

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 209**

21 Número de solicitud: 201590017

51 Int. Cl.:

C12N 15/867 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

04.09.2013

30 Prioridad:

04.09.2012 EP 12382340

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.10.2015

71 Solicitantes:

LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE, S.A. (50.0%)

Avda. Mare de Déu de Montserrat, 221

08041 Barcelona ES y

**FUNDACIÓ PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE
LA SIDA - CAIXA (50.0%)**

72 Inventor/es:

SÁNCHEZ-PALOMINO, Sonsoles y

ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, Carmen

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Partículas víricas VSV-VIH que carecen de la funcionalidad transcriptasa inversa y aplicaciones terapéuticas de las mismas**

57 Resumen:

Partículas víricas VSV-VIH que carecen de la funcionalidad transcriptasa inversa y aplicaciones terapéuticas de las mismas.

La presente invención se refiere al desarrollo de viriones no replicativos que tienen una mutación en la secuencia que codifica la proteína RT y que comprenden un genoma de un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y vehiculizados por la proteína G de un virus de la estomatitis vesicular (VSV). Dichos viriones son útiles en medicina, concretamente para su uso en la generación de vacunas y más concretamente para el tratamiento del SIDA. Además la presente invención se refiere a un método para obtener una vacuna personalizada.

ES 2 549 209 A2

DESCRIPCIÓN

Partículas víricas VSV-VIH que carecen de la funcionalidad transcriptasa inversa y aplicaciones terapéuticas de las mismas

5

Campo de la invención

La presente invención se refiere a inmunógenos de VIH que carecen de una proteína transcriptasa inversa funcional y vehiculizados por la proteína G de un virus de estomatitis vesicular (VSV). La invención también se refiere a sus usos preventivos y terapéuticos y a métodos para obtener células inmunes activadas usando dichos inmunógenos.

Antecedentes de la invención

Se estima que más de 60 millones de personas en el mundo se han infectado con el virus de la inmunodeficiencia humana desde 1982. Casi la mitad de estos individuos infectados han muerto del síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) resultante en el mismo intervalo de tiempo. Aunque la propagación del virus parece haber alcanzado una meseta últimamente, se describieron 2,5 millones de nuevas infecciones por VIH en 2007. El VIH aún es un problema de salud pública principal. Véase, UNAIDS, 2008 Report on the Global AIDS Epidemic. En los Estados Unidos y Europa Occidental la morbilidad y mortalidad debido a la infección por VIH han disminuido de forma espectacular tras la introducción de terapias antirretrovirales de gran actividad (TARGA).

A pesar de su alta eficacia para controlar la replicación vírica y para restablecer la inmunidad contra infecciones oportunistas, TARGA es incapaz de erradicar el virus y recuperar las respuestas específicas contra VIH en personas infectadas por VIH. De hecho, tras la retirada de TARGA se produce en todos los casos un aumento rápido de la carga vírica. Véase, Carcelain G, *et al.*, J. Virol. 2001, 75(1):234-41. Esto implica que una vez iniciado la TARGA debe proseguirse de por vida, lo que es problemático por los graves efectos secundarios de diversa índole que puede comportar, como las alteraciones metabólicas y el riesgo cardiovascular que conlleva.

Actualmente el arsenal terapéutico contra la infección por VIH es muy completo y hay perspectivas de que seguirá creciendo de forma importante en los próximos años. Esta situación contrasta con los limitados avances obtenidos en el desarrollo de una vacuna

preventiva o terapéutica. Este hecho se debe, entre otras razones, a la diversidad genética, la rápida velocidad de replicación y la elevada frecuencia de mutación inherentes al VIH, la dificultad de inducción de anticuerpos neutralizantes, la falta de un modelo animal adecuado, el conocimiento limitado de la respuesta inmune capaz de generar protección frente a la infección por VIH y las diferentes vías de transmisión del virus. Véase, Autran B, *et al.*, Nat Rev Immunol 2003, 3(6):503-8 y Kaufmann S, *et al.*, Nat Med. 2005, 11(4 Supl):S33-44).

Un futuro objetivo para el diseño de vacunas consiste en aumentar su eficacia posibilitando su accesibilidad al mayor número de células presentadoras de antígeno (CPA) posibles y conseguir concentraciones locales altas requeridas para inducir potentes respuestas inmunológicas. Al facilitarse que los compuestos vacunales penetren adecuadamente en los sitios de inmunización ricos en CPA, así como la migración específica y la activación de las CPA, se incrementaría la eficacia de las nuevas vacunas en la inducción de respuestas inmunes protectoras. Las vacunas podrían ser eficientes para inducir respuestas inmunes fuertes y protectoras frente a patógenos si penetran adecuadamente y activan las células dendríticas (CD) que desempeñan un papel único como inductoras de respuestas específicas de antígeno. En el caso de la infección por VIH, la depuración del virus depende de la generación de anticuerpos pero también de la inducción de células efectoras y memoria T CD4+ y CD8+. Diversos estudios que profundizan en las respuestas inmunes de memoria, se han centrado en la importancia de constituir un conjunto funcional de células memoria T CD8+ para controlar la infección vírica y que precisa una función adecuada de las CPA y de respuestas de células T CD4+.

No hay en la actualidad ninguna vacuna preventiva o terapéutica aprobada para su utilización en VIH. Ninguna de las vacunas terapéuticas utilizadas ha mostrado eficacia a largo plazo respecto al control de la replicación vírica, el aumento de linfocitos CD4 o en la progresión a SIDA en estudios aleatorizados. Tradicionalmente se han utilizado vacunas de virus vivos atenuados para la prevención de infecciones víricas como por ejemplo, el sarampión, la parotiditis o la rubeola. Estas vacunas son altamente inmunogénicas porque imitan la infección natural tanto en la respuesta celular como humoral, e inducen una inmunidad de por vida después de una o dos dosis. En contraste, las vacunas que utilizan organismos muertos o subunidades no imitan la infección y la administración de estas vacunas induce solo una respuesta humoral, se requieren recuerdos periódicos para mantener los anticuerpos en las concentraciones adecuadas y además se utilizan adyuvantes como las sales de aluminio para incrementar estas respuestas que a veces son muy pobres. Véase, McMichael A, *et al.*, Nat Med. 2003, 9:874-80.

Algunas de estas estrategias de vacunas tradicionales no se pueden emplear para prevenir la infección por VIH o de forma terapéutica debido a problemas de seguridad o porque su eficacia ha sido nula cuando se han utilizado. Véase, Mwau M, *et al.*, J Gene Med. 2003; 5:3-10 y Moss R *et al.*, Vaccine 2000; 18:1081-87. Por ejemplo, las vacunas vivas atenuadas están prohibidas en seres humanos, ya que en experimentos con animales el virus de la inmunodeficiencia del simio (VIS) altamente atenuado que protegía a macacos adultos de infección por VIH producía SIDA en macacos neonatos, y algunos macacos adultos desarrollaron SIDA posteriormente. Además, el grado de atenuación se correlacionó de forma inversa con la inmunogenicidad. Véase, Wyand *et al.*, Nat Med. 1997; 3:32-36. Por otro lado, las vacunas de virus muertos no han mostrado resultados positivos en ensayos clínicos. Véase, Moss R, *et al.*, Vaccine 2000; 18:1081-87.

Por tanto, existe una necesidad antigua y continua en la técnica para inmunógenos de VIH para la preparación de vacunas más seguras y eficaces, particularmente vacunas terapéuticas autólogas de VIH.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a inmunógenos de VIH que carecen de una proteína transcriptasa inversa funcional y vehiculizados por la proteína G de un virus de estomatitis vesicular (VSV) capaces de generar una respuesta inmune.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un virión no replicativo que comprende el genoma de un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo; y en donde dicho virión comprende además una glicoproteína G de la envuelta de un virus de estomatitis vesicular (VSV).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una célula inmune activada que comprende las etapas:

- a) poner en contacto una célula inmune con un virión no replicativo de la invención,
- b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para la infección de dichas células inmunes por el virión y para que se procesen los antígenos procedentes del virión no replicativo, y

- c) opcionalmente, recuperar las células inmunes activadas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de una vacuna frente a VIH personalizada para un sujeto infectado con VIH, en donde dicha vacuna comprende células inmunes activadas, que comprende:

- a) poner en contacto *in vitro* células inmunes con un virión no replicativo de la invención, en donde el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, en donde dicha mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen; y en donde el genoma del VIH del virión comprende además una secuencia homóloga a la de la región delecionada mediante de la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, originario de un segundo genoma de VIH, en donde el genoma de dicho segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada y en el que el genoma de dicho segundo VIH se origina de un VIH de dicho sujeto infectado con un VIH;
- b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para la infección de dichas células por el virión y para que se procesen los antígenos provenientes del virión no replicativo;
- c) detectar y cuantificar la activación de las células inmunes activadas según las etapas a) y b);
- d) comparar la activación de dichas células inmunes activadas según las etapas a) y b) con la activación de células inmunes control,
- e) seleccionar los viriones que provocan una activación de las células inmunes activadas según las etapas a) y b) mayor que la activación de las células inmunes control,
- f) infectar células inmunes de dicho sujeto infectado con VIH con los viriones no replicativos seleccionados en la etapa e), y
- g) recuperar las células inmunes activadas según la etapa f).

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de una vacuna frente a VIH personalizada para un sujeto infectado con VIH, en donde dicha vacuna comprende células inmunes activadas, que comprende:

- a) poner en contacto *in vitro* células inmunes procedentes de dicho sujeto infectado con un VIH con un virión no replicativo de la invención, en donde el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, en donde dicha mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen; y en donde el genoma del VIH del virión comprende además una secuencia homóloga a la de la región delecionada por medio de la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, originario de un segundo genoma de VIH, en donde el genoma de dicho segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada y en el que el genoma de dicho segundo VIH se origina de un VIH de dicho sujeto infectado con un VIH;
- b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para la infección de dichas células por el virión y para que se procesen los antígenos provenientes del virión no replicativo; y
- c) recuperar las células inmunes activadas según la etapa b).

En otro aspecto, la invención se refiere a una célula obtenible por un método según la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a un genoma vírico de VIH que contiene una primera mutación en el gen *pol*, en donde dicha primera mutación causa que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo; en donde dicho genoma comprende además una segunda mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, en donde dicha segunda mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen.

En otro aspecto la invención se refiere a un vector que comprende un genoma vírico de VIH de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención o un vector de la invención junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

En aspectos adicionales, la invención se refiere a un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención, un vector de la invención o una composición inmunogénica o una vacuna de la invención para su uso en medicina así como para su uso en la prevención o tratamiento de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición o kit que comprende:

- (i) un polinucleótido que comprende un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo; y
- (ii) un polinucleótido que codifica la glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV).

En formas de realización adicionales, la composición o kit comprende al menos un tipo de virión de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la generación de un virión VIH recombinante que comprende:

- (i) cotransfectar una célula receptiva con:
 - a) un polinucleótido que codifica la glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV) y
 - b) un polinucleótido que comprende un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo, en donde el genoma de VIH comprende además una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol* y en donde el genoma del VIH comprende además una secuencia homóloga a la de la región delecionada mediante la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, originario de un segundo genoma de VIH, en donde el genoma de dicho segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada,

- (ii) mantener las células obtenidas en (i) en condiciones adecuadas para la formación de VIH, y
- (iii) recuperar los viriones de VIH de la célula.

5 Depósito de microorganismos

Se depositaron los plásmidos pNL4-3 Δ RT, pNL4-3 Δ RT/ Δ gag-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ env-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ env-nef-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ nef-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ gag-pro-[*LacZ*] y pNL4-3 Δ RT/ Δ 1136env el 27 de marzo, 2012 en la DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH), Inhoffenstraße 7 B, D-38124 Braunschweig, República Federal de Alemania. Los números de registro asignados a dichos depósitos fueron los siguientes:

Nombre del microorganismo en la descripción	Referencia de identificación dada por el depositante	Número de registro
pNL4-3 Δ RT	pNL4-3DRT	DSM 25917
pNL4-3 Δ RT/ Δ gag-[<i>LacZ</i>]	pNL4-3DRT/Dgag-[<i>LacZ</i>]	DSM 25918
pNL4-3 Δ RT/ Δ env-[<i>LacZ</i>]	pNL4-3DRT/Denv-[<i>LacZ</i>]	DSM 25919
pNL4-3 Δ RT/ Δ env-nef-[<i>LacZ</i>]	pNL4-3DRT/Denv-nef-[<i>LacZ</i>]	DSM 25920
pNL4-3 Δ RT/ Δ nef-[<i>LacZ</i>]	pNL4-3DRT/Dnef-[<i>LacZ</i>]	DSM 25921
pNL4-3 Δ RT/ Δ gag-pro-[<i>LacZ</i>]	pNL4-3DRT/Dgag-pro-[<i>LacZ</i>]	DSM 25922
pNL4-3 Δ RT/ Δ 1136env	pNL4-3DRT/D1136env	DSM 25923

15 Descripción de las figuras

Figura 1. A. Representación esquemática del genoma de VIH pNL4-3. **B.** Representación esquemática del pNL4-3 Δ RT. **C.** Representación esquemática de los vectores víricos pNL4-3 Δ RT/ Δ gag-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ env-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ env-nef-[*LacZ*], pNL4-3 Δ RT/ Δ nef-[*LacZ*] y pNL4-3 Δ RT/ Δ gag-pro-[*LacZ*] (1 a 5, respectivamente), en donde el gen *LacZ* (β -galactosidasa) sustituye a los fragmentos génicos correspondientes a los genes *gag*, *env*, *env-nef*, *nef* o *gag-pro*, respectivamente. LTR, repetición terminal larga; PR, proteasa; RT, transcriptasa inversa; INT, integrasa.

Figura 2. Medida de la actividad luciferasa para analizar la capacidad de infección/replicación de los viriones NL4-3 Ren WT, NL4-3 Ren WT inactivado por calor o NL4-3 Δ RT Ren (NL4-3 DRT Ren) tras 24 o 96 horas (h) de infección de las células MT-2. *Ren*: gen renilla, WT: cepa silvestre, ULR: unidades de luz relativas.

Figura 3. Medida de la actividad luciferasa para analizar la capacidad replicativa de los viriones NL4-3 Δ RT (deltaRT) y NL4-3 (WT) tras 72 horas de infección de las células TZM-bl. WT, tipo silvestre.

Figura 4. A. Células 293T co-transfectadas con pGAG-GFP (5 µg), pNL4-3 ΔRT (3 µg) + pGAG-GFP (2 µg) y pNL4-3WT (3 µg) + pGAG-GFP (2 µg). Panel superior, superposición de imágenes mostrando el núcleo celular, la actina cortical de la célula y la señal de visualización de la expresión de GAG-GFP. Panel inferior, visualización de la expresión de GAG-GFP mediante microscopía confocal. **B.** Infección de células PBMC (células mononucleares periféricas) con los viriones obtenidos tras la cotransfección de 293T con pGAG-GFP (5 µg), pNL4-3WT (3 µg) + pGAG-GFP (2 µg) y pNL4-3 ΔRT (3 µg) + pGAG-GFP (2 µg). Panel superior, superposición de imágenes mostrando el núcleo celular, la actina cortical de la célula y la expresión de GAG-GFP. Panel inferior, visualización de la localización de la señal GAG-GFP mediante microscopía confocal.

Figura 5. Visualización mediante microscopía electrónica de transmisión de las células 293T productoras de viriones NL4-3 **(A)** y NL4-3 ΔRT **(B)**. Viriones purificados de NL4-3 **(C)** y NL4-3 ΔRT **(D)**.

Figura 6. Inmunotransferencia de extractos proteicos de células 293T transfectadas con pNL4-3 y pNL4-3 ΔRT (ΔRT). Se usó un anticuerpo monoclonal anti-p24 para estudiar el perfil de procesamiento de Gag en viriones NL4-3/ΔRT y NL4-3.

Figura 7. Esquema secuencial del modelo *ex vivo* del ensayo de CD-DM. CD-DM, células dendríticas derivadas de monocitos; CFSE, éster disuccinimidílico de diacetato de 5-6-carboxifluoresceína.

Figura 8. Valoración de la respuesta celular de las células CD-DM frente a diferentes inmunógenos: BaL30 (cepa R5 de VIH-1 inactivado por calor), p24 recombinante inactivado por calor, NL4-3 WT o NL4-3 ΔRT, en un paciente de VIH. Se cuantifica el índice de proliferación (S.I.) **(A)**, y la producción de IL-2 **(B)** e interferón γ (IFN-g) **(C)**.

Figura 9. Resultados de la respuesta celular obtenida en el modelo *ex vivo* de CD-DM pulsadas con los siguientes inmunógenos: NL4-3 WT inactivado por calor (NL-4.3 calor) o NL4-3 ΔRT (NI-4.3-ΔRT). Ensayo realizado con 8 pacientes respondedores y frente a un mismo lote de inmunógenos, con un grado de significancia de 0,01 **. WT, tipo silvestre; CD-DM, células dendríticas derivadas de monocitos; IFN-g, interferón γ; S.I., índice de proliferación.

Figura 10. Comparación de los resultados obtenidos utilizando el modelo de cocultivo con CD-DM y el modelo *ex vivo* establecido con PBMC. CD-DM, células dendríticas derivadas de monocitos; PBMC, células mononucleares periféricas.

5 **Figura 11.** Visualización mediante microscopía electrónica de viriones NL4-3 purificados obtenidos por transfección de células 293T en ausencia **(A)** o en presencia **(B)** de Amprenavir (inhibidor de la proteasa).

Figura 12. A. Representación esquemática de del genoma de VIH pNL4-3/ Δ RT/ Δ 1136env.

10 **Figura 13.** Visualización mediante microscopía electrónica de transmisión de las células 293T productoras de viriones NL4-3 **(A)** y NL4-3 Δ RT **(B)**. También se muestran los viriones purificados de dichas células. También se muestran células 293T productoras de viriones Δ RT/ Δ 1136env/VSV así como pseudoviriones de células 293T transfectadas con p Δ RT/ Δ 113env + pVSV-G **(C)**.

15

Figura 14. Infección de células THP-1 con viriones NL4-3, NL4-3/ Δ RT y NL4-3/ Δ RT-VSV. Se marcaron los lisosomas de las células THP-1 con un marcador liso-seguidor. Los viriones se marcaron con Gag-GFP. Los núcleos se marcaron con DAPI. La entrada en las células era independiente de lisosomas en viriones NL4-3 y NL4-3/ Δ RT mientras que en el caso de NL4-3/ Δ RT-VSV es dependiente de la ruta lisosomal mostrado por la colocalización de gag-GFP y el colorante lisosomal.

20

Figura 15. Perfil proteico de los viriones NL4-3, NL4-3/ Δ RT y NL4-3/ Δ RT/ Δ 1136env. Los viriones purificados por ultracentrifugación se usaron para extraer proteínas y separarlas en un gel de Tris-Glicina en gradiente del 4-12%. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-p24 para estudiar el perfil de procesamiento de Gag en viriones NL4-3/ Δ RT, NL4-3/ Δ RT-VSV y NL4-3. Hay un procesamiento de Gag más débil en viriones NL4-3/ Δ RT y NL4-3/ Δ RT-VSV representado por un aumento en las formas p55gag y MA-CA p41 en detrimento de CA p24. En el mismo, también se muestra un aumento de las formas intermedias en viriones NL4-3/ Δ RT.

25

30

Figura 16. A. Frecuencia de respuestas positivas de IFN- γ -ELISPOT y magnitud obtenida frente a los inmunógenos indicados. Las barras blancas muestran el porcentaje de respuestas positivas (%) mientras que cada símbolo representa la media de CFM (células formadoras de mancha/106 células) $\pm$ EEM contadas por pocillo después de la resta del fondo basal. **B.** Se ensayaron veintiún PBMC crioconservadas de individuos positivos para VIH por ELISPOT para

35

detectar la producción IFN- γ . Las PBMC se pulsaron con 200 ng/ml de equivalentes de p24 en todos los casos. La magnitud de la respuesta fue significativamente menor contra viriones inactivados WT (WT+AT-2) que contra WT+APV+AT-2 (* $p < 0,05$). Los valores promediados de pocillos duplicados normalizados a CFM/ 10^6 PBMC se muestran para las condiciones de estimulación indicadas. Los gráficos representan media $\pm$ error estándar de la media (EEM). Se definió el umbral de positividad para cada construcción o antígeno como al menos 50 CFM/ 10^6 PBMC y al menos dos veces la del medio control.

Figura 17. Evaluación de la respuesta celular de células CD-DM frente a diferentes inmunógenos: NL4-3, WT+AT-2, NL4-3 Δ RT/VSV, NL4-3 Δ RT y p24 recombinante, y diferentes concentraciones (0,5, 1 y 5 μ g/ml de p24). La prueba se realizó con 9 pacientes respondedores y frente al mismo lote de inmunógenos. Se cuantifica el índice de proliferación en CD8 $^+$.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a viriones no replicativos que comprenden un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que carecen de una proteína transcriptasa inversa funcional y dirigidos por la glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV) para el fin de obtener vacunas autólogas y heterólogas, tanto preventivas como terapéuticas, contra la infección por VIH/SIDA.

