGAAGGCCCTTTCTCCTGAGGTTATCCCCATGTTCTCCGCT
TTGAGTGGGGGGCCACTCCTCAGGACTCAATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCC
ATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGCCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCT
GGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCTCGCGGCTCTGACATTGCCCGCACCCCTCAGCTG
CAAGAGCAAAATCGGATGGATGACCAACAATCCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAACGGTGGATC
ATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGGCATGTACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCC
AAAGACCCTTTTAGGGATTACGTGACCGGTTTTATAAGACCCCTGCGAGCAGAGCAGGCCCTCTCAGGAG
GTCAAAAATCGGATGACGGAGACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCGACTGCAAAAACAACTTTGAAG
GCACTAGGCCCGGCTGCCACCCCTGGAAGAGATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGGCGACCCGGAC
AAAGCCAGAGTGTGATGGTGGTTTTCCAGTACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAG
GCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCAAAGA
AGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACA
CCAGGGCCAGGGCTCAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGAT
AAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGAT
GACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCGCCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAG
CTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGA

SEC ID N°: 8

MGPISPIETV	PVKLKPQMDG	PKVKQWPLTE	EKIKALVEIC	TEMEKEGKIS
KIGPENPYNT	PVFAIKKDS	TKWRKLVDFR	ELNKRTQDFW	EVQLGIPHPA
GLKKKKSVTV	LDVGDAYFSV	PLEDEFKRYT	AFTIP SINNE	TPGIRYQYNV
LPQGWKSPA	IFQSSMTKIL	EPFRKQNPDI	VIYQYMDLQ	VGSDLEIGQH
RTKIEELRQH	LLRWGLTTPD	KKHQKEPFFL	KMGYELHPDK	WTVQPIVLP
KDSWTVNDIQ	KLVGKLNWAS	QIYPGIKVRQ	LCKLLRGTKA	LTEVIPLTEE
AELELAENRE	ILKEPVHGVY	YDPSKDLIAE	IQKQGGQWT	YQIYQEPFKN
LKTGKYARMR	GAHTNDVKQL	TEAVQKITTE	SIVIWKTPK	FKLPIQKETW
ETWWTEYWQA	TIPEWEFVN	TPPLVKLWYQ	LEKSPIVGAE	TFYVDGAANR
ETKLGKAGYV	TNRGRQKVVV	LTDTTNQKTE	LQAIYLALQD	SGLEVNIVTD
SOYALGIIQA	QPDQSESELV	NOIIEQLIKK	EKVYLAWVPA	HKGIGGNEQV

DKLVSAGIRK VLMGARASVL SGGELDRWEK IRLRPGGKKK YKLKHIVWAS
 RELERFAVNP GLEETSEGCR QILGQLQPSL OTGSEELRSL YNTVATLYCV
 HQRIEIKDTK EALDKIEEEQ NKSKKKAQQA AADTGHSNOV SQNYPIVQNI
 QGQMVHQAIS PRTLNAWVKV VEEKAFSPEV IPMFSALSEG ATPQDLNTML
 NTVGGHQAA QMLKETINEE AAEWDRVHPV HAGPIAPGQM REPRGSDIAG
 TTSTLQEQIG WMTNPPPIPV GEIYKRWIIL GLNKIVRMYS PTSILDIRQG
 PKEPFRDYVD RFYKTLRAEQ ASQEVKNWMT ETL LVQANANP DCKTILKALG
 PAATLEEMMT ACQGVGGPGH KARVLMVGFP VTPQVPLRPM TYKAAVDLSH
 FLKEKGGLEG LIHSQRRQDI LDLWIYHTQG YFPDWQNYTP GPGVRYPLTF
 GWCYKLPVE PDKVEEANKG ENTSLLHPVS LHGMDDPERE VLEWRFDSRL
 AFHHVARELH PEYFKNC *