Al vectorizar estos inmunógenos con VSV, el riesgo de reversión vírica de VIH disminuye y su respuesta inmune aumenta, proporcionando así una solución más adecuada para su aplicación clínica. Las partículas víricas de la invención son capaces de inducir una respuesta inmune mayor que la respuesta inmune generada por otras partículas no vectorizadas por la glicoproteína G de VSV. Véase la figura 16.

Los inmunógenos de la invención tienen ventajas adicionales, ya que son más seguros que otros inmunógenos de VIH conocidos debido al hecho de que los viriones de la invención son incapaces de replicarse.

a) *Definiciones de términos y expresiones generales*

El término "célula inmune activada", como se usa en el presente documento, se refiere a una célula inmune que, tras ser tratada con factores inmunogénicos, es capaz de generar una

respuesta inmune frente a dichos inmunógenos. Dichas células inmunes pueden ser, entre otras, linfocitos o células dendríticas (CD).

El término “adyuvante”, como se usa en el presente documento, se refiere a un agente inmunológico que modifica el efecto de un inmunógeno, mientras que tiene pocos, si alguno, efectos directos cuando se administra por sí mismo. Con frecuencia se incluye en vacunas para aumentar la respuesta inmune del receptor al antígeno suministrado, al tiempo que mantiene el material exógeno inyectado a un mínimo. Los adyuvantes se añaden a las vacunas para estimular la respuesta del sistema inmune al antígeno diana, pero no confieren inmunidad por sí mismos. Ejemplos no limitantes de adyuvantes útiles incluyen sales minerales, polinucleótidos, poliargininas, ISCOM, saponinas, monofosforil lípido A, imiquimod, inhibidores de CCR5, toxinas, polifosfacenos, citoquinas, proteínas inmunorreguladoras, proteínas de fusión inmunoestimuladoras, moléculas coestimuladoras y combinaciones de los mismos. Las sales minerales incluyen, pero no están limitadas a, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$, sílice, alumbre, $\text{Al}(\text{OH})_3$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, caolín o carbono. Los polinucleótidos inmunoestimuladores útiles incluyen, pero no están limitados a, oligonucleótidos de CpG con o sin complejos inmunoestimuladores (ISCOM), oligonucleótidos de CpG con o sin poliarginina, ácidos poli IC o poli AU. Las toxinas incluyen toxina del cólera. Las saponinas incluyen, pero no están limitadas a, QS21, QS17 o QS7. Un ejemplo de una proteína de fusión inmunoestimuladora útil es la proteína de fusión de IL-2 con el fragmento Fc de inmunoglobulina. Las moléculas inmunorreguladoras útiles incluyen, pero no están limitadas a, CD40L y ligando CD1a. Las citoquinas útiles como adyuvantes incluyen, pero no están limitadas a, IL-1, IL-2, IL-4, GMCSF, IL-12, IL-15, IGF-1, IFN- α , IFN- β e interferón gamma. Además, ejemplos de adyuvantes son muramil dipéptidos, tales como N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-DMP), N-acetil-normuramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11687, también denominado nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(1'2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835A, también denominado MTP- PE), RIBI (MPL+TDM+CWS) en una emulsión al 2% de escualeno/TWEEN® 80, lipopolisacáridos y sus varios derivados, incluyendo lípido A, adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund, Adyuvante 65 de Merck, polinucleótidos (por ejemplo, ácidos poli IC y poli AU), cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, sustancias encontradas en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, y miembros del género *Brucella*, Titermax, Quil A, ALUN, derivados de lípido A, derivados de la toxina del cólera, derivados de HSP, derivados de LPS, derivados de MPL, matrices de péptidos sintéticos o GMDP, Montanide ISA-51 y QS-21, oligonucleótido CpG, poli I:C y GMCSF. Véase, Osol A., Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.,

Easton, PA, EE UU, 1980, pp. 1324-1341), Hunter R, US 5.554.372 y Jager E, Knuth A, WO1997/028816. También se pueden usar combinaciones de adyuvantes.

El término “SIDA”, como se usa en el presente documento, se refiere a la fase sintomática de la infección por VIH, e incluye tanto el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (comúnmente conocido como SIDA), como “ARC”, o complejo relacionado con SIDA. Véase, Adler M, *et al.*, Brit. Med. J. 1987; 294: 1145-1147. Las manifestaciones inmunológicas y clínicas del SIDA se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, infecciones oportunistas y cánceres resultantes de la inmunodeficiencia.

El término “deleción completa”, como se usa en el presente documento, se refiere a la pérdida del 100% de los nucleótidos que constituyen la secuencia nucleotídica de un gen.

Los términos “comprender” o “comprende”, como se usan en el presente documento, indican también “consistir en” según la práctica de patentes generalmente aceptada.

El término “células inmunes control”, como se usa en el presente documento, se refiere a células inmunes activadas con preparaciones víricas, tales como virus inactivados mediante calor o tratamiento químico, o con partículas víricas deficientes que tienen genes heterólogos, viriones inmaduros obtenidos por diferentes mecanismos tales como tratamiento con inhibidores de la proteasa o por mutaciones, proteínas recombinantes o combinaciones de péptidos.

El término “cotransfectar”, como se usa en el presente documento, se refiere a la transfección simultánea con dos moléculas separadas y no relacionadas de ácido nucleico.

El término “célula dendrítica”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de una población diversa de tipos celulares morfológicamente similares encontradas en tejidos linfoides o no linfoides. Las células dendríticas son una clase de células presentadoras de antígeno “profesionales”, y tienen una gran capacidad para sensibilizar células T restringidas en HLA. Específicamente, las células dendríticas incluyen, por ejemplo, células dendríticas plasmacitoides, células dendríticas mieloides (generalmente las células dendríticas usadas, incluyendo células dendríticas inmaduras y maduras), células de Langerhans (células dendríticas mieloides importantes como células presentadoras de antígeno en la piel), células interdigitales (distribuidas en los ganglios linfáticos y la región de células T del bazo, y que se cree que funcionan en la presentación de antígeno a células T).

Todas estas poblaciones de CD derivan de células hematopoyéticas de la médula ósea. Las células dendríticas también incluyen células dendríticas foliculares, que son importantes como células presentadoras de antígeno para células B, pero que no derivan de células hematopoyéticas de médula ósea. Las células dendríticas se pueden reconocer por la función, o por el fenotipo, particularmente por el fenotipo de superficie celular. Estas células se caracterizan por su morfología distintiva (tienen proyecciones como velos en la superficie celular), niveles de expresión de intermedios a altos de HLA de clase II en superficie y capacidad de presentar antígenos a células T, particularmente a células T indiferenciadas. Véase, Steinman R, *et al.*, Ann. Rev. Immunol. 1991; 9:271-196. La superficie celular de las células dendríticas se caracteriza por la expresión de los marcadores de superficie celular CD1a+, CD4+, CD86+ o HLA-DR+.

La expresión “enfermedad asociada con una infección por VIH”, como se usa en el presente documento, incluye un estado en el que el sujeto ha desarrollado SIDA, pero también incluye un estado en el que el sujeto infectado con VIH no ha mostrado ningún signo o síntoma de la enfermedad.

El término “*env*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína gp160 de la envuelta vírica de VIH.

El término “gen funcional”, como se usa en el presente documento, se refiere a un gen capaz de codificar una proteína funcional. Se pueden usar diferentes métodos del estado de la técnica para analizar la función de las proteínas codificadas por los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr*. Dichos métodos dependerán de la función de dicha proteína.

El término “*gag*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína p55 de la cápside formada por 3 subunidades de proteína (MA, CA y NC).

El término “glicoproteína G”, como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína de la envuelta del VSV que permite la entrada del virus, ya que media la unión del virus a la célula huésped, donde el virus es endocitosado, y después media la fusión de la envuelta vírica con la membrana endosomal (por ejemplo, no. de registro de la base de datos Uniprot KB Q6EH37, versión 19, 13 de junio de 2012). El término glicoproteína G también se usa para referirse a la glicoproteína G de VSV de otras cepas o aislados del virus y también a variantes funcionalmente equivalentes de la misma. Como se usa en el presente documento, “variante funcionalmente equivalente de la glicoproteína G de VSV” se entiende como un polipéptido

capaz de complementar el mutante G sensible a temperatura de VSV tsO45 a una temperatura no permisiva y que tiene una identidad mínima en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de la glicoproteína G de VSV. Véase, Lefkowitz E, *et al.*, Virology 1990; 178(2):373-383. Las variantes funcionalmente equivalentes de la glicoproteína G de VSV incluyen polipéptidos que muestran al menos el 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% de similitud o identidad con las variantes naturales diferentes de la glicoproteína G mencionada anteriormente. Las variantes de la glicoproteína G de VSV pueden ser tanto naturales como artificiales. La expresión “variante natural” se refiere a todas esas variantes de la glicoproteína G de VSV definida anteriormente que se producen de forma natural en otras cepas. La expresión “variante artificial” se refiere a un polipéptido recombinante o sintético. El término “proteína gp160” se refiere al producto del gen *env* y es un precursor de las proteínas de la envuelta gp120 y gp41.

El término “genoma de VIH” o “genoma vírico de VIH”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ARN de aproximadamente 9749 nucleótidos de longitud encerrada por la cápside de VIH y que codifica los genes *gag*, *pol*, *env*, *tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, *vpu*, *vpx* y, opcionalmente, *tev*. La secuencia del genoma de VIH subyace una alta variabilidad, por esta razón, el genoma de VIH al que hace referencia la invención no se limita a ninguna secuencia específica. Las secuencias preferidas son las de los tipos y subtipos de VIH recitados en el presente documento.

La expresión “sujeto infectado por VIH-1”, como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto humano infectado por VIH-1. Los sujetos infectados por VIH-1 se identifican mediante afecciones clínicas asociadas con la infección por VIH y recuentos de linfocitos T CD4+. Desde un punto de vista práctico, el médico ve la infección por VIH-1 como un espectro de trastornos que varían desde infección primaria con o sin el síndrome agudo de VIH hasta el estado de infección sintomática de enfermedad avanzada. El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Atlanta, Georgia, ha establecido una definición autorizada para el diagnóstico de SIDA, que informa al experto en la materia de si se ha producido el inicio del SIDA: en un sujeto infectado por VIH, el recuento de células T CD4+ debe estar por debajo de 200 células por mm cúbico de sangre, o debe haber aparición clínica de una infección oportunista inicial que define SIDA, tal como PCP (es decir, neumonía por *Pneumocystis carinii*), candidiasis oral, tuberculosis pulmonar o carcinoma cervical invasivo. Los métodos de determinar el recuento de células T CD4+ de un sujeto se conocen en la técnica.

El término “secuencia homóloga”, como se usa en el presente documento, se refiere a la secuencia de un gen de un genoma A equivalente a una secuencia de ese mismo gen en un genoma B. A modo de ilustración, para la secuencia del gen *env* en un genoma A (por ejemplo, un genoma de un VIH), su secuencia homóloga será la secuencia del gen *env* de un genoma B (por ejemplo, un genoma de un VIH diferente).

El término “virus de la inmunodeficiencia humana” o “VIH”, como se usa en el presente documento, se pretende que incluya VIH-1 y VIH-2. “VIH-1” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. VIH-1 incluye pero no está limitado a partículas extracelulares de virus y formas de VIH-1 asociadas con células infectadas con VIH-1. “VIH-2” significa el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 2. VIH-2 incluye pero no está limitado a partículas extracelulares de virus y formas de VIH-2 asociadas con células infectadas con VIH-2. Preferiblemente, VIH es VIH-1.

El término “composición inmunogénica”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que provoca una respuesta inmune que produce anticuerpos o respuestas inmunes celulares contra un inmunógeno específico.

El término “infeccioso”, como se usa en el presente documento, se refiere a un virión capaz de infectar células, bien porque las proteínas de la envuelta gp120 o gp41 del virión interaccionan con los receptores CD4 y los correceptores (CCR5 o CXCR4) en la superficie de la célula, produciendo de esta manera la fusión de las membranas vírica y celular; o porque VSV-G media la entrada vírica mediante endocitosis.

El término “kit”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición o combinación de un conjunto de componentes adecuados para generar un virión de la invención en una célula receptiva mediante cotransfección de un polinucleótido que comprende un genoma de VIH de la invención y un polinucleótido que codifica la proteína VSV-G, junto con uno o más tipo de elementos o componentes (por ejemplo, otros tipos de reactivos bioquímicos, envases, embalaje adecuado para su venta comercial, medios, aditivos, líneas celulares, etc.). Ambos polinucleótidos se pueden formular como una única formulación o se pueden presentar como formulaciones separadas de cada uno de los componentes, que se pueden combinar para el uso conjunto como una preparación combinada. La composición puede ser un kit de partes en donde cada uno de los componentes se formula y empaqueta individualmente.

La expresión “carece de una proteína gp160 funcional”, como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que la proteína gp160 o sus productos gp120 o gp41 son incapaces de unirse a la superficie de la célula diana. Particularmente, un virión puede carecer de una proteína gp160 funcional cuando: (i) la proteína gp120 es incapaz de unirse al receptor CD4 de una célula diana; (ii) la proteína gp120 es capaz de unirse al receptor CD4 de una célula diana pero incapaz de unirse a los correceptores CCR5 o CXCR4; (iii) la proteína gp120 es incapaz de unirse a los tres receptores CD4, CCR5 y CXCR4; (iv) la proteína gp41 es incapaz de ayudar en la fusión de la partícula vírica con la célula diana, o (v) una combinación de cualquiera de las anteriores (i) a (iv). La expresión “carece de una proteína gp160 funcional” también se refiere a viriones que tienen una proteína gp160 que no se procesa en sus productos gp120 y gp41 y, por tanto, es incapaz de producir proteínas funcionales gp120 o gp41.

El término “gen marcador” o “gen indicador”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica un producto que da lugar a una señal que puede ser fácilmente medida o detectada. Los genes marcadores incluyen, pero no se limitan a, el gen GFP (proteína fluorescente verde), el gen *LacZ* que codifica la proteína β -galactosidasa, el gen de la luciferasa de renilla o luciérnaga que codifican la proteína luciferasa.

El término “mutación”, como se usa en el presente documento, se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico. Dicha mutación incluye, pero no está limitada a, sustitución (es decir, intercambio de uno o más nucleótidos por otros), inversión (es decir, un segmento de ADN del interior de un gen se invierte, para ello son necesarias dos rotaciones de 180°, una para invertir la secuencia y la otra para mantener la polaridad del ADN), translocación (es decir, un segmento de un gen cambia de posición para estar en otro lugar distinto del mismo gen o en otro lugar del genoma), e inserciones o deleciones de nucleótidos (es decir, la adición de uno o más nucleótidos (inserciones o adiciones) o la pérdida de uno o más nucleótidos (deleciones) que tienen como consecuencia cambios en el marco de lectura, produciéndose un error de lectura durante la traducción que conlleva desde la formación de proteínas no funcionales hasta la ausencia de dicha proteína).

El término “*nef*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína Nef que controla negativamente moléculas CD4 y HLA de la célula infectada y desempeña un papel en la patogenicidad del virus.

El término “proteína RT no funcional”, como se usa en el presente documento, se refiere al hecho de que la proteína RT no tenga función transcriptasa inversa (es decir, no sea capaz de sintetizar ADN bicatenario utilizando como molde ARN monocatenario). Se pueden usar diferentes métodos del estado de la técnica para analizar la función de dicha proteína; dichos métodos dependerán de la función de la proteína. Así, por ejemplo, para determinar si la proteína RT es funcional pueden realizarse diversos ensayos, entre otros, reacciones de transcripción inversa de una secuencia de ARN, o analizar la ausencia de replicación de un virus como consecuencia de poseer una proteína RT no funcional determinando colorimétrica o fluorimétricamente la presencia de un gen marcador del genoma vírico en células infectadas con un virión que comprende la secuencia que codifica la proteína RT que se quiere analizar.

El término “deleción parcial”, como se usa en el presente documento, se refiere a la pérdida de al menos el 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99% de los nucleótidos que forman una secuencia de nucleótidos de un gen.

La expresión “soporte farmacéuticamente aceptable”, como se usa en el presente documento, se refiere a un vehículo o excipiente que está implicado en llevar o transportar un producto de interés de un tejido, órgano o parte del cuerpo a otro tejido, órgano o parte del cuerpo, y que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que es generalmente segura y no tóxica.

El término “*pol*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica las enzimas víricas necesarias para el proceso de replicación vírica: proteasa (PRO), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (INT).

El término “polinucleótido”, como se usa en el presente documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud y formada por ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. El término incluye polinucleótidos tanto mono como bicatenarios, así como polinucleótidos modificados (metilados, protegidos y similares). Los términos “prevenir” y “prevención”, como se usan en el presente documento, se refieren a inhibir el origen o disminuir la aparición de una enfermedad en un sujeto. La prevención puede ser completa (por ejemplo, la ausencia total de células patológicas en un sujeto). La prevención también puede ser parcial, de modo que, por ejemplo, la aparición de células patológicas en un sujeto es menor de la que hubiera producido sin la presente invención. Prevención también se refiere a la susceptibilidad reducida a un estado clínico.

El término “proteasa”, como se usa en el presente documento, se refiere a la aspartil proteasa retrovítica codificada por el gen *pol* que corta poliproteínas recién sintetizadas en los sitios apropiados para crear los componentes proteicos maduros de un virión VIH infeccioso. Sin la proteasa eficaz, los viriones VIH permanecen no infecciosos. Por tanto, la mutación del sitio activo de la proteasa de VIH o la inhibición de su actividad altera la capacidad de VIH de replicarse e infectar células adicionales.

El término “pseudotipado”, como se usa en el presente documento, se refiere a proporcionar a la envuelta vírica que tiene proteínas codificadas por el genoma, parcial o como un todo, de una especie de virus a otra especie.

El término “pseudoviriones”, como se usa en el presente documento, se refiere a viriones que tienen una envuelta vírica con proteínas codificadas por el genoma, bien parcial o como un todo, de una especie de virus a otra especie.

La expresión “virión VIH recombinante”, como se usa en el presente documento, se refiere a un virión obtenido por técnicas recombinantes y que tiene el genoma VIH de la invención dentro de la cápside y la glicoproteína G de VSV en la envuelta.

El término “*rev*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína Rev responsable de procesar el ARN mensajero y transportarlo al citoplasma.

El término “transcriptasa inversa” o “RT”, como se usa en el presente documento, se refiere a la ADN polimerasa dependiente de ARN que transcribe el genoma de ARN monocatenario de un virus a ADN monocatenario, que después se integra en el genoma del huésped y se replica junto al mismo. El término “transcriptasa inversa”, como se usa en el presente documento, está codificada por el gen *pol* de un virus, particularmente del virus VIH-1. El término transcriptasa inversa de VIH-1 también se usa para referirse a la transcriptasa inversa de VIH-1 de otras cepas o aislados del virus. La secuencia de ácido nucleico y aminoácidos de un gran número de transcriptasas inversas de VIH-1 están fácilmente disponibles al público. Véase, la base de datos de secuencias de VIH, <http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/HIV/mainpage.html>, agosto, 2012; Base de datos y compendio de VIH de Los Alamos, <http://www.hiv.lanl.gov/>, agosto, 2012.

El término “*tat*”, como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína Tat, un transactivador y elongador del ARN mensajero vírico.

El término “tratar” o “tratamiento”, como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de una composición farmacéutica de la invención (es decir, una composición inmunogénica o una vacuna) o de un medicamento que la contiene para controlar la evolución de la enfermedad después de que hayan aparecido sus signos clínicos. Se entiende que control de la evolución de la enfermedad significa los resultados clínicos beneficiosos o deseados que incluyen, pero no están limitados a, reducción de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estabilización de estados patológicos (específicamente para evitar deterioro adicional), retraso de la evolución de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como total). El control de la evolución de la enfermedad también implica una extensión de la supervivencia, comparada con la supervivencia esperada si no se aplicara el tratamiento. Dentro del contexto de la presente invención, los términos “tratar” y “tratamiento” se refieren específicamente a prevenir o retrasar la infección y destrucción de células T CD4+ sanas en un sujeto infectado por VIH. También se refiere a la prevención y retraso del inicio de los síntomas de la enfermedad de inmunodeficiencia adquirida tales como recuento de células T CD4+ extremadamente bajo e infecciones repetidas por patógenos oportunistas tales como *Mycobacteria spp.*, *Pneumocystis carinii*, y *Pneumocystis cryptococcus*. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no están limitados a, un aumento en el recuento de células T CD4+ indiferenciadas absoluto (intervalo 10-3520), un aumento en el porcentaje de células T CD4+ sobre las células inmunes circulantes totales (intervalo 1-50%) o un aumento en el recuento de células T CD4+ como porcentaje del recuento de células T CD4+ normales en un sujeto sin infectar (intervalo 1-161%). “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia del sujeto infectado comparada con la supervivencia esperada si el sujeto no recibiera ningún tratamiento dirigido a VIH.

El término “vacuna”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición inmunogénica para la administración *in vivo* a un huésped, que puede ser un primate, especialmente un huésped humano, para conferir protección contra una enfermedad, particularmente una enfermedad vírica.

El término “vector”, como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende las secuencias necesarias de modo que después de transcribir y traducir dichas secuencias en una célula se genere una partícula vírica no replicativa. Dicha secuencia está operativamente unida a segmentos adicionales que aseguran su replicación autónoma en una célula huésped de interés. Preferiblemente, el vector es un vector de expresión, que se define como un vector, que además de las regiones de replicación autónoma

en una célula huésped, contiene regiones operativamente unidas al genoma de la invención y que son capaces de potenciar la expresión de productos del genoma según la invención. Los vectores de la invención se pueden obtener por medio de métodos ampliamente conocidos en la técnica. Véase, Brown T, "Gene Cloning" (Chapman & Hall, Londres, GB, 1995); Watson R, *et al.*, "Recombinant DNA", 2ª Ed. (Scientific American Books, Nueva York, NY, EE UU, 1992); 5 Alberts B, *et al.*, "Molecular Biology of the Cell" (Garland Publishing Inc., Nueva York, NY, EE UU, 2008); Innis M, *et al.*, Eds., "PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications" (Academic Press Inc., San Diego, CA, EE UU, 1990); Erlich H, Ed., "PCR Technology. Principles and Applications for DNA Amplification" (Stockton Press, Nueva York, NY, EE UU, 10 1989); Sambrook J, *et al.*, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, EE UU, 1989); Bishop T, *et al.*, "Nucleic Acid and Protein Sequence. A Practical Approach" (IRL Press, Oxford, GB, 1987); Reznikoff W, Ed., "Maximizing Gene Expression" (Butterworths Publishers, Stoneham, MA, EE UU, 1987); Davis L, *et al.*, "Basic Methods in Molecular Biology" (Elsevier Science Publishing Co., Nueva York, 15 NY, EE UU, 1986), Schleef M, Ed., "Plasmid for Therapy and Vaccination" (Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, DE, 2001).

El término "*vif*", como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína Vif asociada con la infectividad de viriones extracelulares.

20 El término "virión", como se usa en el presente documento, se refiere a una partícula vírica infecciosa deficiente en replicación que comprende el genoma vírico de VIH empaquetado en una cápside y, opcionalmente, en una envuelta lipídica que rodea la cápside, en donde la envuelta de la partícula vírica comprende una glicoproteína G de un virus de la estomatitis vesicular (VSV). Como se usa en el presente documento, "virión no replicativo", se refiere a un virión que carece de la capacidad de multiplicar su material genético y por tanto no se pueden formar nuevas copias de dicho virión. Para determinar si un virión es no replicativo se pueden usar los mismos ensayos que para determinar si una proteína RT es funcional. Los ensayos 25 específicos se divulgan en las secciones 2.1 y 2.2 de los procedimientos generales de la presente descripción.

El término "*vpr*", como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína Vpr que actúa como un acelerador para el ciclo de replicación a diferentes niveles.

35 El término "*vpu*", como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la proteína Vpu implicada en la liberación de viriones.

Los términos “VSV” o “virus de la estomatitis vesicular”, como se usan en el presente documento, se refiere a un virus ARN de cadena negativa de aproximadamente 11 kb de tamaño de la familia de los rhabdovirus. VSV también se conoce como “virus de la estomatitis vesicular indiana” o “VSIV”. Actualmente, se han descrito ocho subtipos de VSV en la técnica. Véase, http://viralzone.expasy.org/complete_by_species/21.html#tab6, agosto, 2012.

El término “VSV-G”, como se usa en el presente documento, se refiere a la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular que pertenece a la familia de los rhabdovirus.

b) Viriones, genomas víricos y vectores de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un virión no replicativo, en adelante virión de la invención, que comprende un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido solamente de dicho genoma sea un virus no replicativo; y en donde dicho virión comprende además una glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV).

En una forma de realización particular, el genoma de VIH que se ha usado para obtener los vectores víricos de la invención corresponde al genoma pNL4-3 de VIH-1 (no. de registro de GenBank M19921.1 (SEQ ID NO: 1)). Véase, la figura 1.

En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido solamente de dicho genoma sea un virus no replicativo, contiene genes funcionales *env*, *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* o *vpr*.

En una forma de realización preferida, el genoma de VIH del virión contienen los siguientes pares de genes en forma funcional: *env* y *gag*; *env* y *nef*; *env* y *tat*; *env* y *rev*; *env* y *vif*; *env* y *vpu*; *env* y *vpr*; *gag* y *nef*; *gag* y *tat*; *gag* y *rev*; *gag* y *vif*; *gag* y *vpu*; *gag* y *vpr*; *nef* y *tat*; *nef* y *rev*; *nef* y *vif*; *nef* y *vpu*; *nef* y *vpr*; *tat* y *rev*; *tat* y *vif*; *tat* y *vpu*; *tat* y *vpr*; *rev* y *vif*; *rev* y *vpu*; *rev* y *vpr*; *vif* y *vpu*; *vif* y *vpr*; *vpu* y *vpr*.

En otra forma de realización preferida, el genoma de VIH del virión contiene los siguientes grupos de genes en forma funcional: *env*, *gag* y *nef*; *env*, *gag* y *tat*; *env*, *gag* y *rev*; *env*, *gag* y *vif*; *env*, *gag* y *vpu*; *env*, *gag* y *vpr*; *env*, *nef* y *tat*; *env*, *nef* y *rev*; *env*, *nef* y *vif*; *env*, *nef* y *vpu*;

env, nef y vpr; env, tat y rev; env, tat y vif; env, tat y vpu; env, tat y vpr; env, rev y vif, env, rev y vpu; env, rev y vpr; env, vif y vpu; env, vif y vpr; env, vpu y vpr; gag, nef y tat; gag, nef y rev; gag, nef y vif; gag, nef y vpu; gag, nef y vpr; gag, tat y rev; gag, tat y vif; gag, tat y vpu; gag, tat y vpr; gag, rev y vif; gag, rev y vpu; gag, rev y vpr; gag, vif y vpu; gag, vif y vpr; gag, vpu y vpr; nef, tat y rev; nef, tat y vif; nef, tat y vpu; nef, tat y vpr; nef, rev y vif; nef, rev y vpu; nef, rev y vpr; nef, vif y vpu; nef, vif y vpr; nef, vpu y vpr; tat, rev y vif; tat, rev y vpu; tat, rev y vpr; tat, vif y vpu; tat, vif y vpr; tat, vpu y vpr; rev, vif y vpu; rev, vif y vpr; rev, vpu y vpr; vif, vpu y vpr.

En otra forma de realización preferida, el genoma de VIH del virión contiene los siguientes grupos de genes en forma funcional: env, gag, nef y tat; env, gag, nef y rev; env, gag, nef y vif; env, gag, nef y vpu; env, gag, nef y vpr; env, gag, tat y rev; env, gag, tat y vif, env, gag, tat y vpu, env, gag, tat y vpr; env, gag, rev y vif; env, gag, rev y vpu; env, gag, tat y vpr; env, gag, vif y vpu; env, gag, vif y vpr; env, gag, vpu y vpr; env, nef, tat y rev; env, nef, tat y vif; env, nef, tat y vpu; env, nef, tat y vpr; env, nef, rev y vif; env, nef, rev y vpu; env, nef, rev y vpr; env, nef, vif y vpu; env, nef, vif y vpr; env, nef, vpu y vpr; env, tat, rev y vif; env, tat, rev y vpu; env, tat, rev y vpr; env, tat, vif y vpu; env, tat, vif y vpr; env, tat, vpu y vpr; env, rev, vif y vpu; env, rev, vif y vpr; env, rev, vpu y vpr; env, vif, vpu y vpr; gag, nef, tat y rev; gag, nef, tat y vif; gag, nef, tat y vpu; gag, nef, tat y vpr; gag, nef, rev y vif; gag, nef, rev y vpu; gag, nef, rev y vpr; gag, nef, vif y vpu; gag, nef, vif y vpr; gag, nef, vpu y vpr; gag, tat, rev y vif; gag, tat, rev y vpu; gag, tat, rev y vpr; gag, tat, vif y vpu; gag, tat, vif y vpr; gag, tat, vpu y vpr; gag, rev, vif y vpu; gag, rev, vif y vpr; gag, rev, vpu y vpr; gag, vif, vpu y vpr; nef, tat, rev y vif; nef, tat, rev y vpu; nef, tat, rev y vpr; nef, tat, vif y vpu; nef, tat, vif y vpr; nef, tat, vpu y vpr; nef, tat, vif y vpu; nef, tat, vif y vpr; nef, tat, vpu y vpr; nef, rev, vif y vpu; nef, rev, vif y vpr; nef, rev, vpu y vpr; nef, vif, vpu y vpr; tat, rev, vif y vpu; tat, rev, vif y vpr; tat, rev, vpu y vpr; tat, vif, vpu y vpr; rev, vif, vpu y vpr.

En una forma de realización preferida, el virión no replicativo según la invención comprende un genoma de VIH que tiene los siguientes elementos en la dirección 5' a 3':

- a) La LTR 5' (repeticiones terminales largas) o secuencias terminalmente redundantes que contienen varias secuencias consenso para factores de transcripción que regulan la expresión vírica;
- b) *gag*, el gen que codifica la proteína p55 de la cápside formada por 3 subunidades proteicas (MA, CA y NC);
- c) el gen *pol* mutado, que codifica las enzimas víricas necesarias para el proceso de replicación vírica: proteasa (PRO), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (INT) que

contiene una mutación que produce que el virus producido solamente de dicho genoma sea un virus no replicativo. El gen *pol* solapa en su extremo 5' con el elemento *gag* y;

- d) *vif*, el gen que codifica la proteína Vif asociada con la infectividad de los viriones extracelulares, y solapa en su extremo 5' con el gen *pol* y en su extremo 3' con *vpr*;
- 5 e) *vpr*, el gen que codifica la proteína Vpr que actúa como un acelerador del ciclo de replicación a diferentes niveles, y solapa en su extremo 5' con el gen *vif*;
- f) *tat*, el gen que codifica la proteína Tat que es un transactivador, y su segundo exón está contenido en la secuencia *env*;
- g) *vpu*, el gen que codifica la proteína Vpu implicada en la liberación de viriones;
- 10 h) *env*, el gen que codifica la proteína gp160 de la envuelta vírica;
- i) *rev*, el gen que codifica la proteína Rev, responsable para el procesamiento y transporte del ARN mensajero al citoplasma, y su segundo exón está contenido en la secuencia *env*;
- j) *nef*, el gen que codifica la proteína Nef que regula negativamente moléculas CD4 y HLA de la célula infectada y desempeña un papel en la patogenicidad del virus y
- 15 k) la LTR 3'.

En una forma de realización particular, la mutación en el gen *pol* comprende la delección completa o parcial de dicho gen.

- 20 En una forma de realización preferida, la mutación en el gen *pol* da lugar a una proteína RT no funcional.

- En una forma de realización preferida, la mutación en el gen *pol* es una delección completa o parcial de la secuencia que codifica la proteína RT y dicha mutación no comprende una
- 25 delección de la secuencia que codifica la proteína integrasa o una delección de la secuencia que codifica la proteína proteasa.

- En una forma de realización preferida, la delección completa o parcial de la secuencia que codifica la proteína RT es la delección en dicha secuencia que codifica la proteína RT en la
- 30 construcción pNL4-3 Δ RT depositada con el número de acceso DSM 25917.

En otra forma de realización, la mutación en el gen *pol* es una delección completa o parcial de la secuencia que codifica la proteína RT y la proteína integrasa.

En una forma de realización preferida, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *env*, en donde dicha mutación causa que el virus producido de dicho genoma carezca de una proteína gp160 funcional.

- 5 En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión que comprende una mutación en el gen *env*, en donde dicha mutación causa que el virus producido de dicho genoma carezca de una proteína gp160 funcional, contiene genes funcionales *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* o *vpr*.
- 10 En una forma de realización particular, la mutación en el gen *env* comprende la delección completa o parcial de dicho gen. En una forma de realización particular, la secuencia de la proteína gp160 Env es SEQ ID NO: 3.

- 15 En una forma de realización particular, la delección completa o parcial en el gen *env* corresponde a la delección en el gen *env* en la construcción pNL4-3 Δ RT/ Δ 1136*env* depositada con el número de acceso DSM25923.

- 20 En otra forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*, en donde dicha mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende una mutación en un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*, en donde dicha mutación comprende
- 25 la delección completa o parcial de dicho gen. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende una mutación en solo un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*, en donde dicha mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una
- 30 mutación en el gen *gag*. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *nef*. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *tat*. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *rev*. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *vif*. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *vpu*. En una forma de realización particular, el
- 35

genoma de VIH del virión comprende además una mutación en el gen *vpr*. En una forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una mutación en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*. En una forma de realización preferida, la mutación es un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag* y *nef*.

5 En otra forma de realización preferida, la mutación es en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*. En otra forma de realización preferida, la mutación es en al menos dos genes, preferiblemente en el gen *gag* y en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*. En otra forma de realización particular, la secuencia de la proteína p55 Gag es SEQ ID NO: 4. En otra forma de realización, la secuencia de la proteína Nef es SEQ ID NO: 5. En otra
10 forma de realización particular, la secuencia de la proteína Rev es SEQ ID NO: 7. En otra forma de realización particular, la secuencia de la proteína Vif es SEQ ID NO: 8. En otra forma de realización particular, la secuencia de la proteína Vpu es SEQ ID NO: 9. En otra forma de realización particular, la secuencia de la proteína Vpr es SEQ ID NO: 10.

15 En otra forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además un gen marcador, en donde dicho gen marcador se localiza en el sitio ocupado por la región delecionada mediante la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*.

20 En otra forma de realización particular, el genoma de VIH del virión comprende además una secuencia homóloga a la de la región delecionada mediante la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*, que se origina de un segundo
25 genoma de VIH, en donde el genoma de dicho segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada.

En una forma de realización preferida, la secuencia homóloga es diferente a la secuencia de la región delecionada, preferiblemente tiene el 99%, 98%, 97%, 96%, 95%, 94%, 93%, 92%, 91%,
30 90%, 80%, 70%, 60%, 50% de identidad o menos con la secuencia delecionada.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias indica la proporción de aminoácidos idénticos que comparten las dos secuencias que se comparan. El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se calcula comparando dos secuencias alineadas en una región
35 particular, determinando el número de posiciones en donde hay aminoácidos idénticos en ambas secuencias para obtener el número total de posiciones en el segmento que se compara

y multiplicando el resultado por 100. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos implementados en un ordenador y métodos que se conocen ampliamente en la técnica. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP. Véase, Altschul S, *et al.*, "BLAST Manual" (NCBI NLM NIH, Bethesda, MD, EE UU, 1996) y Altschul S, *et al.*, J. Mol. Biol. 1990; 215:403-410. En otra forma de realización preferida, dicho segundo VIH se origina de un sujeto infectado por VIH. En una forma de realización particular, el sujeto infectado por VIH es un sujeto para el que se va a obtener una vacuna contra VIH personalizada.

Las secuencias homólogas procedentes del genoma del VIH de un sujeto pueden obtenerse mediante distintos métodos conocidos en el estado de la técnica, entre otros, a partir de células sanguíneas del paciente infectado con VIH mediante el kit de ADN de sangre QIAmp (Qiagen NV, Venlo, NL) y, a partir del plasma de un paciente infectado con VIH, puede obtenerse el ARN viral mediante el kit QIAmp (Qiagen NV, Venlo, NL). Dicho ARN de VIH extraído se emplea como molde para obtener el ADNc, empleando métodos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención se refiere a un genoma vírico de VIH que contiene una primera mutación en el en el gen *pol*, en donde dicha primera mutación causa que el virus producido solamente de dicho genoma vírico sea un virus no replicativo; en donde dicho genoma contiene además una segunda mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en el gen *pol*, en donde dicha segunda mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen.

Todas las formas de realización divulgadas para el virión no replicativo de la invención también son aplicables al genoma vírico de VIH de la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un vector que comprende un genoma vírico de VIH de la invención.

c) *Células activadas de la invención*

Los viriones no replicativos de la invención se pueden usar para activar células inmunes. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para obtener una célula inmune activada que comprende las etapas:

- a) poner en contacto una célula inmune con un virión no replicativo de la invención,
- b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para la infección de dichas células inmunes por el virión y para que se procesen los antígenos procedentes del virión no replicativo, y
- 5 c) opcionalmente, recuperar las células inmunes activadas.

Las condiciones adecuadas para la infección de las células inmunes con el virión de la invención y el procesamiento de antígenos son conocidas en la técnica. A modo ilustrativo, puede llevarse a cabo por ejemplo manteniendo en contacto 5×10^6 células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM) inmaduras con 1×10^9 viriones durante 3 horas a 37°C .

La recuperación de las células inmunes activadas de la invención, puede llevarse a cabo mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la recuperación de dichas células puede realizarse mediante desprendimiento de las células adheridas en la placa de cultivo usando tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%, respectivamente) y posterior centrifugación a 650 g durante 4 minutos a temperatura ambiente.

En una forma de realización, la célula inmune se selecciona de un linfocito, una célula mononuclear de sangre periférica y una célula dendrítica derivada de monocitos.

En otro aspecto, la invención se refiere a la célula obtenible según el método de la invención para activar células inmunes.

d) *Composiciones inmunes y de vacuna de la invención*

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de una vacuna frente a VIH personalizada para un sujeto infectado con VIH, en donde dicha vacuna comprende células inmunes activadas, que comprende:

- a) poner en contacto células inmunes que se originan de dicho sujeto infectado por VIH *in vitro* con un virión no replicativo como en las reivindicaciones 12 a 15 como se presenta en donde el genoma de dicho segundo VIH se origina de un VIH de dicho sujeto infectado por VIH;
- b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para infectar dichas células inmunes con el virión y para procesar los antígenos que se originan del virión no replicativo; y

c) recuperar las células inmunes activadas según la etapa previa.

En una forma de realización particular, el método *in vitro* comprende además, entre las etapas b) y c), las siguientes etapas:

5

(i) detectar y cuantificar la activación de las células inmunes activadas según las etapas a) y b);

(ii) comparar la activación de dichas células inmunes activadas según las etapas a) y b) con la activación de células inmunes control;

10

(iii) seleccionar los virios que producen una mayor activación de las células inmunes activadas según las etapas a) y b) que la activación de las células inmunes control;

(iv) infectar células inmunes de dicho sujeto infectado por VIH con los viriones no replicativos seleccionados en la etapa (iii).

15

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para obtener una vacuna contra VIH personalizada para un sujeto infectado con VIH, en donde dicha vacuna comprende células inmunes activadas, que comprende:

20

a) poner en contacto *in vitro* células inmunes con un virión no replicativo de la invención, en donde el genoma de VIH de virión comprende además una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, en donde dicha mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen; y en donde el genoma del VIH comprende además una secuencia homóloga a la de la región delecionada mediante la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, originario de un segundo genoma de VIH, en donde el genoma de dicho segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada y en el que el genoma de dicho segundo VIH se origina de un VIH de dicho sujeto infectado con un VIH;

25

30

b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para la infección de dichas células con el virión y para que se procesen los antígenos provenientes del virión no replicativo;

35

c) detectar y cuantificar la activación de las células inmunes activadas según las etapas a) y b);

- d) comparar la activación de dichas células inmunes activadas según las etapas a) y b) con la activación de células inmunes control,
- e) seleccionar los viriones que provocan una activación de las células inmunes activadas según las etapas a) y b) mayor que la activación de las células inmunes control,
- 5 f) infectar células inmunes de dicho sujeto infectado con VIH con los viriones no replicativos seleccionados en la etapa e), y
- g) recuperar las células inmunes activadas según la etapa f).

Los diferentes pasos comprendidos en el método *in vitro* para obtener una vacuna contra VIH personalizada para un sujeto infectado con VIH se conocen en la técnica. El método comprende primero poner en contacto células inmunes *in vitro* con un virión no replicativo de la invención. En una forma de realización particular, dichas células inmunes son linfocitos, células mononucleares de sangre periférica o células dendríticas derivadas de monocitos. Las células inmunes y los viriones no replicativos de la invención se deben mantener en condiciones adecuadas de modo que dichas células sean infectadas por el virión y de modo que los antígenos originarios del virión no replicativo de la invención se procesen. En una forma de realización particular, dichas condiciones son 37°C durante 7 días.