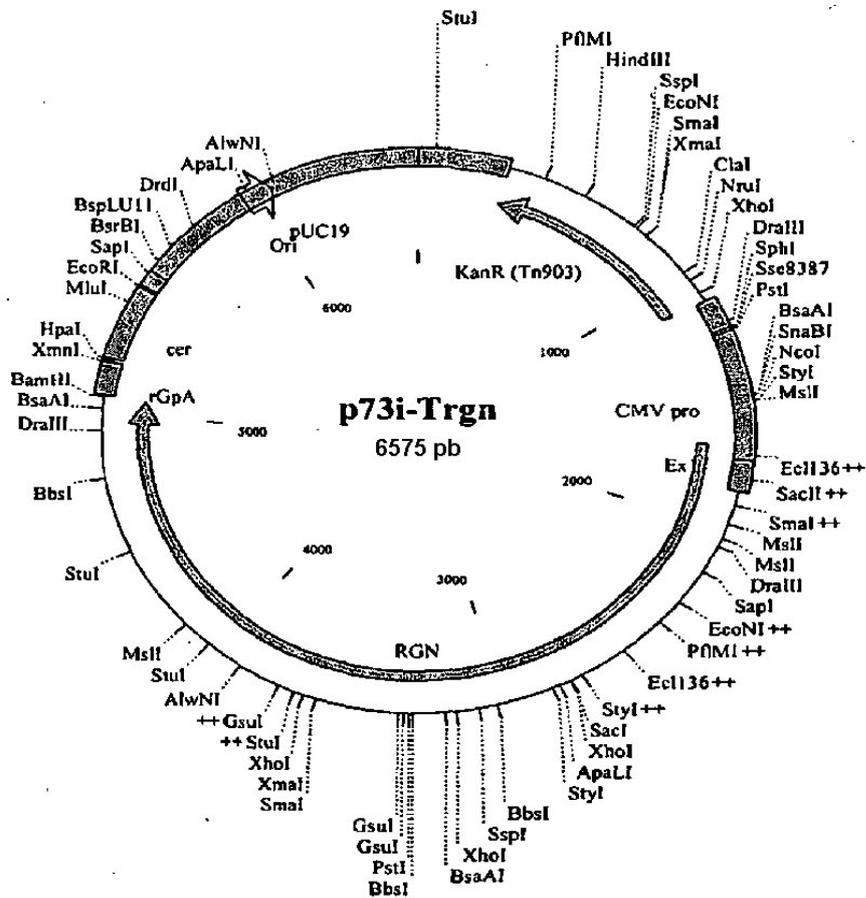


Figura 11

SEC ID Nº: 9

ATGGGCCCCATCAGTCCCATCGAGACCGTGCCGGTGAAGCTGAAACCCGGGATGGACGGCCCCAAGGTC
AAGCAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCGAGATGGAGAAAAGAG
GGCAAGATCAGCAAGATCGGGCCGGAGAACCATACAACACCCCGTGTGGCCATCAAGAAGAAGGAC
AGCACCAAGTGGCGAAGCTGGTGGATTTCGGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTC
CAGCTGGGCATCCCCATCCGGCCGGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGCTGGACGTGGGCGAC
GCTTACTTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCTATCAAC
AACGAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATT
TTCCAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTCGGAAAGCAGAACCCTGATATCGTACATCTACCAG
TACATGGACGACCTGTACGTGGGCTCTGACCTGGAAATCGGGCAGCATCGCACGAAGATTGAGGAGCTG
AGGCAGCATCTGCTGAGATGGGGCCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCCCTg
aaGATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCCCGAGAAGGACAGC
TGGACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGATC
AAGGTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCGCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTTCCCTCACGGAG
GAAGCCAGGCTCGAGCTGGCTGAGAACCGGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTACTATGAC
CCCTCCAAAGCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGAGTGGACATACCAGATTTACCAG
GAGCCTTTCAAGAACCCTCAAGACCGGCAAGTACGCCGCTATGAGGGGGCGCCACACCAACCTGCAAG
CAGCTGACCGAGGCCGTCAGAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAGTTC
AAGCTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTTGGCAGGCCACCTGGATTCCC
GAGTGGGAGTTCCGTGAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGCTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCATCGT
GGCGCGGAGACATTTACGTGGACGCGCGGCCAACCGCGAAACAAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTC
ACCAACCGGGCCCGCAGAAGGTCGTACCCCTGACCGACACCACCAACCAGAAGACGGAGCTGCAGGCC
ATCTATCTCGCTCCTCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACCGCTGGGC
ATTATTCAGGCCACCGCGGACCGAGTCCGAGAGCGAAGTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAG
AAAGAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTGACAAAG
CTGGTGAAGTGCAGGATGAGAAAGGTGCTGATGGTGGGTTTTCCAGTACACCTCAGTACCTTTAAGA
CCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTA
ATTCACTCCCAAAGAACACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTACCACACACAAGGCTACTTCCCTGAT
TGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTGAGATATCCACTGACCTTTGGATGGTGCTACAAGCTAGTA
CCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAACACCAGCTTGTACACCCCTGTGAGC
CTGCTGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGGTTTGACAGCCCGCTAGCATTTCAT
CACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCATGGGTGCCCGAGCTTCGCTACTGCT
GGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCGGAGGCAAAAGAAATACAAGCTCAAG
CATATCGTGTGGGCCCTGAGGGAGCTTGAACGGTTTTGCCGTGAACCCAGGCCCTGCTGGAAACATCTGAG
GGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAGACCCGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCCTG
TATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACCAGAGGATCGAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCCTTG
GACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCCCAGCAGGCAGCTGCTGACACTGGGCAT
AGCAACCCAGGTATCAGAACTATCCTATTGTCCAAACATTCAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATC
AGCCCCGGACGCTCAATGCCTGGGTGAAGTTGTGCGAAGAGAAGGCCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCC
ATGTTCTCCGCTTTGAGTGAAGGGGGCCACTCCTCAGGACCTCAATAACAATGCTTAATACCGTGGGCGGC
CATCAGGCCCGCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAGGAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCAT
CCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGGACAGATGCGGGAGCCTCGCGGCTCTGACATTGCCGGCACC
ACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAAATCCTCCCATCCCAGTTGGAGAAATCTAT
AAACGGTGGATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCCGATGTAATCTCTCCGACATCCATCCTTGACATT
AGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTCCAGCCGTTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAG
GCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACTCCTGGTACAGAACGCTAACCCCGACTGCAAA
ACAATCTGAAGGCACTAGGCCCGCTGCCACCTGGAAGAGATGATGACCCCTGTCAGGGAGTAGGC
GGACCCGGACACAAGCCAGAGTGTG