Es necesario después comparar la activación de dichas células inmunes con la activación de células inmunes control. Se conocen diferentes métodos en el estado de la técnica para analizar la activación de células inmunes. Ejemplos ilustrativos, no limitantes son, entre otros, la detección de la producción de citoquinas, la detección del número de células productoras de IFN γ e IL-2, o el análisis de la frecuencia de células CD4 y CD8 específicas de antígeno que se dividen mediante análisis de citometría de flujo. Seguidamente, se seleccionan los viriones que provocan una activación de las células inmunes activadas mayor que la activación de las células inmunes control, y se emplean dichos viriones no replicativos para infectar células inmunes de dicho sujeto infectado con un VIH. Por último, el método comprende recuperar dichas células inmunes activadas.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para la obtención de una vacuna frente a VIH personalizada para un sujeto infectado con VIH, en donde dicha vacuna comprende células inmunes activadas, que comprende:

- a) poner en contacto *in vitro* células inmunes procedentes de dicho sujeto infectado con VIH con un virión no replicativo de la invención, en donde el genoma de VIH comprendido en dicho virión comprende además una mutación en al menos un gen

seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, en donde dicha mutación comprende la delección completa o parcial de dicho gen; y en donde el genoma del VIH del virión comprende además una secuencia homóloga a la de la región delecionada por medio de la mutación en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, originario de un segundo genoma de VIH, en donde el genoma de dicho segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada y en el que el genoma de dicho segundo VIH se origina de un VIH de dicho sujeto infectado con un VIH;

- b) mantener la mezcla obtenida en la etapa a) en condiciones adecuadas para la infección de dichas células por el virión y para que se procesen los antígenos provenientes del virión no replicativo; y
- c) recuperar las células inmunes activadas según la etapa b).

En una forma de realización particular, la célula inmune se selecciona de un linfocito, una célula mononuclear de sangre periférica o una célula dendrítica derivada de monocitos.

En otra forma de realización particular, los métodos para obtener una vacuna frente a VIH personalizada comprenden, además, la etapa de someter las células inmunes activadas a un tratamiento para garantizar la seguridad de dichas células inmunes activadas.

“Tratamiento para garantizar la seguridad” se refiere a esos tratamientos que impiden que los viriones de la invención empleados en la generación de una vacuna frente a VIH personalizada, a pesar de ser no replicativos, puedan inducir el desarrollo de SIDA en el sujeto vacunado. Para ello, pueden emplearse diversos métodos conocidos en la técnica, entre ellos tratamiento con inhibidores de la proteína RT, proteasa o integrasa de VIH, o la inactivación de los viriones con AT-2 o calor.

Los inhibidores de la proteína RT adecuados para su uso en la presente invención son, entre otros zidovudina (AZT), Retrovir®, didanosina (ddI), Videx®, zalcitabina (ddC), Hivid®, estavudina (d4T), Zerit®, lamivudina (3TC), EpiVir®, abacavir (ABC), Ziagen®, emtricitabina (FTC), Emtriva®, tenofovir DF (TDF), Viread®, nevirapina (NVP), Viramune®, delavirdina (DLV), Rescriptor®, efavirenz (EFV), Sustiva®, Etravirina (ETV), Intelence® e inhibidores de la integrasa de VIH adecuados como el Raltegravir-(RTG) Isentress®. La inactivación por calor de los viriones de la invención puede llevarse a cabo a 56°C durante 60 min. La inactivación con

AT-2 (aldritol-2) puede llevarse a cabo mediante la incubación de los viriones con AT-2 a una concentración de 1 mM durante toda la noche a 4°C. La inactivación con inhibidores de la proteasa se realiza tratando células 293T productoras de virus, en el momento del cambio de medio después de la transfección con fármacos como saquinavir (SQV), Invirase®, indinavir (IDV), Crixivan®, ritonavir (RTV), Norvir®, nelfinavir (NFV), Viracept®, fosamprenavir (FOSAPV), Telzir®, lopinavir/r (LPV/r)-Kaletra®, atazanavir (ATV), Reyataz®, tipranavir (TPV), Aptivus®, darunavir (DRV), Prezista® a concentraciones capaces de inhibir el 90% de la maduración vírica.

En otro aspecto, la invención se refiere a las células inmunes activadas obtenidas según los métodos de la invención.

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención o un vector de la invención junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención se refiere a un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención, un vector de la invención o una composición inmunogénica o vacuna de la invención para su uso en medicina. De forma alternativa, la invención se refiere al uso de un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención, un vector de la invención o una composición inmunogénica o vacuna de la invención en medicina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención, un vector de la invención o una composición inmunogénica o vacuna de la invención para su uso en la prevención o tratamiento de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH. De forma alternativa, la invención se refiere al uso de un virión no replicativo de la invención, una célula de la invención, un genoma vírico de VIH de la invención, un vector de la invención o una composición inmunogénica o vacuna de la invención para la fabricación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH. De forma alternativa, la invención se refiere a un método para la prevención o tratamiento en un sujeto de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH que comprende la administración a dicho sujeto de un virión no replicativo,

una célula, un genoma vírico de VIH de la invención, un vector de la invención o una composición inmunogénica o vacuna de la invención.

La cantidad de viriones de la invención y de células inmunes activadas de la invención, así como el tiempo de administración se pueden determinar según protocolos conocidos en la técnica. De hecho, la administración de cantidades terapéuticamente eficaces de viriones de la invención y de células inmunes activadas de la invención se pueda alcanzar mediante una única administración, tal como por ejemplo, una única inyección de un número suficiente de viriones o células para proporcionar un beneficio terapéutico al paciente que se somete a tal tratamiento. De forma alternativa, en algunas circunstancias, puede ser deseable proporcionar administraciones múltiples o sucesivas, bien durante un periodo de tiempo relativamente corto o relativamente prolongado, que puede determinar el médico que supervisa la administración de tales composiciones. De hecho, en ciertas formas de realización, puede ser deseable administrar dos o más composiciones de diferentes viriones o células de la invención, bien solas o en combinación con uno o más fármacos para alcanzar los efectos deseados de la pauta terapéutica particular.

Las vacunas de la invención se administrarán en una cantidad farmacológicamente eficaz que produce una mejora de uno o más síntomas de un trastorno vírico o previene el avance de una enfermedad vírica o produce la regresión de la enfermedad o disminuye la transmisión vírica. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz preferiblemente se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que disminuye el índice de transmisión, disminuye la carga vírica de VIH o disminuye el número de células infectadas, en al menos el 5%, preferiblemente al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más. Una cantidad terapéuticamente eficaz, con referencia a VIH, también se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que aumenta el recuento de células CD4+, aumenta el tiempo de evolución a SIDA o aumenta el tiempo de supervivencia en al menos el 5 %, preferiblemente al menos el 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más.

La administración de los viriones de la invención o de las células inmunes de la invención puede realizarse junto a un vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable. En algunas ocasiones dicho vehículo o soporte farmacéuticamente aceptable es un adyuvante; una sal de aluminio o una emulsión de aceite en agua; un agente emulsionante y un aceite metabolizable; o un agente inmunoestimulador, y la composición se administra al sujeto mediante inyección.

Dichas vacunas pueden comprender además al menos un adyuvante que aumenta o media una respuesta inmune elegida de una respuesta inmune innata o una respuesta inmune adaptativa. Los adyuvantes que se pueden usar pueden aumentar la respuesta inmune activando las células presentadoras de antígeno (CPA), macrófagos o estimulando conjuntos
5 específicos de linfocitos.

Un adyuvante que puede ser adecuado para la presente invención puede ser cualquier ligando adecuado para la activación de un receptor de reconocimiento de patógeno (PRR) expresado en y sobre células dendríticas (CD), células T, células B u otras células presentadoras de
10 antígeno. Los ligandos que activan la vía del receptor del dominio de oligomerización de unión a nucleótidos (NOD) pueden ser adecuados para los fines de la invención. Los adyuvantes adecuados para estos ligandos pueden ser derivados de muramil dipéptido. Los ligandos que activan los receptores de tipo toll (TLR) también pueden ser adecuados para los fines de la invención. Esos receptores son miembros de la familia de PRR y se expresan ampliamente en
15 una variedad de células inmunes innatas, incluyendo CD, macrófagos, células cebadas y neutrófilos.

Como ejemplo de ligandos que activan TLR, se pueden mencionar los siguientes: para TLR4, monofosforil lípido A, monofosforil lípido A 3-O-desacetilado, LPS de *E. coli*, taxol, proteína de
20 fusión de RSV y proteínas huéspedes de choque térmico 60 y 70, para TLR2, lipopéptidos tales como N-palmitoil-S-2,3(bispalmitoiloxi)-propil-cisteinil-seril-(lisil)3-lisina, peptidoglicano de *S. aureus*, lipoproteínas de *M. tuberculosis*, zimosano de *S. cerevisiae* y LPS de *P. gingivalis* muy purificado; para TLR3, ARNbc, TLR5 de flagelina y TLR7 de compuestos sintéticos tales como imidazoquinolinas; o para TLR9, ciertos tipos de ADN rico en CpG. Otros adyuvantes útiles
25 para la invención pueden ser epítomos T cooperadores.

Un epítomo T cooperador es un péptido normalmente derivado de proteínas exógenas que han sufrido degradación proteolítica y procesamiento en la vía endocítica de las células presentadoras de antígeno (CPA). En esas células el antígeno leucocitario humano de clase II
30 (HLA II) se asocia con esos péptidos en los endosomas. Cuando se transporta a la superficie de las CPA, este antígeno puede interactuar con un receptor de células T específico de linfocitos T CD4 lo que produce su activación. Según el epítomo cooperador, la respuesta de la célula T puede ser de tipo Th1 o Th2, como se sabe en la técnica.

Un ejemplo de un epítomo de respuesta Th-orientada es el epítomo cooperador de célula T pan DR (PADRE). Este epítomo se manipula para que se una a las moléculas HLA-DR más
35

comunes con alta afinidad y para que actúe como un poderoso inmunógeno. Se ha mostrado que el epítipo PADRE HTL aumenta la potencia de vacunas diseñadas para estimular una respuesta inmune celular. Véase, Alexander J, *et al.*, Immunol. Res. 1998; 18:79-92.

- 5 La formulación de vacunas según la invención emplea una cantidad eficaz del antígeno de interés. Es decir, incluirá una cantidad de antígeno que, en combinación con el adyuvante, hará que el sujeto produzca una respuesta inmune específica y suficiente, de modo que ofrezca protección al sujeto contra una exposición posterior al VIH. Cuando se usa como una composición inmunogénica, la formulación contendrá una cantidad de antígeno que, en
10 combinación con el adyuvante, causará que el sujeto produzca anticuerpos específicos que se pueden usar para fines diagnósticos o terapéuticos.

Las composiciones de vacuna de la invención pueden ser útiles para la prevención la infección por VIH o para terapia de infección de VIH. Mientras que todos los animales que pueden estar
15 afectados con VIH o sus equivalentes se pueden tratar de esta manera, las vacunas de la invención se dirigen particularmente a sus usos preventivos y terapéuticos en seres humanos. Con frecuencia, se puede requerir más de una administración para producir el efecto profiláctico o terapéutico deseado; el protocolo exacto (dosis y frecuencia) se puede establecer mediante procedimientos clínicos estándar.

20 Las formulaciones de vacuna contendrán una cantidad eficaz del/de los antígeno(s) seleccionado(s) que cuando se combina(n) con el adyuvante causarán que el sujeto vacunado produzca una respuesta inmune suficiente y específica al antígeno. Las composiciones de vacuna también se pueden usar terapéuticamente para el tratamiento de sujetos ya infectados
25 con VIH.

En algunas formas de realización, puede ser deseable administrar vacunas de combinación que tienen un componente que provoca una respuesta inmune principalmente contra cepas de VIH con tropismo por el receptor CCR5 y un segundo componente que provoca una respuesta
30 inmune principalmente contra cepas de VIH con tropismo por el receptor CXCR4. También puede ser deseable para uno o ambos componentes estar compuesto de una mezcla de antígenos, como por ejemplo, una mezcla de antígenos cada uno de los cuales provoque una respuesta inmune a una cepa de VIH particular o grupo de cepas de VIH.

- 35 e) *Composiciones, kits y métodos para obtener los viriones de la invención*

La invención también se refiere a composiciones o kits que contienen los componentes necesarios para generar los viriones VSV-VIH pseudotipados de la invención y a métodos para obtenerlos cotransfectando los polinucleótidos que codifican el genoma vírico de VIH de la invención y la proteína G de VSV en una célula adecuada.

5

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición o kit que comprende:

- (i) un polinucleótido que comprende un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo; y
- (ii) un polinucleótido que codifica la glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV).

10

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la generación de un pseudovirión VIH/VSV recombinante que comprende:

15

- (i) cotransfectar una célula receptiva con:
 - a) un polinucleótido que codifica la glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV) y
 - b) un polinucleótido que comprende un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo, en donde el genoma de VIH comprende además una
- deleción en al menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*, y en donde el genoma del VIH comprende además una
- secuencia homóloga a la de la región delecionada mediante la mutación en al
- menos un gen seleccionado del grupo que consiste en los genes *gag*, *nef*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpu* y *vpr* o en la secuencia que codifica la proteína proteasa en gen *pol*,
- originario de un segundo genoma de VIH, en donde el genoma de dicho
- segundo VIH es diferente del genoma de VIH que contiene la región delecionada,
- (ii) mantener las células obtenidas en (i) en condiciones adecuadas para la formación de
- VIH, y
- (iii) recuperar los pseudoviriones de VIH/VSV de la célula.

20

25

30

35

Para la producción de los pseudoviriones de la invención, es necesario, en primer lugar incorporar en una célula receptiva tanto: i) un vector que comprende un genoma de VIH que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación causa que el virus producido solamente de dicho genoma sea un virus no replicativo; y ii) un plásmido de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína G de VSV en una célula usando cualquiera de los métodos de cotransfección conocidos en la técnica. Véase, Ausubel, F, *et al.*, Eds, "Current Protocols in Molecular Biology" (John Wiley and Sons Inc.; Nueva York, NY, EE UU, 2003). Ejemplos ilustrativos, no limitantes de métodos de transfección incluyen coprecipitación con fosfato cálcico, DEAE-dextrano, polibreno, electroporación, microinyección, fusión mediada por liposomas, lipofección, infección por retrovirus y transfección biolística. En una forma de realización particular, la transfección se lleva a cabo mediante coprecipitación con fosfato cálcico. La célula en la que se incorporan los vectores de la invención debe ser capaz de expresar la información codificada en dichos vectores y empaquetar las proteínas del virus y su material genético para formar las partículas víricas que tienen la proteína G de VSV en su envuelta. Células receptivas adecuadas para la realización de la presente invención incluyen, entre otras, células de la línea celular 293T, una línea celular derivada de la línea celular 293 (derivada de células de riñón embrionario humano), altamente transfectable, a la que se le ha insertado el antígeno T de SV40 (por ejemplo, ATCC). Los pseudoviriones producidos se liberan al medio de cultivo de las células transfectadas con los vectores de la invención. Por tanto, para obtener los viriones de la invención es necesario recoger los sobrenadantes transcurridas unas horas tras la transfección, preferiblemente 24 y 48 horas tras la transfección. Los viriones no replicativos de la invención se pueden almacenar a -80°C.

Todas las formas de realización divulgadas para el genoma vírico de VIH de la invención también son aplicables a las composiciones o kits de la invención y a los métodos de la invención.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan al mismo en su totalidad mediante referencia.

Mientras que la invención anterior se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y entendimiento, el experto en la materia apreciará a partir de una lectura de esta divulgación que se pueden hacer varios cambios en forma y detalle sin separarse del verdadero ámbito de la invención y reivindicaciones adjuntas.

Procedimientos generales y resultados

1. Producción de viriones (o pseudoviriones)

1.1 Generación de vectores víricos

Para generar el vector pNL4-3ΔRT se usó el genoma del VIH pNL4-3 (número de acceso de GeneBank M19921.1). Véase, SEQ ID NO: 1 y la figura 1A. Para ello, inicialmente, se insertaron, mediante mutagénesis dirigida, sitios de restricción que permitían “extraer” fácilmente determinados fragmentos de ADN del provirus matriz (tal como, por ejemplo, el gen que codifica la RT, los genes *pol*, *gag*, *nef* o *env*, etc.), para sustituirlos por los mismos genes procedentes de aislados de pacientes a valorar. Este sistema de “clonación” y generación de un “virus quimera” permite estudiar las características de las distintas proteínas víricas de los pacientes. Se realizaron, por tanto, las siguientes modificaciones principales:

- a) en primer lugar, la delección de fragmentos del VIH-1, por ejemplo, la delección de un fragmento que comprende el gen que codifica la transcriptasa inversa (RT), en concreto el fragmento comprendido entre la posición 2592 y 3485 del vector provírico pNL4-3; y
- b) a continuación, se insertó el gen *LacZ* (que codifica la enzima beta-galactosidasa) sustituyendo distintas secuencias del genoma vírico para, por una parte, reconocer la frecuencia de generación de virus recombinantes, y, por otra, evitar el arrastre de secuencias de virus salvajes.

Los clones víricos recombinantes basados en VIH de la presente invención se caracterizan en que poseen la estructura general representada en la figura 1, que comprende en dirección 5' a 3' los siguientes elementos:

- a) LTR (repeticiones terminales largas) o secuencias redundantes terminales que contienen varias secuencias consenso para factores de transcripción que regulan la expresión vírica;
- b) *gag*, el gen que codifica la proteína p55 de la cápside formada por 3 subunidades proteicas (MA, CA y NC);
- c) *pol*, el gen que codifica las enzimas víricas necesarias para el proceso de replicación vírica: proteasa (PRO), transcriptasa inversa (RT) e integrasa (INT), y solapa en su extremo 5' con el elemento *gag*;

- d) *vif*, el gen que codifica la proteína Vif asociada con la infectividad de los viriones extracelulares, y solapa en su extremo 5' con el gen *pol* y en su extremo 3' con *vpr*;
- e) *vpr*, el gen que codifica la proteína Vpr que actúa como acelerador del ciclo de replicación a distintos niveles, y solapa en su extremo 5' con el gen *vif*;
- 5 f) *tat*, el gen que codifica la proteína Tat que es un transactivador, y su segundo exón se encuentra contenido en la secuencia *env*;
- g) *vpu*, el gen que codifica la proteína Vpu implicada en la liberación de los viriones;
- h) *env*, el gen que codifica la proteína gp160 de la envuelta vírica;
- 10 i) *rev*, el gen que codifica la proteína Rev, encargada del procesamiento y transporte al citoplasma del ARN mensajero, y su segundo exón se encuentra contenido en la secuencia *env*; y
- j) *nef*, el gen que codifica la proteína Nef que regula negativamente moléculas CD4 y HLA de la célula infectada y desempeña un papel en la patogenicidad del virus.

15 El vector vírico pNL4-3 Δ RT[*lacZ*]/Ren descrito en el documento EP1752541 como IP HIV NL LacZ/RT Ren, se caracteriza por presentar la sustitución del fragmento de 896 pb del gen *pol* que codifica la RT entre NcoI/AgeI por el gen *LacZ*. A partir de esta construcción, se generó pNL4-3 Δ RT[*lacZ*] mediante la eliminación del gen marcador que codifica la proteína luciferasa de *Renilla* (*Ren*) (SEQ ID NO: 13) y restablecimiento de la secuencia del gen *nef* (90 pb), que

20 se había eliminado previamente, localizada entre los sitios de restricción NotI/XhoI (en las posiciones 8797 y 8887, respectivamente). Para llevar a cabo esto se amplificó previamente, la zona con los oligonucleótidos específicos del pNL4-3, 52EU: (SEQ ID NO: 11) y 104ED: (SEQ ID NO: 12), incluyéndose en estos oligonucleótidos los sitios de restricción NotI y XhoI. Una vez

25 amplificada la región de 90 pb del gen *nef* a partir de pNL4-3, se clonó en la posición NotI (8797)/XhoI (8887), de donde se había eliminado el gen *Ren*, generándose el plásmido pNL4-3 Δ RT[*lacZ*], de un tamaño de 14.483 pb.

El siguiente paso fue la eliminación de un sitio de restricción NarI localizado en el plásmido pNL4-3, fuera de la secuencia codificante del virus (es decir, pUC18). Se usó el plásmido

30 anteriormente generado (pNL4-3 Δ RT[*lacZ*]) y se digirió con las enzimas de restricción AatII y ApaI, obteniéndose un fragmento de 3613 pb (inserto), donde ya se había eliminado el sitio NarI. Este fragmento se clonó con las mismas enzimas de restricción correspondientes en pNL4-3 Δ RT[*lacZ*], convirtiéndose en el plásmido pNL4-3 Δ RT[*LacZ*], NarI⁻. El tamaño del plásmido generado es de aproximadamente 14.483 pb.

A continuación, se eliminó el gen *LacZ* que codifica la proteína β -galactosidasa (SEQ ID NO: 14) clonado en NcoI/Agel mediante la digestión con las correspondientes enzimas de restricción y posterior relleno de los extremos cohesivos con el fragmento Klenow de ADN polimerasa I (GE Healthcare) y se religaron, dando lugar al plásmido pNL4-3 Δ RT, Nari-
 5 llamado en adelante pNL4-3 Δ RT. El tamaño de este plásmido generado es de aproximadamente 13.983 pb. Véase, la figura 1B.

A partir de pNL4-3 Δ RT se generó el siguiente vector vírico de pNL4-3 Δ RT:

10 pNL4-3 Δ RT/ Δ 1136*env*: Para generar el vector NL4-3 Δ RT/ Δ 1136*env* se usó el vector NL4-3 Δ RT. Se realizó una doble digestión a 37°C usando las enzimas NcoI y NheI, que cortan en la posición 6113 y 7249 del plásmido, durante 2 horas. Esta doble digestión genera 2 fragmentos de 1136 y 11972 pb cada uno. La digestión se cargó en un gel de agarosa al 1% para separar e identificar ambos fragmentos. Un vez que se identificaron los fragmentos, se realizó una
 15 purificación del fragmento de 11972 mediante su extracción del gel. Posteriormente, se hizo una extensión del plásmido para su posterior ligación con la enzima de Klenow. La ligación de este fragmento se realizó añadiendo la enzima ligasa durante 12 horas a 16°C generando un nuevo plásmido de 11972 pb con una delección en la envuelta de 1136 pb. Posteriormente, el plásmido se secuenció y transfectó en células 293T para generar y caracterizar los viriones
 20 producidos.

1.2 Producción y concentración de viriones

Los viriones se generaron mediante transfección de células 293T (ATCC) con los diferentes
 25 vectores víricos en estudio, por el método del fosfato cálcico (Profection Kit; Promega Corp., Madison, WI, EE UU). Se usaron 5 μ g del ADN plasmídico de los distintos vectores víricos (Qiagen, NV, Venlo, NL). Se generaron vectores VIH_Env pseudotipados con G-VSV mediante cotransfección de células 293T con NL 4-3 Δ RT/ Δ 1136*env*, y un plásmido de expresión para la proteína G de VSV. El día anterior a la transfección, se sembraron $1,5 \times 10^6$ células en 10 ml de
 30 DMEM-10 (DMEM suplementado suero de bovino fetal al 10% (v/v)) en botellas de cultivo de 75 cm². A las 24 horas tras la transfección se cambió el medio y a las 48 horas se recogieron los sobrenadantes, se clarificaron y posteriormente se concentraron. Una vez obtenidos los viriones, éstos se almacenaron a -80°C. En todos los casos, se obtuvo un sobrenadante en las células tratadas del mismo modo pero transfectadas con el “vector vacío” que se utilizó como
 35 control negativo. El sobrenadante recogido tras la transfección se centrifugó en tubos de 30 ml de rosca durante 32 minutos a 28.000 rpm en una centrifuga Thermo scientific Sorvall® WX

Ultra Centrifuge Series 80 (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, EE UU). Se descartó el sobrenadante. El precipitado obtenido tras la centrifugación se resuspendió en 500 µl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que se transfirió a un tubo Eppendorf. Nuevamente se centrifugaron durante 10 minutos a 40.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 500 µl de PBS.

La detección del antígeno p24 mediante la técnica de ELISA/Ag VIH se utilizó para cuantificar el inmunógeno vírico (Innogenetics, NV, Gante, BE). La cuantificación se realizó siempre antes y después de su concentración.

2. Caracterización de los viriones

2.1 Evaluación de la replicación vírica en células MT-2

La evaluación de la replicación vírica se realizó mediante la utilización de viriones portadores de un gen marcador, en concreto, del gen *Ren* (renilla). La evaluación de la replicación vírica se analizó mediante un ensayo en células MT-2 (número de catálogo 237, NIHARRRP, Institutos Nacionales de Salud de EE UU, Bethesda, MD, EE UU). Los viriones se obtuvieron por transfección con los vectores víricos correspondientes pNL4-3 Ren WT o pNL4-3 Δ RT Ren, descritos en el documento EP1752541, en células 293T. A las 48 horas se recogió el sobrenadante y se cuantificó el antígeno p24 por ELISA de captura (Innogenetics, NV, Gante, BE). Parte de los viriones NL4-3 Ren WT fueron inactivados con calor a 56°C durante 60 minutos.

Para valorar la capacidad de replicación, se sembraron 5×10^4 células MT-2 por pocillo, en placas de 96 pocillos de fondo redondo, en un volumen final de 200 µl. Posteriormente, se infectaron con distintas diluciones de los lotes de virus (NL4-3 Ren WT, NL4-3 Ren WT inactivado por calor o NL4-3 Δ RT Ren) que habían sido previamente cuantificados mediante cuantificación del antígeno p24. El ensayo se realizó por triplicado. Las infecciones se mantuvieron a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%. A las 24 y 96 horas de la infección se determinó la actividad luciferasa con el sistema de ensayo de luciferasa de Renilla (Promega Promega Corp., Madison, WI, EE UU) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células se lisaron en 100 µl del tampón de lisis durante 5 minutos a 4°C. La actividad luciferasa de estos extractos celulares se valoró introduciendo 50 µl del lisado celular en un luminómetro de placa (Orion L®, Titertek-Berthold Inc., Huntsville, AL, EE UU) programado para inyectar 50 ml de sustrato. Este valor proporciona las unidades de luz relativas (ULR) por ml de lote de

virus a las 24 o 96 horas de infección en células MT-2. Véanse, la figura 2 y la tabla 1. Como se puede apreciar, tanto los viriones NL4-3 Ren WT inactivados por calor como los viriones NL4-3 Δ RT Ren carecían de capacidad replicativa.

5

Tabla 1

Cuantificación de la actividad luciferasa para analizar la infección/replicación vírica en células MT-2, 24 y 96 horas tras la transfección

	24 horas	96 horas
Control negativo	143 ULR	100 ULR
NL4-3 Ren WT	261841 ULR	5x10 ⁶ ULR
NL4-3 Ren WT inactivado por calor	129 ULR	400 ULR
NL4-3 Δ RT Ren	922 ULR	200 ULR

ULR: Unidades de luz relativas

10

2.2 Evaluación de la replicación de los viriones NL4-3 Δ RT en células TZM-bl

Se evaluó la replicación de los viriones NL3.4 Δ RT (DRT) y NL4-3 (WT) mediante la cuantificación de la actividad luciferasa en células TZM-bl.

15

Las células indicadoras TZM-bl expresan el receptor CD4 y los correceptores CCR5/CXCR4, con un sistema indicador integrado LTR-Luc. Tras la valoración del antígeno p24, se prepararon por triplicado diluciones 1:4 del sobrenadante de transfección donde se colocan los viriones en placas de 96 pocillos. Se añadieron 10.000 células TZM-bl y la placa se mantuvo en un incubador a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Tras 72 h, se analizó la actividad luciferasa presente en los extractos celulares en un luminómetro (Turner Biosystems, Sunnyvale, CA, EE UU). Los viriones NL4-3 Δ RT (DRT) carecían de capacidad replicativa. Véase, la figura 3.

20

2.3 Ensayo de microscopía confocal

25

A) Transfecciones en células 293T

30

Se contranfectaron células 293T con los plásmidos: pGAG-GFP (5 μ g), pNL4-3 WT (3 μ g) + pGAG-GFP (2 μ g), pNL4-3 Δ RT (3 μ g) + pGAG-GFP (2 μ g) y pNL4-3 Δ RT/ Δ 1136env (2 μ g) + pGAG-GFP (2 μ g) + pVSV-G (1 μ g). 48 tras la transfección, se recogió el sobrenadante y se usó para infectar posteriormente nuevas células susceptibles. Las células se fijaron con solución de lisis FACS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras lavar con PBT (PBS, Tween® 20 al 0,1%) las células se tiñeron con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (1/10000) y faloidina (1/1000) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se montaron

con medio de montaje (Vectashield®, Vector Labs., Inc., Burlingame, CA, EE UU). Véase, la figura 4A.

B) Infección

5

El virión se cuantificó mediante la valoración del antígeno p24 por ELISA (Innogenetics NV, Gante, BE). Las células PBMC (células mononucleares de sangre periférica) (25×10^6) se infectaron con la cantidad de viriones correspondientes a 2 µg de antígeno p24 de los siguientes viriones obtenidos por co-transfección en células 293T: NL4-3 + GAG-GFP, NL4-3
10 ΔRT + GAG-GFP y 1 ml de GAG-GFP.

Se incubaron células THP-1 con el colorante lisoseguidor durante 1 hora. Después de la incubación, las células se infectaron con viriones NL4-3 + GAG-GFP, NL4-3 ΔRT + GAG-GFP y NL4-3 ΔRT/Δ1136env + VSV + GAG-GFP.

15

Las células infectadas se incubaron entre 3-4 horas a 37°C. Posteriormente las células se recogieron, fijaron, tiñeron y prepararon para su visualización por microscopía confocal siguiendo el mismo proceso que para las células transfectadas. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal LEICA SP2 y se procesaron con ImageJ.

20

Tanto los viriones procedentes de la cotransfección NL4-3WT + GAG-GFP como NL4-3 ΔRT + GAG-GFP fueron capaces de infectar PBMC. Véase la figura 4B.

Los pseudoviriones originados de NL4-3 ΔRT/Δ1136env + VSV + GAG-GFP fueron capaces de
25 infectar células a través de la ruta lisosomal. Véase la figura 14.

2.4 Visualización de los viriones por medio de microscopía electrónica

Se transfectaron células 293T usando el kit de transfección de mamíferos (Promega Corp.,
30 Madison, WI, EE UU) con dos construcciones diferentes pNL4-3 (5 µg) y pNL4-3 ΔRT (5 µg). Se generaron pseudoviriones por cotransfección de pNL4-3 ΔRT/Δ1136env (3µg) y pVSV-G (2 µg). 48 horas tras la transfección, se retiró el sobrenadante y las células se limpiaron con PBS 1X. El PBS se retiró y la monocapa de células se mantuvo en 10 ml de glutaraldehído al 2,5% en PB (solución fosfato) durante 20 minutos a 4°C. Tras estos 20 minutos, las células se
35 pasaron a un falcon de 15 ml y se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. Véase, López-Iglesias C, *et al.*, Ultrastruct Mol Struct Res. 1988; 101 (1): 75-91. Los sobrenadantes se

clarificaron y posteriormente se concentraron por centrifugación, durante 32 minutos a 28.000 rpm en una centrífuga Thermo Scientific Sorvall® WX Ultra Centrifuge Series 80 (Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, EE UU). Se descartó el sobrenadante y el sedimento obtenido tras la centrifugación, se resuspendió en 500 µl de PBS. Nuevamente, se centrifugó durante 10 minutos a 40.000 rpm. El sedimento se resuspendió en 500 µl de glutaraldehído al 2,5% en PB. Una vez que el sedimento estaba bien resuspendido, se dejó durante 30 minutos a 4°C con el glutaraldehído y tras ese tiempo el glutaraldehído se cambió por otros 500 µl de glutaraldehído nuevo. Se dejó durante 1 hora a 4°C, se eliminó el glutaraldehído y se lavó con PB al 1% dos o tres veces y se dejó en PB hasta su utilización en microscopía electrónica. Las muestras se tiñeron y procesaron en parafina como se ha descrito previamente. Véase, López-Iglesias, 1998, anteriormente.

Las partículas víricas NL4-3 estaban perfectamente formadas (flechas) y con su centro bien definido y se observaban también partículas víricas en gemación. Véase la figura 5A. En cambio los viriones NL4-3 Δ RT eran inmaduros y no se podía observar el centro formado (flechas) ni la compactación típica de una partícula vírica WT. Véase la figura 5B.

Se puede observar que las partículas víricas NL4-3 estaban perfectamente formadas en un 90% de los casos. Véase la figura 5C. Se pueden observar partículas víricas purificadas obtenidas de la transfección de las células 293T transfectadas con las construcciones pNL4-3 Δ RT. Véase la figura 5D. El 93% de la población presenta una morfología de partícula vírica inmadura. También se observaron pseudoviriones de células 293T transfectadas con p Δ RT/ Δ 1136env + pVSV-G. Véase la figura 13. Después de la purificación, los pseudoviriones mostraron partículas inmaduras con una envuelta más espesa.

2.5 *Análisis de la expresión de la proteína gag de VIH-1 por inmunotransferencia*

Para analizar la expresión de la proteína gag del VIH-1 se utilizaron extractos de células 293T y de viriones purificados, obtenidos 48 horas tras la transfección en células 293T con los plásmidos indicados (pNL4-3, pNL4-3 Δ RT o p Δ RT/ Δ 1136env + pVSV-G). Para la preparación de extractos celulares se utilizaron aproximadamente 2×10^6 células 293T por punto experimental recogidas a las 48 horas de la transfección. Las células se lavaron en PBS y en tampón A (Hepes 10 mM pH 8, KCl 10 mM, MgCl₂ 15 mM y DTT 1 mM), se resuspendieron en 20 µl de tampón C (Hepes 20 mM pH 8, NP-40 al 0,1%, glicerol al 25%, NaCl 420 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 0,2 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,5 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM y DTT

(ditiotreitól) 1 mM), se dejaron lisar durante 15 minutos a 4°C y se centrifugaron a 4.062 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se diluyó en tampón D (Hepes 20 mM pH 8, glicerol al 20%, KCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, leupeptina 0,5 µg/ml, pepstatina 0,5 µg/ml, aprotinina 0,5 µg/ml, PMSF 1 mM y DTT 1 mM) en función de la concentración final de proteína deseada. La valoración de la concentración de proteínas, se determinó mediante la reacción de Bradford (Biorad Labs., Inc., Hercules, CA, EE UU). Véase, Bradford M, Anal Biochem 1976; 72:248-54.

Para realizar la inmunotransferencia se hicieron migrar 10 µg de los diferentes extractos en un gel de poliacrilamida-SDS (dodecilsulfato sódico) al 10%. La transferencia de los geles a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) (Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EE UU), previamente incubadas 5 minutos en metanol, se realizó en tampón de transferencia (glicina 20 mM, Tris-base 150 mM y metanol al 20%) utilizando un aparato de electrotransferencia (Pharmacia®, Pfizer, Inc., Nueva York, NY, EE UU). Las membranas se bloquearon por incubación a 37°C durante 1 hora con leche en polvo al 5% en PBS/Tween-20 al 0,1%. Tras el bloqueo, las membranas se incubaron con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la proteína p24 (clon 491, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, EE UU) a una dilución 1:1000. Después de tres lavados de 5 minutos con PBS/Tween-20 al 0,1%, se incubaron con anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón unidos a peroxidasa durante una hora a 37°C.

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS/Tween-20 al 0,1%. La detección de las interacciones antígeno-anticuerpo se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia SuperSignal WestPico Chemiluminescent Substrate (Pierce®, Thermo Fisher Scientific Corp., Waltham, MA, EE UU) y exposición a película fotográfica (Hyperfilm ECL, GE Healthcare, General Electric Co., Fairfield, CT, EE UU). Tanto los viriones NL4-3 como NL4-3 ΔRT (ΔRT) producían la proteína gag. Véase la figura 6. Los viriones NL4-3 procesaban gag completamente, mientras que los viriones NL4-3 ΔRT (ΔRT) y ΔRT/Δ1136env + VSV (VSV) tenían un defecto en el procesamiento de gag, Véase la figura 15.

3. Evaluación de la respuesta inmune celular

Una vez obtenidos y caracterizados los viriones NL4-3 ΔRT y ΔRT/Δ1136env + VSV (VSV), se evaluó la respuesta inmune celular de dos formas. En primer lugar, mediante un modelo *ex vivo* con células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM) se evaluó la capacidad de producir la respuesta celular anti-VIH específica en células CD4+ y CD8+. También se realizaron ensayos con PBMC para detectar la respuesta celular anti-VIH específica, entre ellos, la detección

intracelular de citoquinas (ICS) y la valoración del número de células productoras de IFN- γ y mediante ELISPOT.

3.1 *Generación ex vivo de células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM) pulsadas con inmunógeno*

Las CD-DM autólogas se obtuvieron a partir de los monocitos presentes en las PBMC obtenidas de una muestra anticoagulada. Las PBMC se lavaron tres veces en medio de cultivo sin suero, X-VIVO15, y se resuspendieron (5×10^6 /ml) en dicho medio de cultivo, suplementado con suero autólogo inactivado al 1% y se depositaron en viales de cultivo a 37°C y CO₂ al 1% durante 2 horas, tiempo durante el cual los monocitos se adhirieron a la superficie del vial. Las células no adheridas (linfocitos) se eliminaron por aspiración. Los monocitos adheridos se cultivaron durante 5 días en X-VIVO 15 suplementado con suero autólogo inactivado al 5% en presencia de GM-CSF e IL-4 humanas recombinantes a la dosis de 1000 UI/ml de cada citoquina y con o sin AZT 1 mM para probar si era mejor suprimir o no la posible replicación vírica, cuando se trate de pacientes sin tratamiento antirretroviral. Tras 5 días de cultivo, los monocitos se convirtieron en células dendríticas (CD) inmaduras y estuvieron listas para su pulsado con los distintos inmunógenos. Para el pulsado, se usaron como mínimo 5×10^6 CD-DM inmaduras, se lavaron 2 veces en medio y se resuspendieron en 1 ml de medio que contenía la alícuota de VIH-1 inactivado o inmunógeno (1×10^9 viriones) así como GM-CSF+ IL4 (1000 UI/ml de cada una), y se mantuvieron a 37°C durante 5 horas. A continuación, se añadió al cultivo un cóctel de citoquinas humanas recombinantes (TNF-alfa+IL-6+IL-1 β) inductoras de la maduración de las CD-DM, y el cultivo se prolongó durante unas 40 horas adicionales. Véase la figura 7. Se recogieron todas las CD-DM en cultivo (como mínimo 5×10^6), se centrifugaron y el sobrenadante se alicuoteó para realizar las últimas medidas posibles de citoquinas y de VIH-1 remanente. Las CD-DM se lavaron dos veces con medio de cultivo X-VIVO10.

Como controles en todos los experimentos, las CD-DM también se pulsaron con proteínas recombinantes de VIH (p24), como control positivo, p24 recombinante de VIH_1 (Protein Sciences Corp. Meriden, CT, EE UU). Igualmente se pulsaron con el superantígeno SEA como control positivo. Para los controles negativos se repitieron los mismo pasos, sólo que las CD-DM no se pulsaron con el inmunógeno.

3.2 *Medición y análisis de la respuesta inmune*

35

A) Marcaje con CFSE y análisis por citometría de flujo

Las PBMC se marcaron durante 20 minutos a 37°C con una solución de CFSE (éster succinimidílico de diacetato de 5-6-carboxifluoresceína) 1,5 mM. Tras 2 lavados, las PBMC marcadas se estimularon con proteínas recombinantes del VIH-1 y los controles relevantes durante 6 días en medio de cultivo suplementado con suero de ternera fetal (STF) al 10% en un incubador a 37°C y CO₂ al 5%. Posteriormente y tras los marcajes de superficie correspondientes, se evaluó la frecuencia de células CD4 y CD8 específicas de antígeno que se habían dividido para cada estímulo mediante análisis por citometría de flujo. Véase la figura 7.

Igualmente, se evaluó la dilución del marcador CSFE tras cocultivar durante 2 días CD-DM pulsadas con los distintos tipos de inmunógenos y células T autólogas recientes en una relación de CD: células T de 1:10. Se realizaron estudios *in vitro* pulsando células CD-DM con viriones NL4-3 ΔRT y analizando la respuesta inducida en las células T autólogas de pacientes de VIH-1. Los datos obtenidos indicaron que tras el cocultivo entre CD-DM pulsadas con NL4-3 ΔRT y linfocitos T autólogos se generaba, en determinados pacientes, un incremento de la proliferación celular y la producción de citoquinas (IL-2 e IFN-α) respecto a la obtenida con proteínas recombinantes o el propio virus autólogo inactivado por calor. Véase la figura 8.

B) Detección de la producción intracelular de citoquinas de linfocitos CD4/CD8 anti-VIH-1 específicos

Tras el cultivo de las PBMC de los pacientes durante 6 o 18 horas con grupos de péptidos del VIH-1, de viriones recombinantes y anticuerpos coestimuladores (CD28 y CD49d) en presencia de Brefeldina A (10 µg/ml), las células se fijaron y permeabilizaron. Posteriormente se añadieron los marcadores fenotípicos de los linfocitos CD4/CD8 y mediante tinción con anti-IFN-γ, anti-TNF-α y anti-IL-2, y marcadores de activación (CD38, CD69), se identificaron y cuantificaron los linfocitos T específicos de VIH-1 tras el posterior análisis por citometría de flujo.