SEC ID Nº: 10

MGPISPIETV	PVKLKPMDG	PKVKQWPLTE	EKIKALVEIC	TEMEKEGKIS
KIGPENPYNT	PVFAIKKDS	TKWRKLVDFR	ELNKRTQDFW	EVQLGIPHPA
GLKKKKSIVT	LDVGDAYFSV	PLDEFKRYT	AFTIPISINNE	TPGIRYQYV
LPQGWKQSPA	IFQSSMTKIL	EPFRKQNPDI	VIYQYMDLY	VGSDLEIGQH
RTKIEELRQH	LLRWGLTPD	KKHQKEPFL	KMGYELHPDK	WTVQPIVLPE
KDSWTVNDIQ	KLVGKLNWAS	QIYPGIKVRQ	LCKLLRGTKA	LTEVIPLTEE
AELELAENRE	ILKEPVHGY	YDPSKDLIAE	IQKQGGQWT	YQIYQEPFKN
LKTGKYARMR	GAKTNDVKQL	TEAVQKITTE	SIVIWKTPK	FKLPIQKBTW
ETWWTEYWQA	TIPEWFEVN	TPPLVKLWYQ	LEKPIVGAE	TFYVDGAANR
ETKLGKAGYV	TNRGRQKVVT	LTDTTNQKTE	LQAIYLALQD	SGLEVNIVTD
SOYALGIIQA	QPDQSESELV	NQIIEQLIKK	EKVYLAWVPA	HKGIGGNEQV