Del mismo modo, se realizó la medida de células T CD4 y CD8 que expresaban CD69 y que producían IFN-γ mediante tinción intracelular y análisis citofluorimétrico, tras la reestimulación de los linfocitos T autólogos con CDDM durante 1-2 días.

C) Análisis de la respuesta de células T CD8+ específica mediante ELISPOT

El análisis de la respuesta específica de células T CD8+ se realizó mediante el uso de un ELISPOT específico basado en la determinación de la producción de IFN- γ por las células T CD8+ frente a epítomos dominantes de las proteínas del VIH-1 restringidos para antígenos HLA-clase I. Las células se estimularon con conjuntos de péptidos sintéticos solapantes 15-
5 meros de las proteínas gag, pol, env y nef del VIH-1, viriones recombinantes quiméricos.

También se realizaron ensayos con eliminación de subpoblaciones celulares (CD4, B, NK) mediante selección inmunomagnética para analizar su grado de participación en la respuesta obtenida.

3.3 *Tipado de HLA de alta resolución*

El tipado de HLA de alta resolución se evaluó mediante PCR-SBT del ADN genómico de células mononucleares o polinucleares de sangre periférica o células de líneas de células B. Empleando cebadores genéricos se amplificaron los exones polimórficos de los genes que codifican para el MHC (principalmente el exón 2 del gen DRB1). Los productos de PCR se secuenciaron usando el método de secuenciación automática fluorescente y las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software adecuado (Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA, EE UU).

3.4 *Optimización del ensayo ex vivo para la detección y caracterización de la respuesta inmune frente al VIH-1 utilizando viriones recombinantes defectuosos y no replicativos*

Se emplearon muestras de aproximadamente 20-30 pacientes VIH+ crónicos asintomáticos, con una cifra elevada de CD4 ($>500/\text{mm}^3$). Se ha utilizado fundamentalmente un ensayo de detección intracelular de citoquinas (ICS) con distintas preestimulaciones de las PBMC. Las preestimulaciones probadas fueron: dosis bajas de IL-2 recombinante (20 U/ml) o un cóctel con CD28 y CD49d (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). No se han hallado diferencias entre estos 2 tipos de preestimulaciones, aunque el uso del cóctel de anticuerpos producía mayor reproducibilidad en la secreción de IFN γ e IL-2, por células CD4 y CD8. Los antígenos inmunogénicos ensayados fueron NL4-3 WT inactivado por calor, NL4-3 ΔRT , y BAL y MN (cepas de referencia de aislados de laboratorio, en ocasiones denominadas VIH-BaL y VIH-MN, respectivamente) inactivados por calor o mediante tratamiento con AT2 (aldritiol-2) 1 mM a 4°C durante toda la
35 noche (dosis correspondiente a 20 μg de p24/ml). Tras una estimulación de las células durante 18 a 24 horas con los estímulos mencionados, los resultados obtenidos fueron heterogéneos,

observándose una respuesta marcada en un 20-30% de los pacientes ($n \geq 6$), siendo la respuesta inducida por los viriones NL4-3 Δ RT muy similar a la obtenida por los viriones enteros inactivados por calor. Véase la figura 9.

5 3.5 Comparación de los resultados obtenidos utilizando el modelo *ex vivo* establecido con PBMC con el modelo de cocultivo con CD-DM

La mayoría de los ensayos *ex vivo* con PBMC (ICS) se realizaron en paralelo utilizando tanto CD-DM como linfocitos T de los mismos pacientes infectados por el VIH. Los resultados
10 preliminares mostraron un paralelismo prácticamente total entre ambos ensayos, pudiéndose discriminar perfectamente los pacientes considerados como respondedores a los viriones NL4-3 Δ RT y otros viriones de referencia inactivados por calor, de los pacientes no respondedores. Se valoró la producción de citoquinas (IFN γ , IL-2) y la inducción de proliferación en células CD4 y CD8. Véase la figura 10. Existe una agrupación paralela de los pacientes en función de su
15 respuesta a los diferentes inmunógenos entre ambos ensayos. Estos datos sugieren que el ensayo *ex vivo* con PBMC optimizado para la detección de la respuesta inmune anti-VIH podría permitir una valoración rápida *in vitro* de la actividad inmunógena de posibles futuros candidatos respondedores a vacunas terapéuticas basadas en CD-DM, dado que los resultados pueden analizarse a las 48-72 horas, mientras que los resultados tras los cocultivos
20 con CD-DM precisan de la generación previa de CD-DM durante 7 días y la necesidad de que el paciente tenga que someterse a dos donaciones de sangre.

3.6 Ensayos con PBMC para detectar respuesta celular anti-VIH específica medida por el número de células productoras de IFN- γ (ELISPOT)

25 Se realizaron diversos ensayos para detectar la respuesta celular anti-VIH específica, tales como evaluar la inmunogenicidad de Δ RT frente al virión WT-AT2 (pNL4-3), evaluar el efecto de la inactivación por AT2 (aldritiol-2) (WT-AT2 frente a Δ RT-AT2), evaluar la eficacia del tropismo de la envuelta X4 (Δ RT) frente a R5 (BaL y AC10) y evaluar la eficacia de una
30 envuelta alternativa usando viriones pseudotipados VSV-G (VSV- Δ RT).

Tras evaluar la inmunogenicidad del virión Δ RT frente al WT-AT2 (NL4-3) se observó que el Δ RT producía respuesta mayor, medida por el número de células productoras de IFN- γ (ELISPOT), en un mayor número de pacientes de la cohorte analizada de pacientes positivos
35 para VIH-1 asintomáticos. Tras evaluar el efecto de la inactivación por AT2 (WT-AT2 frente a Δ RT-AT2) se observó que este procedimiento de inactivación no influía en la inmunogenicidad

de la partícula vírica. Tras evaluar la eficacia con respecto al tropismo de envueltas X4 (NL4-3) frente R5 (BaL y AC10) dentro del Δ RT: no se observaron diferencias significativas. Por último, los viriones pseudotipados VSV-G tenían inmunogenicidad significativamente aumentada (hasta el 90%) (Tabla 2). Para clarificar este punto se han comparado los porcentajes de respuesta positiva entre WT-AT2 y todas las variantes Δ RT. Véase la figura 16A. Se han observado diferencias significativas entre ellos, lo que confirma las ventajas descritas para las construcciones Δ RT: más inmunogénicas con un perfil más seguro. Véase la tabla 2. Además, se ha realizado la evaluación de la respuesta celular de las células CD-DM contra diferentes inmunógenos: NL4-3 WT+AT-2, NL4-3 Δ RT/VSV, NL4-3 Δ RT y p24 recombinante usando diferentes concentraciones (0,5, 1 y 5 μ g/ml de p24). La prueba realizada con 9 pacientes que responden y contra una y la misma solución madre de inmunógenos muestra que el índice de proliferación en CD8⁺ está sustancialmente aumentado (véase la figura 17).

Tabla 2

Cribado de respuesta inmune de pacientes positivos para VIH-1. Evaluación de la respuesta inmune después de estimulaciones con diferentes viriones mediante la producción de IFN- γ (ELISPOT)

Pacientes /Viriones	Respuesta	CFM media
16 de 69 corresponden a WT-AT2	23%	269
38 de 69 corresponden a Δ RT (X4)	55%	418
33 de 52 corresponden a Δ RT-AT2	63%	664
21 de 41 corresponden a Δ RT/AC10 (R5)	51%	286
23 de 43 corresponden a Δ RT/BaL (R5)	53%	462
18 de 20 corresponden a VSV- Δ RT	90%	1181
14 de 21 corresponden a WT/APV-AT2	67%	1006

Por último, se evaluó la inmunogenicidad de viriones Δ RT, que son inmaduros, comparados al virión WT-AT2 (NL4-3) que se habían tratado previamente en su producción con un inhibidor de la proteasa (Amprenavir, APV 50 μ M), WT/APV-AT2. El tratamiento con el inhibidor, traía como consecuencia la producción de viriones inmaduros. Las partículas inmaduras se analizaron mediante microscopía electrónica. Véase la figura 11. Tras evaluar la inmunogenicidad de Δ RT frente al virión WT/APV-AT2 se observó que WT/APV-AT2 producía una respuesta, medida por el número de células productoras de IFN- γ (ELISPOT), mayor que su homólogo sin tratar (obteniéndose un 67% de pacientes que responden en una población de 21 pacientes). Véase la tabla 2 y la figura 16B.

Se evaluaron las quimeras autólogas, como forma de potenciar la respuesta. Tras evaluar la inmunogenicidad de viriones Δ RT/ Δ gag ("paciente") en pacientes en los que se disponía de material para su amplificación, bien ADN o ARN, frente a los diferentes viriones no quiméricos

descritos previamente se observó que la respuesta se intensificaba hasta un 49%. Las respuestas heterólogas observadas en otros individuos eran muy heterogéneas. En los pacientes respondedores, el empleo de Gag autólogo (por ejemplo, el paciente 596) suponía un incremento del 33% en el número de CFM con respecto a su análogo Δ RT. En pacientes categorizados como no respondedores, que no han respondido a ninguna de las construcciones víricas, tan sólo respondieron al Gag autólogo a su máxima concentración, concentraciones superiores a 600 ng de antígeno p24. Véase la tabla 3.

Tabla 3

Evaluación de quimeras autólogas en dos pacientes

Paciente	WT-AT-2	Δ RT	Gag 70	Gag 596
70.ICS	5	15	20	n/a
596.8	55	255	n/a	380

4. Inmunización

En cada uno de los pacientes que vayan a recibir vacunaciones (es decir, células dendríticas derivadas de monocitos (CD-DM) pulsadas con el VIH-1 infeccioso no replicativo), el primer paso es el aislamiento y producción a gran escala del VIH-1 mediante transfección del vector en células en condiciones GMP. Dicho virión infeccioso no replicativo comprende un genoma vírico que contiene una mutación en el gen *pol*, de manera que la proteína RT es no funcional, y, además, la secuencia de otro gen distinto al gen *pol* sustituido por la secuencia del mismo gen procedente del VIH del paciente. El virus obtenido se concentra y guarda a -80° C hasta el momento de necesitarlo para pulsar las CD-DM del mismo paciente.

Las CD-DM se preparan recientes a partir de los monocitos de las PBMC de una muestra de 150 ml de sangre venosa que se extrae una semana antes de cada inmunización y que se procesa inmediatamente. Tras 5 días de cultivo de los monocitos para generar CD-DM inmaduras, se pulsan con el inmunógeno infeccioso no replicativo durante 2 días adicionales de cultivo, al que se añadirá un cóctel de citoquinas inductoras de la maduración de las CD-DM. Luego éstas se lavarán y administrarán inmediatamente al paciente en inyección subdérmica cerca de las axilas. Véase, García F, *et al.*, J. Infect. Dis. 2011, 203:473-478.

Ejemplo 1

El mutante NL4-3 delta RT + VSV descrito en el punto 3 (Evaluación de la respuesta inmune celular, en los Procedimientos generales) se usó para evaluar la respuesta celular e inmunogenicidad. Después de evaluar la eficacia con respecto al tropismo de envueltas X4 (NL4-3) frente a R5 (BaL y AC10) dentro del Δ RT no se observó diferencia significativa: Las

envueltas R5 parecían ser ligeramente menos inmunogénicas. Por último, los viriones pseudotipados VSV-G tenían inmunogenicidad significativamente aumentada (hasta el 90%), (tabla 2). Para clarificar este punto se han comparado los porcentajes de respuesta positiva entre WT-AT2 y todas las variantes Δ RT. Véase la figura 16. Se han observado diferencias significativas entre ellos, lo que confirma las ventajas descritas para las construcciones Δ RT: más inmunogénicas con un perfil más seguro. Véase la tabla 2. Además, se ha realizado la evaluación de la respuesta celular de las células CD-DM contra diferentes inmunógenos; NL4-3 WT+AT-2, NL4-3 Δ RT/VSV, NL4-3 Δ RT y p24 recombinante usando diferentes concentraciones (0,5, 1 y 5 μ g/ml de p24). La prueba realizada con 9 pacientes que responden y contra una y la misma solución madre de inmunógenos muestra que el índice de proliferación en CD8⁺ está sustancialmente aumentado (véase la figura 17).

Ejemplo 2

Para generar el vector NL4-3 Δ RT/ Δ 1136env se usó el vector NL4-3 Δ RT. Se realizó una doble digestión a 37°C usando las enzimas NcoI y NheI, que cortan en la posición 6113 y 7249 del plásmido, durante 2 horas. Esta doble digestión genera 2 fragmentos de 1136 y 11972 pb cada uno. La digestión se cargó en un gel de agarosa al 1% para separar e identificar ambos fragmentos. Un vez que se identificaron los fragmentos, se realizó una purificación del fragmento de 11972 mediante su extracción del gel. Posteriormente, se hizo una extensión del plásmido para su posterior ligación con la enzima de Klenow. La ligación de este fragmento se realizó añadiendo la enzima ligasa durante 12 horas a 16°C generando un nuevo plásmido de 11972 pb con una deleción en la envuelta de 1136 pb. Posteriormente, el plásmido se secuenció y transfectó en células 293T para generar y caracterizar los viriones producidos.

25

REIVINDICACIONES

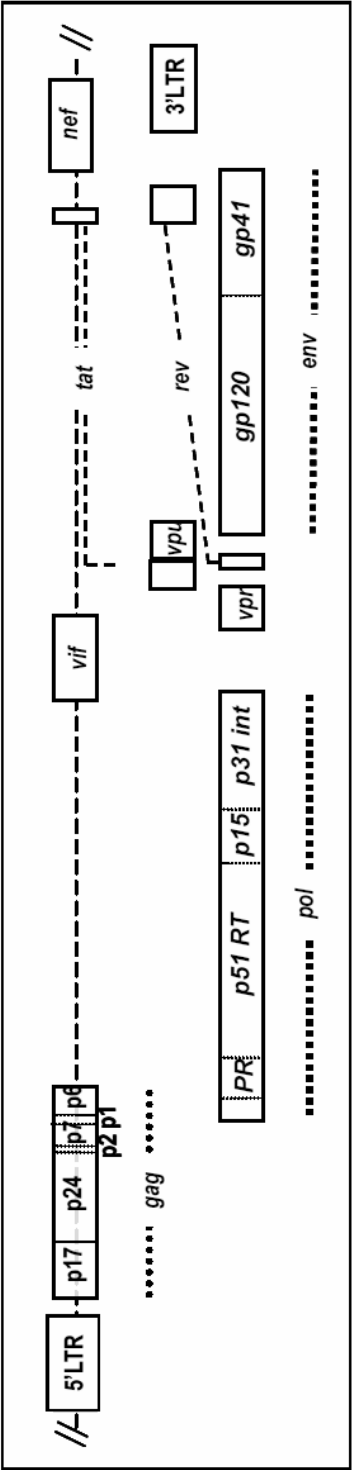
1. Un virión no replicativo que comprende un genoma de un virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación
5 ocasiona que el virus producido únicamente a partir de dicho genoma sea un virus no replicativo; y en donde dicho virión comprende además una glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV), en donde dicha mutación en el gen *pol* es una delección completa o parcial de la secuencia que codifica la proteína RT.
- 10 2. Un virión como en la reivindicación 1, en donde dicha delección completa o parcial de la secuencia que codifica la proteína RT corresponde a la delección en dicha secuencia que codifica la proteína RT en la construcción pNL4-3 Δ RT depositada con el número de acceso DSM 25917.
- 15 3. Un método para obtener una célula inmune activada que comprende los pasos:
 - a) poner en contacto una célula inmune con un virión no replicativo como en las reivindicaciones 1 a 2,
 - b) mantener la mezcla obtenida en el paso a) en condiciones adecuadas para infectar
20 dicha célula inmune con el virión y para procesar los antígenos originarios del virión no replicativo, y
 - c) opcionalmente, recuperar las células inmunes activadas.
4. El método como en la reivindicación 3, en donde dicha célula inmune se selecciona de un
25 linfocito, una célula mononuclear de sangre periférica y una célula dendrítica derivada de monocitos.
5. Una célula obtenible según el método como en las reivindicaciones 3 a 4.
- 30 6. Una composición inmunogénica o una vacuna que comprende un virión no replicativo como en las reivindicaciones 1 o 2 o una célula como en la reivindicación 5, junto con un soporte farmacéuticamente aceptable.
7. Uso de un virión no replicativo como en las reivindicaciones 1 o 2, una célula como en la
35 reivindicación 5, o una composición inmunogénica según la reivindicación 6 para la

preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de una infección por VIH o una enfermedad asociada con una infección por VIH.

8. Una composición que comprende:

- 5
- (i) un polinucleótido que comprende un genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) que contiene una mutación en el gen *pol*, en donde dicha mutación origina que el virus producido únicamente de dicho genoma sea un virus no replicativo, en donde dicha mutación en el gen *pol* da lugar a una
- 10 proteína RT no funcional; y
- (ii) un polinucleótido que codifica la glicoproteína G de la envuelta de un virus de la estomatitis vesicular (VSV).

A.



B.

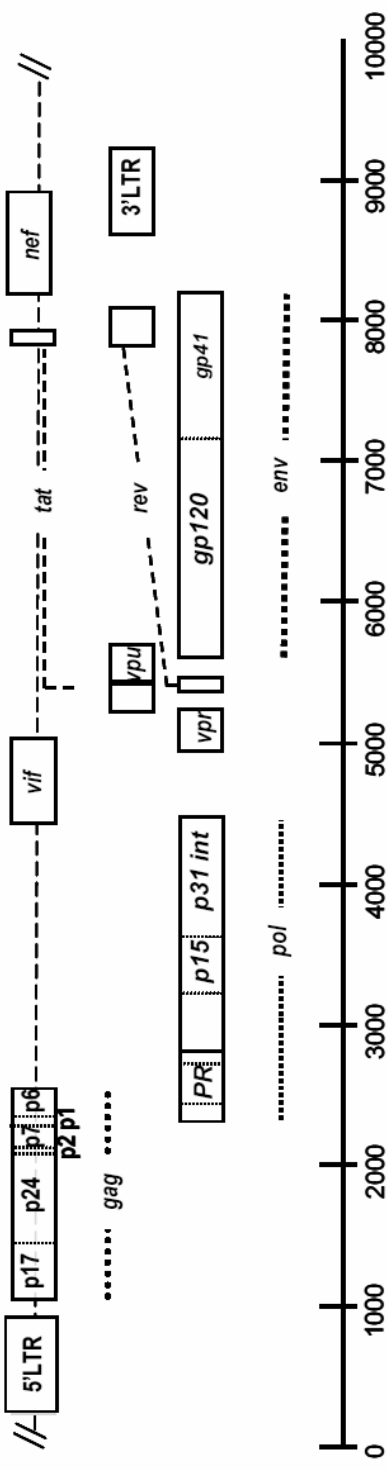


FIG. 1

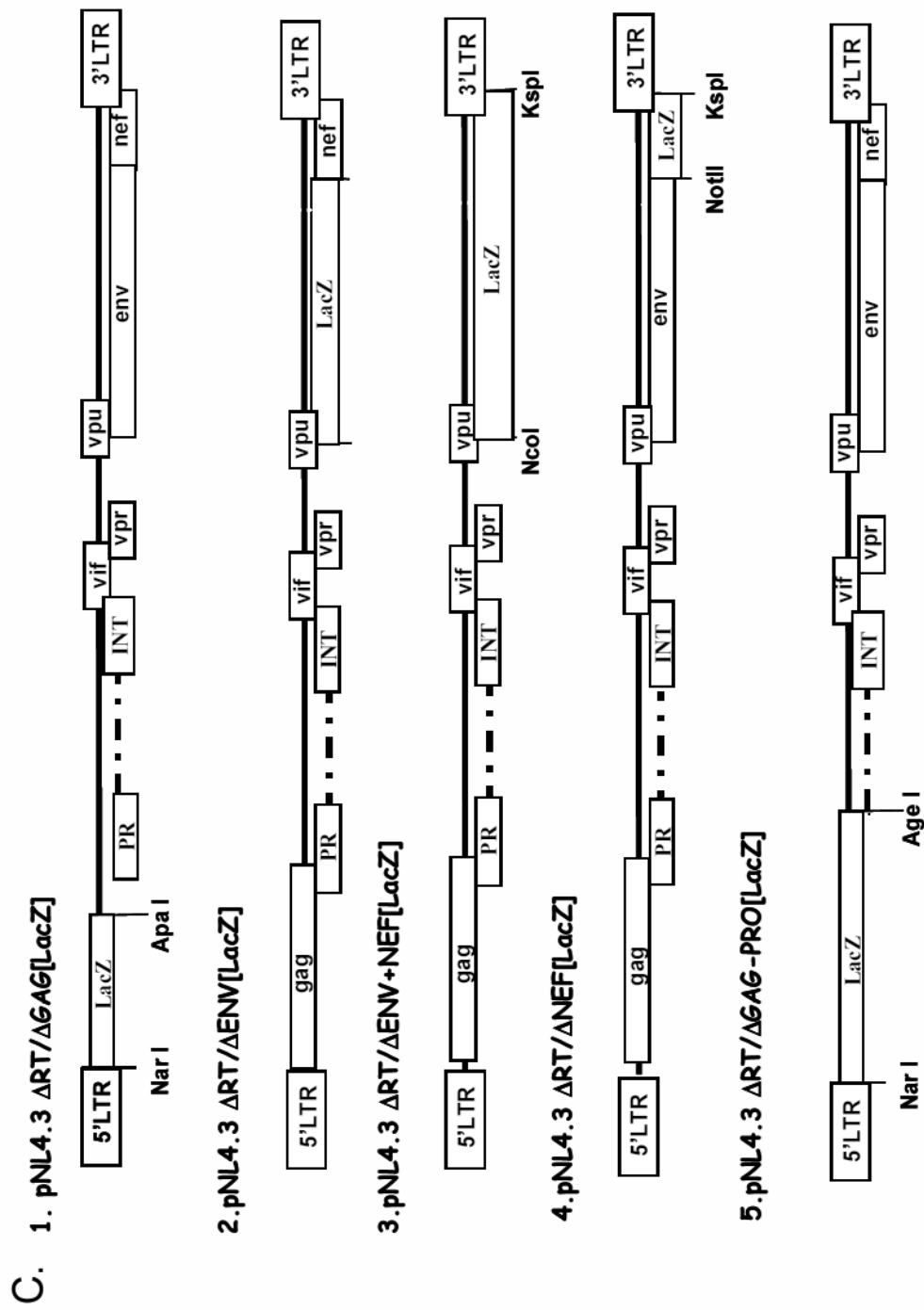


FIG. 1 (cont.)