Figura 12

SEC ID N°: 11

ATGGGTGCCCCGAGCTTCGGTACTGTCTGGTGGAGAGCTGGACAGATGGGAGAAAATTAGGCTGCGCCCC
GGAGGCAAAAAGAAATACAAGCTCAAGCATATCGTGTGGCCCTCGAGGGAGCTTGAACGGTTTGCCGTG
AACCCAGGCTTGCTGGAAACATCTGAGGGATGTCGCCAGATCCTGGGGCAATTGCAGCCATCCCTCCAG
ACCGGGAGTGAAGAGCTGAGGTCCTTGTATAACACAGTGGCTACCTCTACTGCGTACACCAGAGGATC
GAGATTAAGGATACCAAGGAGGCCCTTGGACAAAATTGAGGAGGAGCAAAACAAGAGCAAGAAGAAGGCC
CAGCAGGACAGCTGCTGACACTGGGCATAGCAACCAGGTATCACAGAACTATCCTATTGTCCAAAACATT
CAGGGCCAGATGGTTTCATCAGGCCATCAGCCCCCGGACGCTCAATGCCCTGGGTGAAGGTTGTTCGAAGAG
AAGGCCCTTTTCTCCTGAGGTTATCCCATGTTCTCCGCTTTGAGTGGGGGGCCACTCCTCAGGACCTC
AATACAATGCTTAATACCGTGGGCGGCCATCAGGCCGCCATGCAAAATGTTGAAGGAGACTATCAACGAG
GAGGCAGCCGAGTGGGACAGAGTGCATCCCGTCCACGCTGGCCCAATCGCGCCCGACAGATGCGGGAG
CCTCGCGGCTTGACATTGCCGGCACCACCTCTACACTGCAAGAGCAAATCGGATGGATGACCAACAAT
CCTCCCATCCAGTTGGAGAAATCTATAAACGGTGGATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGCGCATG
TACTCTCCGACATCCATCCTTGACATTAGACAGGGACCCAAAGAGCCTTTTAGGGATTACGTGACCCGG
TTTTATAAGACCCTGCGAGCAGAGCAGGCCCTCTCAGGAGGTCAAAAACCTGGATGACGGAGACACTCCTG
GTACACACAGTCAACCCCGACTGCAAAACAATCTTGAAGGCACTAGGCCCGGCTGCCACCCCTGGAAGAG
ATGATGACCGCCTGTCAGGGAGTAGGCCGACCCGGACACAAAGCCAGAGTGTGATGGTGGGTTTTCCA
GTCACACCTCAGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAA
GAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCAAAGAAGACAAGATATCCTTGATCTGTGGATCTAC
CACACACAAGGCTACTTCCCTGATTGGCAGAACTACACACCAGGGCCAGGGGTCAGATATCCACTGACC
TTTTGGATGGTGTACAAGCTAGTACCAGTTGAGCCAGATAAGGTAGAAGAGGCCAATAAAGGAGAGAAC
ACCAGCTTGTACACCTGTGAGCCTGCATGGGATGGATGACCCGGAGAGAGAAGTGTAGAGTGGAGG
TTTGACAGCCGCTAGCATTTCATCACGTGGCCCGAGAGCTGCATCCGGAGTACTTCAAGAACTGCATG
GGCCCCATCCCCATCCGBCCGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTCTGGACGTGGGCGACCGT
CAGTGGCCACTCACCGAGGAGAAGATCAAGGCCCTGGTGGAGATCTGCACCCGAGATGGAGAAAAGAGGGC
AAGATCAGCAAGATCGGGCCTGAGAACCATAACAACACCCCGTGTGTCATCAAGAAGAAGGACAGC
ACCAAGTGGCGCAAGCTGGTGGATTTCCGGGAGCTGAATAAGCGGACCCAGGATTTCTGGGAGGTCCAG
CTGGGCATCCCCATCCGBCCGCCTGAAGAAGAAGAAGAGCGTGACCGTGTCTGGACGTGGGCGACCGT
TACTTCAGCGTCCCTCTGGACGAGGACTTTAGAAAGTACACCGCCTTTACCATCCCATCTATCAACAAC
GAGACCCCTGGCATCAGATATCAGTACAACGTCTCTCCCCAGGGCTGGAAGGGCTCTCCCGCCATTTTC
CAGAGCTCCATGACCAAGATCCTGGAGCCGTTTTCGGAAGCAGAACCCCGATATCGTCATCTACCAGTAC
ATGGGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCBCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCTCACGGAGGAA
CAGCATCTGCTGAGATGGGCGCTGACCACTCCGGACAAGAAGCATCAGAAGGAGCCGCCATTCTCTgaaG
ATGGGCTACGAGCTCCATCCCGACAAGTGGACCGTGCAGCCTATCGTCTCTCCCGAGAAGGACAGCTGG
ACCGTGAACGACATCCAGAAGCTGGTGGGCAAGCTCAACTGGGCTAGCCAGATCTATCCCGGGATCAAG
GTGCGCCAGCTCTGCAAGCTGCTGCBCGGCACCAAGGCCCTGACCGAGGTGATTCCCTCACGGAGGAA
GCCGAGCTCGAGCTGGCTGAGAACCAGGAGATCCTGAAGGAGCCCGTGCACGGCGTGTACTATGACCCC
TCCAAGGACCTGATCGCCGAAATCCAGAAGCAGGGCCAGGGGCAGTGGACATACCAGATTTACCAGGAG
CCTTTCAAGAACCTCAAGACCCGCAAGTACGCCCGCATGAGGGGCGCCACACCAACGATGTCAAGCAG
CTGACCGAGGCCCTGCAAGATCACGACCGAGTCCATCGTGATCTGGGGGAAGACACCCAAAGTTCAAG
CTGCCTATCCAGAAGGAGACCTGGGAGACGTGGTGGACCGAATATTGGCAGGCCACCTGGATTCCCGAG
TGGGAGTTCTGTAATACACCTCCTCTGGTGAAGCTGTGGTACCAGCTCGAGAAGGAGCCCATCGTGGGC
CGGAGACATTCTACGTGGACGGCGCGCCCAACCGCGAAACAAGCTCGGGAAGGCCGGGTACGTCACC
AACCAGGGCCCGCAGAAGGTCGTCACCCTGACCGACACCAACCAACGAGAAGACGGAGCTGCAGGCCATC
TATCTCGCTCTCCAGGACTCCGGCCTGGAGGTGAACATCGTGACGGACAGCCAGTACGGCTGGGCATT
ATTACGGCCAGCCGACCTCCGAGAGCGAAGTGGTGAACCAGATTATCGAGCAGCTGATCAAGAAA
GAGAAGGTCTACCTCGCCTGGGTCCCGGCCATAAGGGCATTGGCGGCAACGAGCAGGTTCGACAAGCTG
GTGAGTGGGGGATTAGAAAGGTGCTGTAA