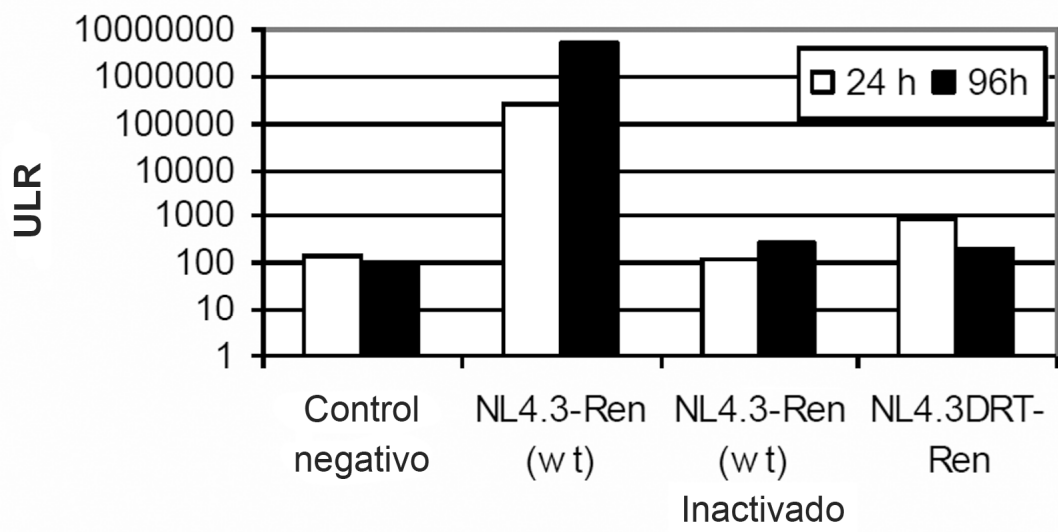


FIG. 2

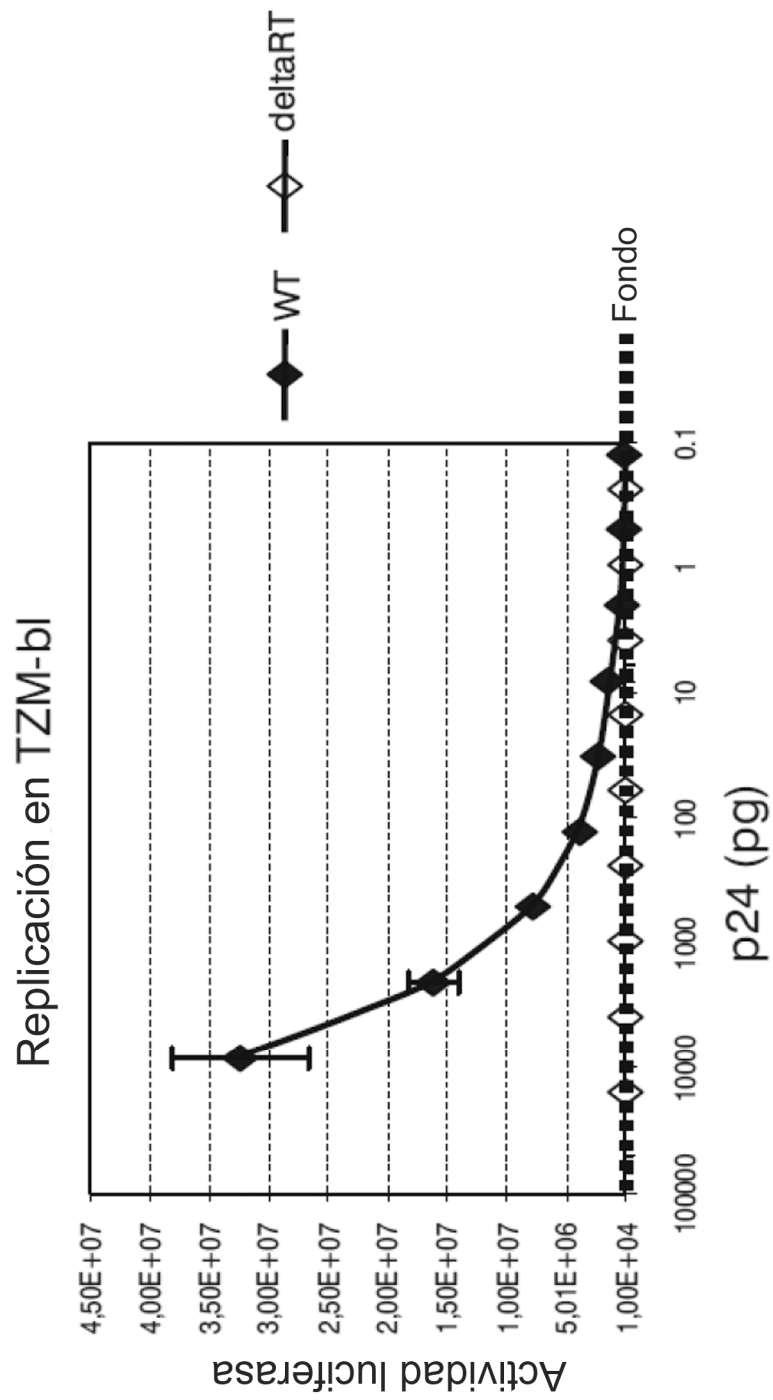
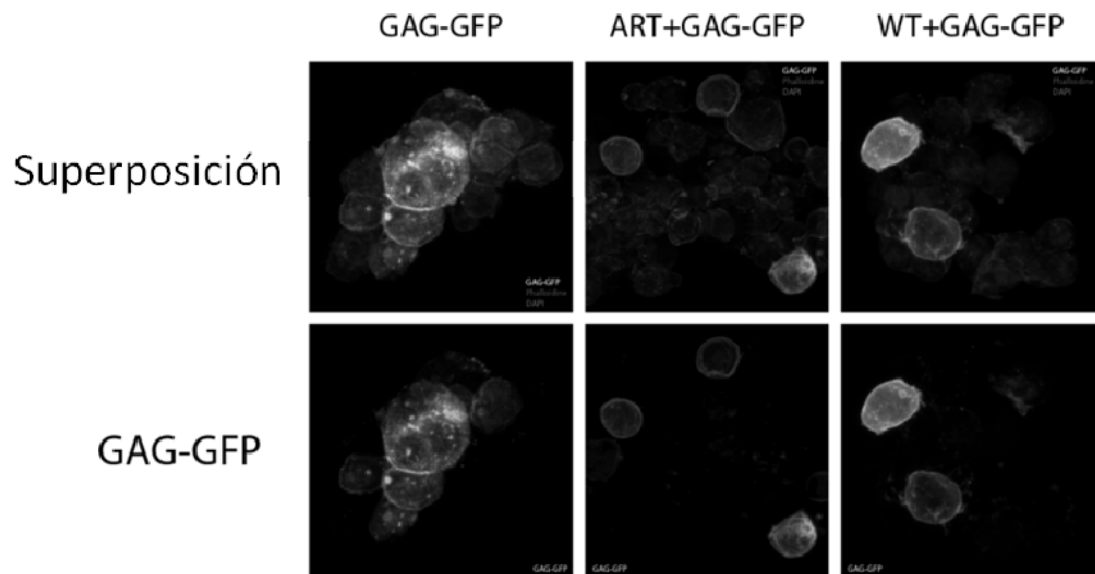


FIG. 3

A



B

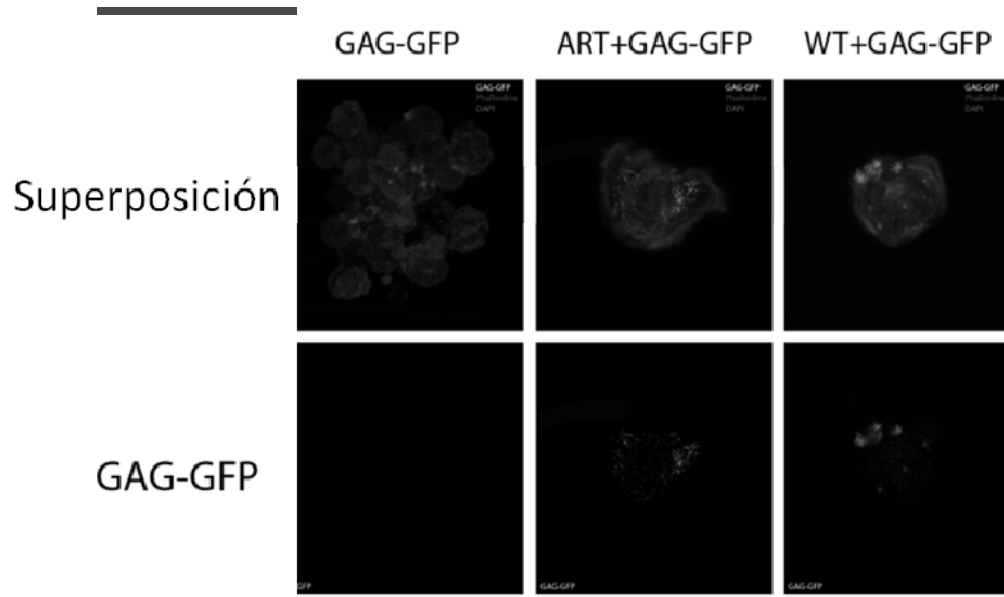
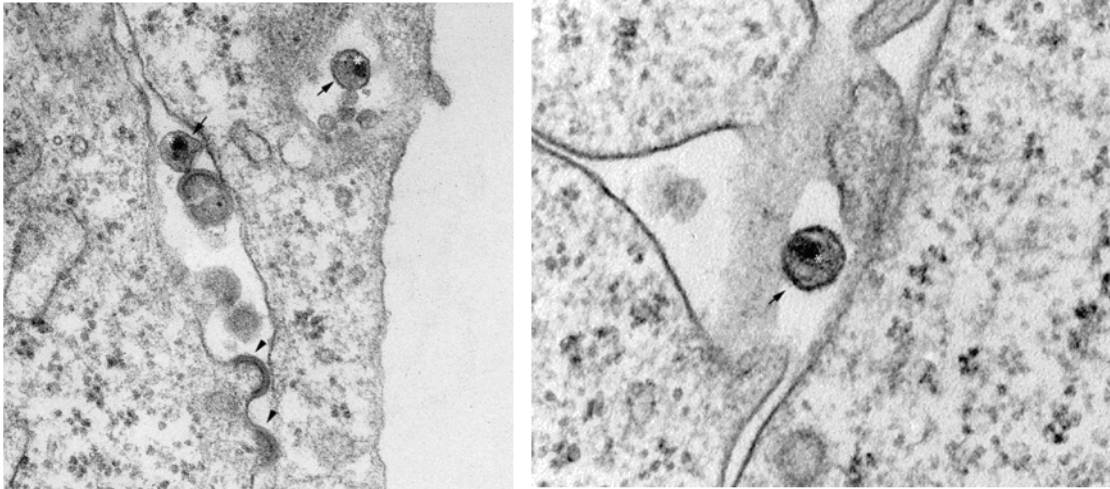


FIG. 4

A
Células 293T productoras de virión NL-4-3



B
Células 293T productoras de virión NL-4-3 Δ RT

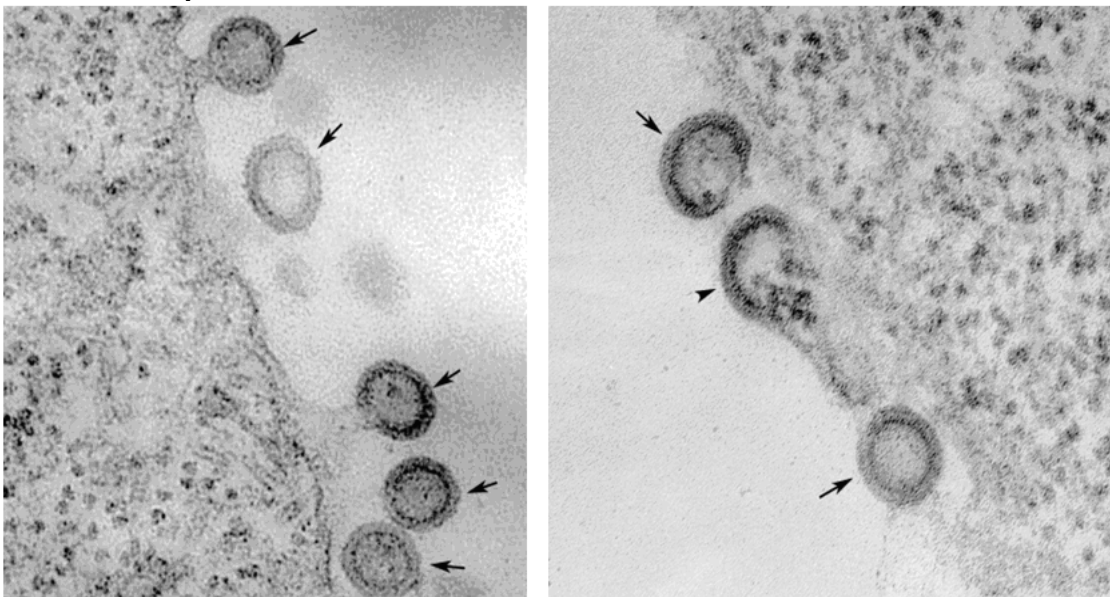
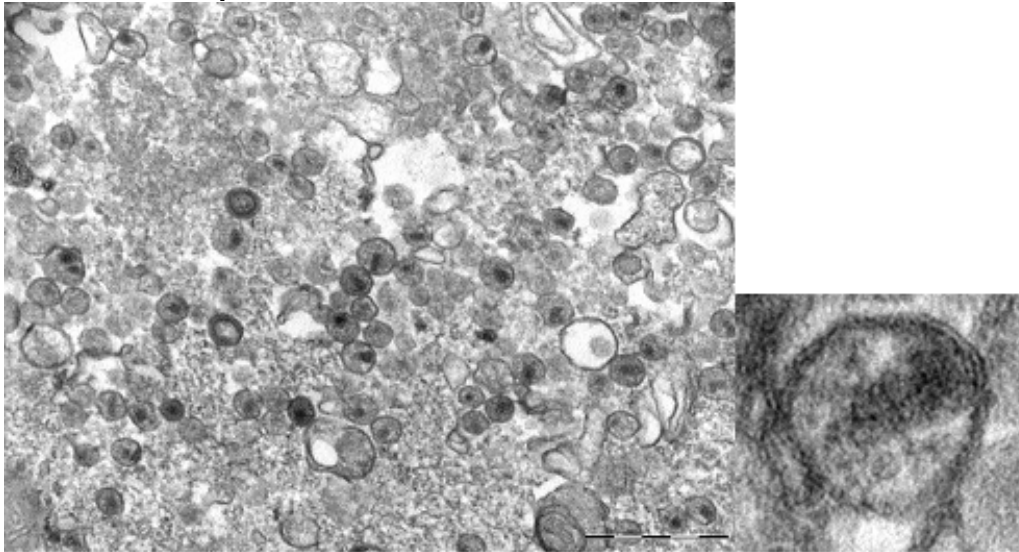


FIG. 5

C
Viriones NL4-3 purificados



D
Viriones NL4-3 Δ RT purificados

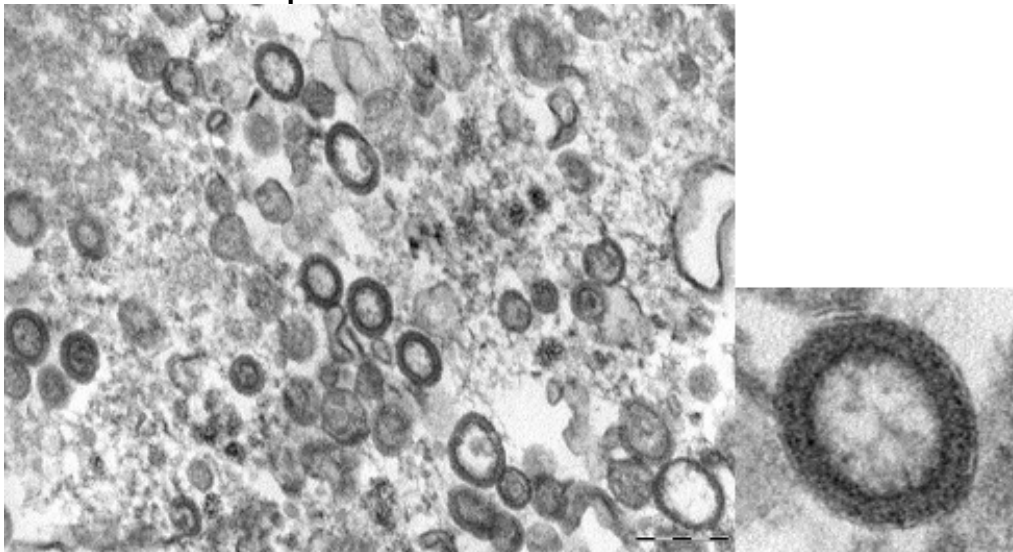


FIG. 5 (cont.)