SEC ID N°: 12

MGARASVLSG	GELDRWEKIR	LRPGGKKKYK	LKHIVWASRE	LERFAVNPGL
LETSEGRQI	LGQLQPSLQT	GSEELRSLYN	TVATLYCVHQ	RIEIKDTKEA
LDKIEEEQNK	SKKKAQAAA	DTGHSNOVSQ	NYPIVQNIQG	QMVHQAI SPR
TLNAWVKVVE	EKAFSPEVIP	MFSALSEGAT	PQDLNMLNT	VGGHQAMQM
LKETINEEAA	EWRVHPVHA	GPIAPGQMR	PRGSDIAGTT	STLQEQIGWM
TNNPIPVGE	IYKRWILGL	NKIVRMYSPT	SILDIRQPK	EPFRDYVDRF
YKTLRAEQAS	QEVKNWMTET	LLVQANPDC	KTILKALGPA	ATLEEMMTAC
QGVGGPQHK	RVLVGFVPT	PQVPLRPMTY	KAAVDL SHFL	KEKGGLEGLI
HSQRRQDILD	LWIYHTQGYF	PDWQNYTPGP	GVRYP LTFGW	CYKLVVPEPD
KVEEANKGEN	TSLLHPVSLH	GMDDPEREVL	EWRFD SRLAF	HHVARELHPE

```

YFKNCMGPIS PIETVPVKLK PGMDGPKVKQ WPLTEEKIKA LVEICTEMEK
EGKISKIGPE NPYNTPVFAI KKKDSTKWRK LVDFRELNKR TQDFWEVQLG
IPHPAGLKKK KSVTVLDVGD AYFSVPLDED FRKYTAFTIP SINNETPGIR
YQYNVLPQGW KGSPAIFOSS MTKILEPFRK QNPDIVYQY MDDLYVGS DL
EIGQHRKIE ELRQHLLRWG LTPDKKHQK EPPFLKMGYE LHPDKWTVQP
IVLPEKDSWT VNDIQKLVGK LNWASQIYPG IKVRQLCKLL RGTKALTEVI
PLTEEALELEL AENREILKEP VHGYYDPSK DLIAEIQKQG OGQWYQIYQ
EPFKNLKTGK YARMRGAHTN DVKQLTEAVQ KITTESIVIW GKTPKFKLPI
QKETWETWWT EYWQATWIPE WEFVNTPLV KLWYQLEKEP IVGAETFYVD
GAANRETKLG KAGYVTNRGR QKVVTLTDTT NOKTELQAIY LALQDSGLEV
NIVTDSQYAL GIIQAOPDOS ESELVNQIIE QLIKKEKVYL AWVPAHKGIG
GNEQVDKLVS AGIRKVL*
    
```