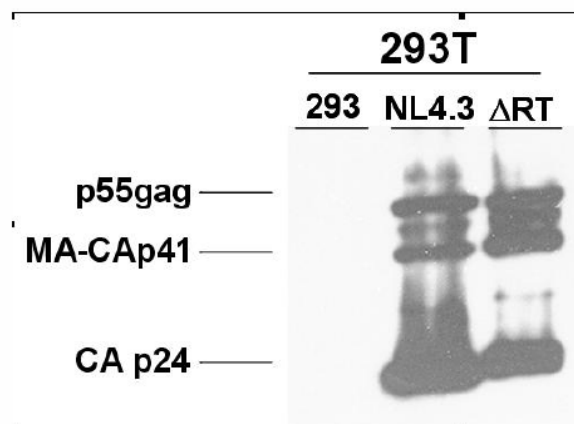


FIG. 6

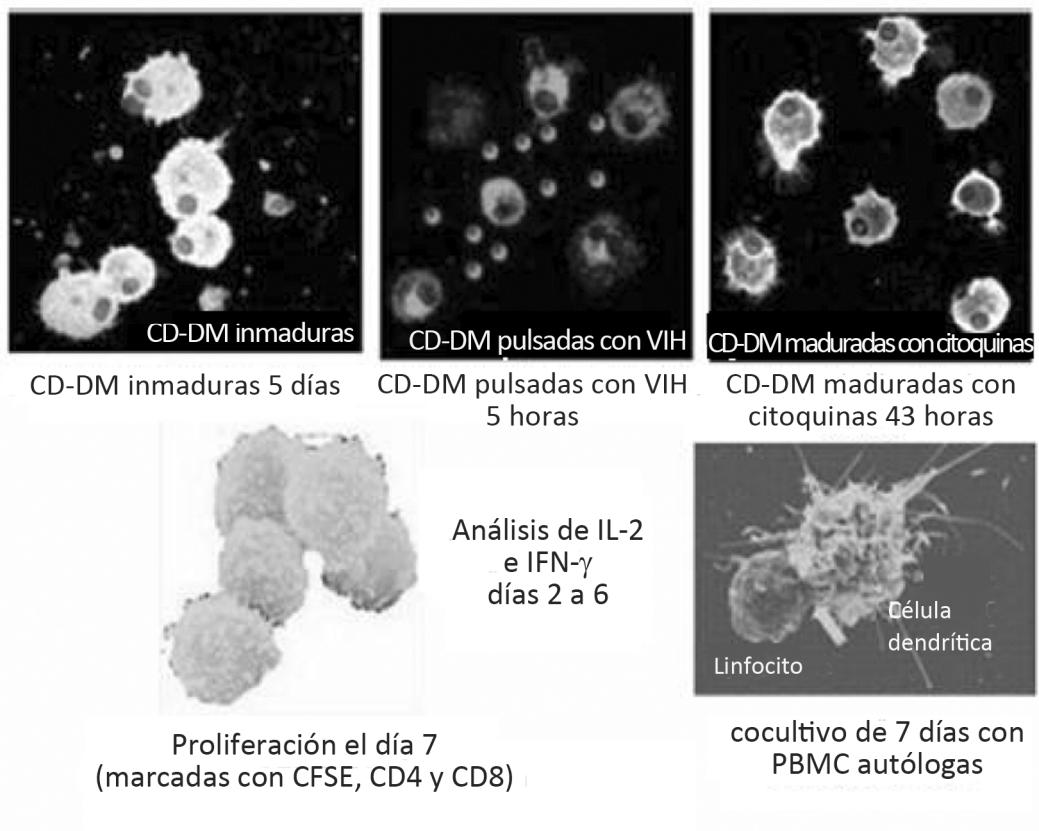
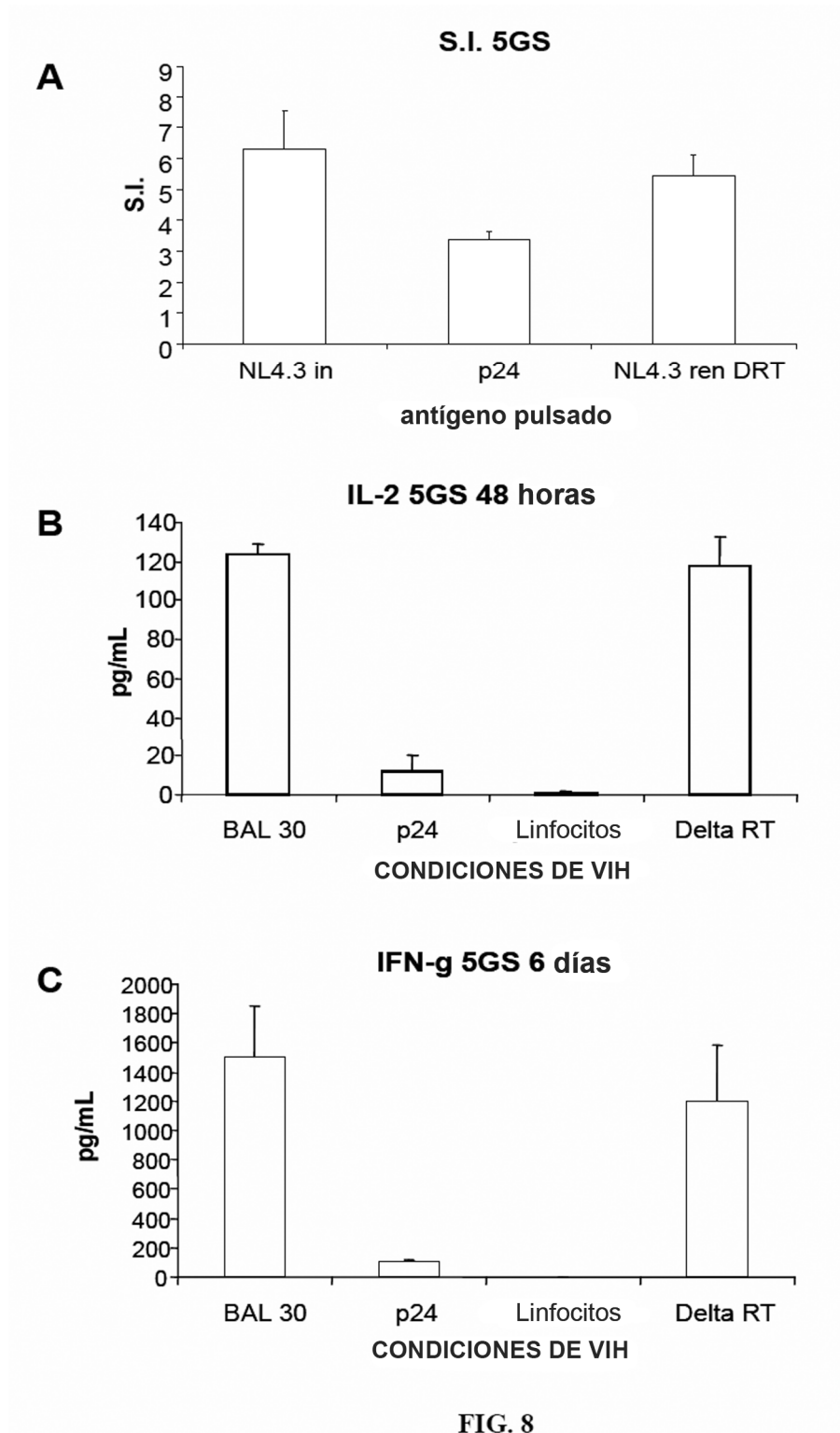


FIG. 7



NL-4.3-ΔRT indujo inmunorespuesta específica de VIH

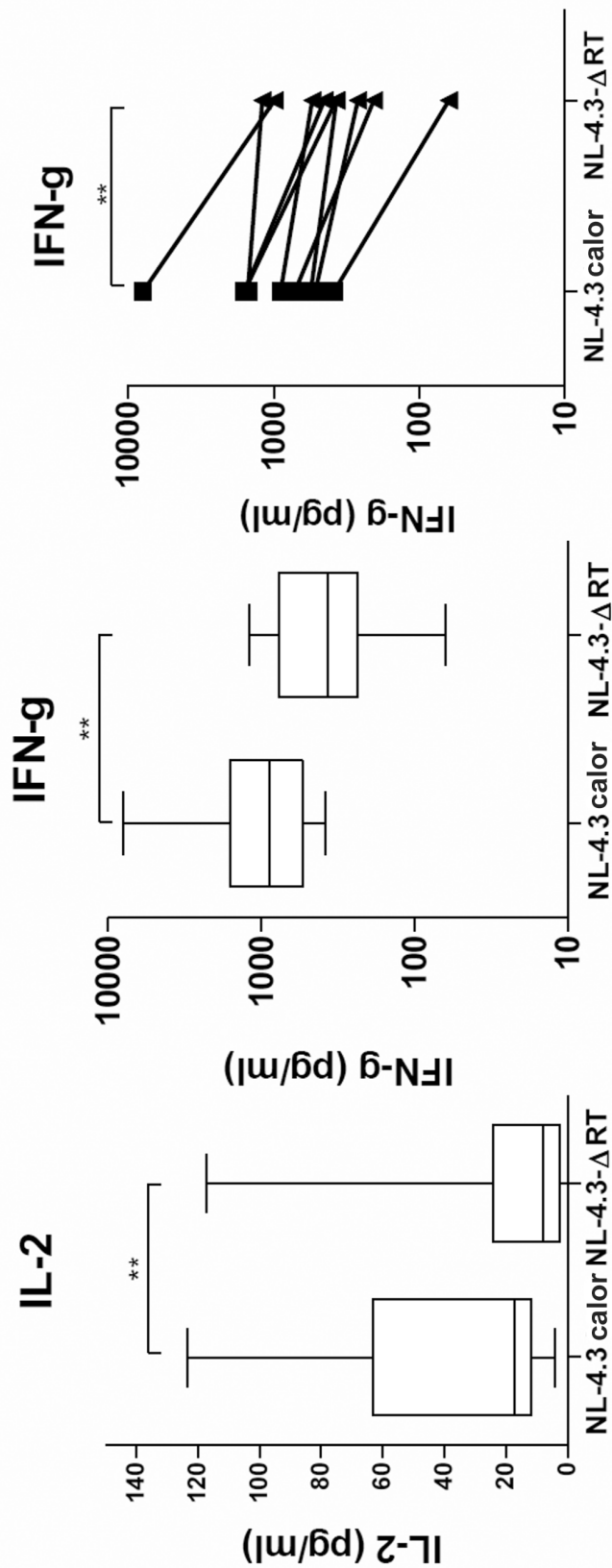


FIG. 9

NL-4.3-ΔRT indujo inmunorespuesta específica de VIH

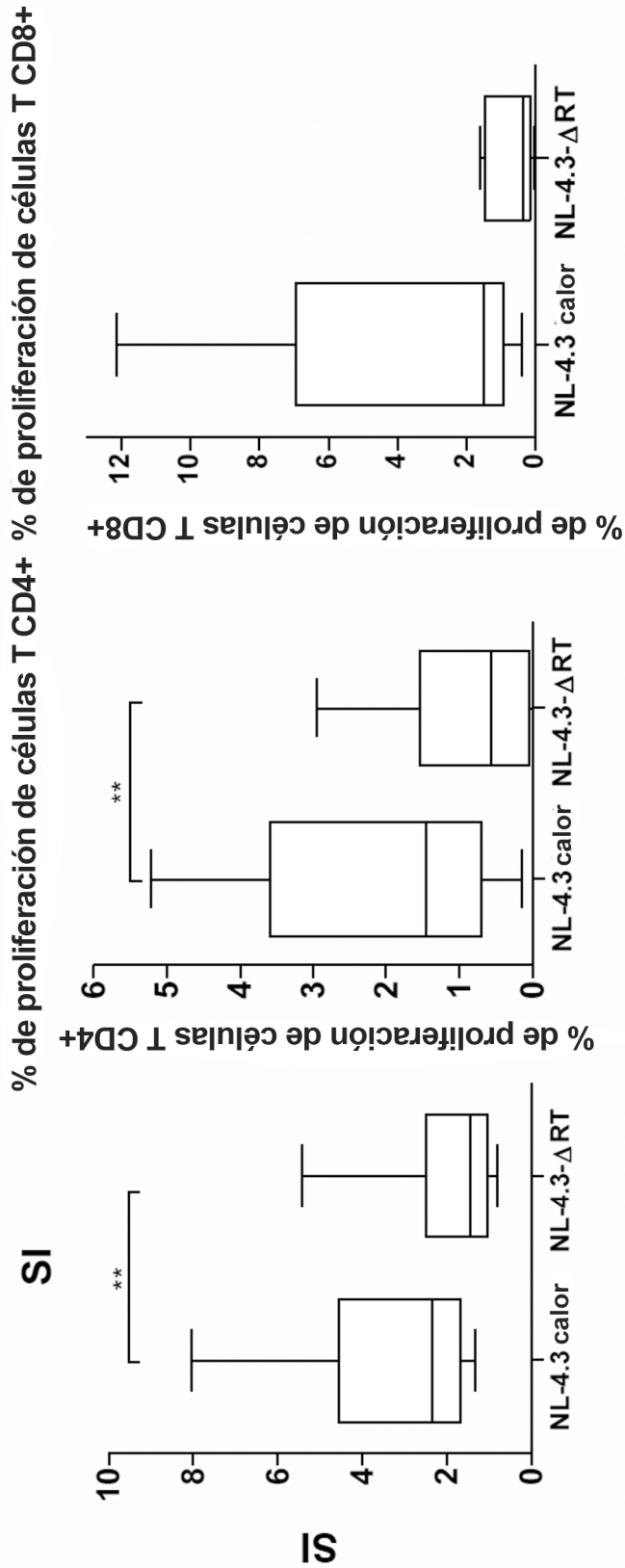
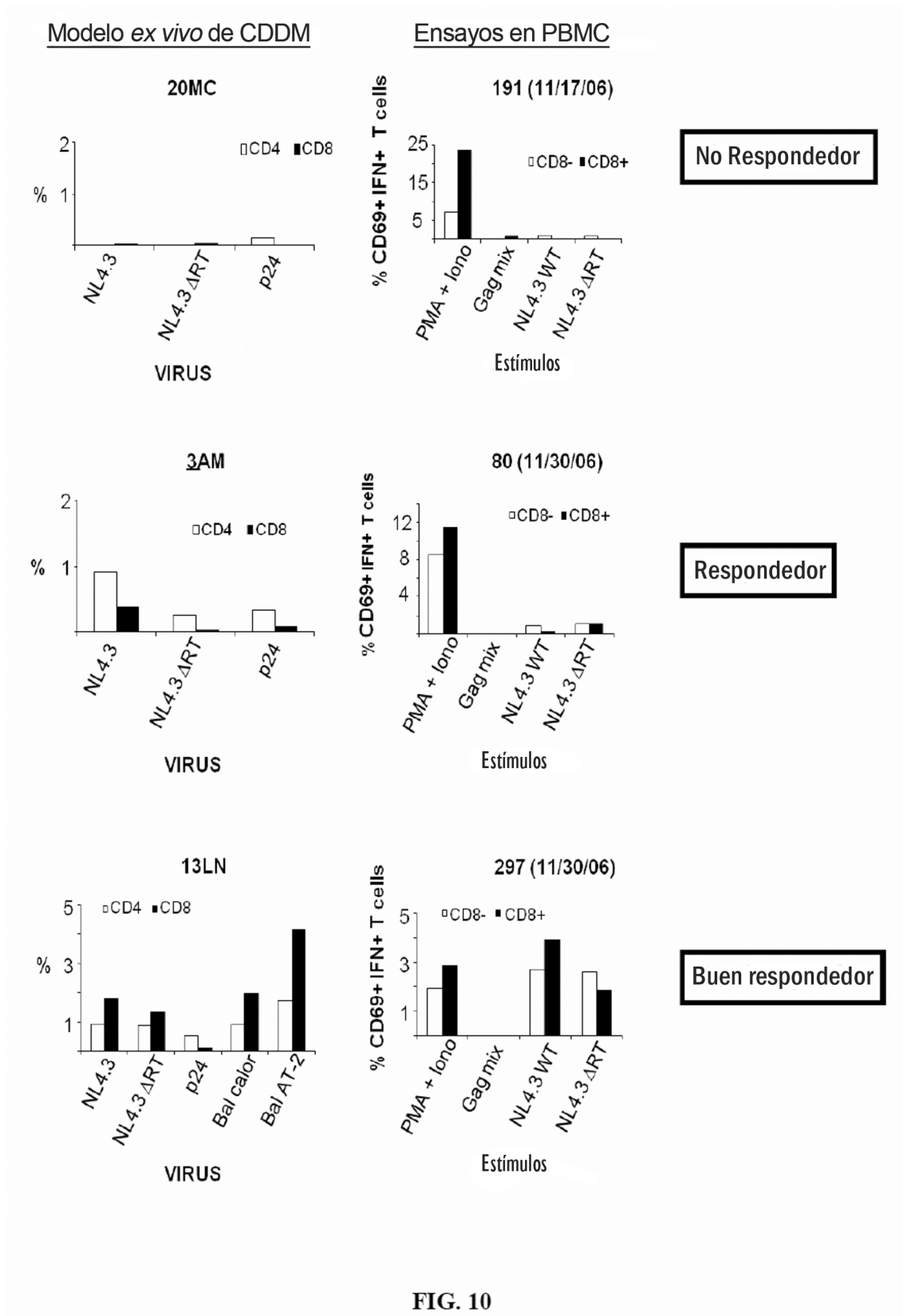
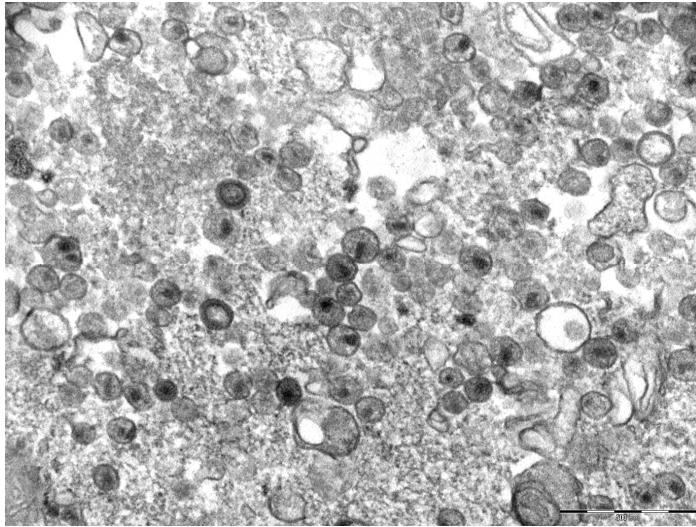


FIG. 9 (cont.)

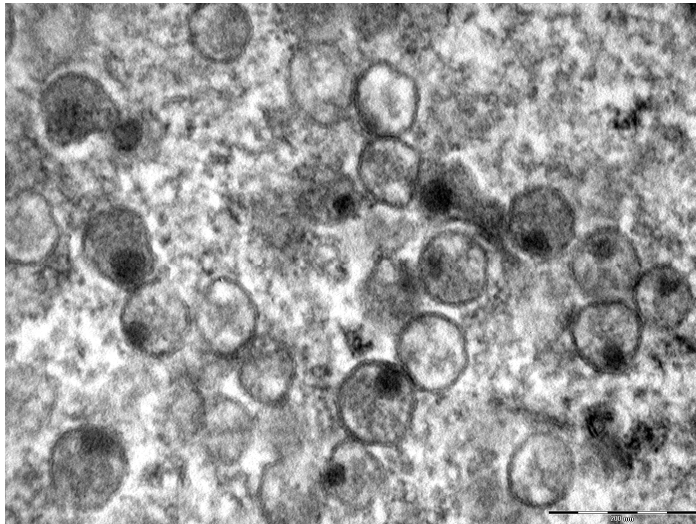


A



Viriones NL4-3 purificados sin tratamiento con Amprenavir

B



Viriones NL4-3 purificados tratados con Amprenavir

FIG. 11

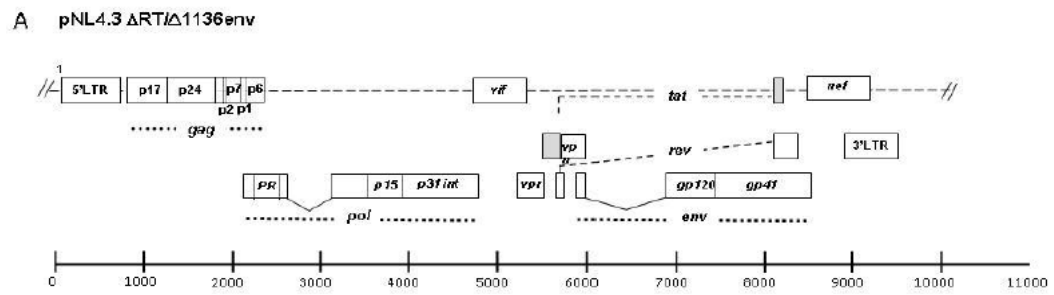
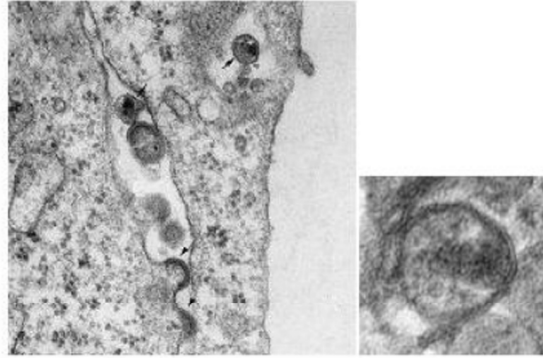


FIG. 12

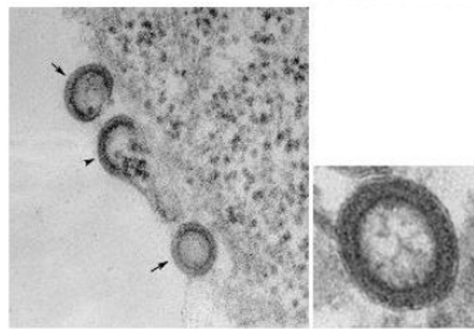
A

células 293T productoras del virión NL4-3



B

células 293T productoras del virión NL4-3 Δ RT



C

**células 293T productoras del virión
NL4-3 Δ RT/ Δ 1136env/VSV**

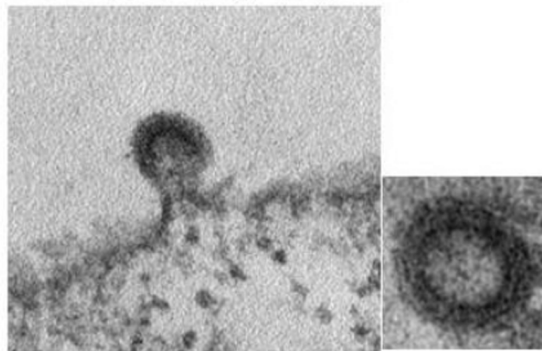


FIG 13

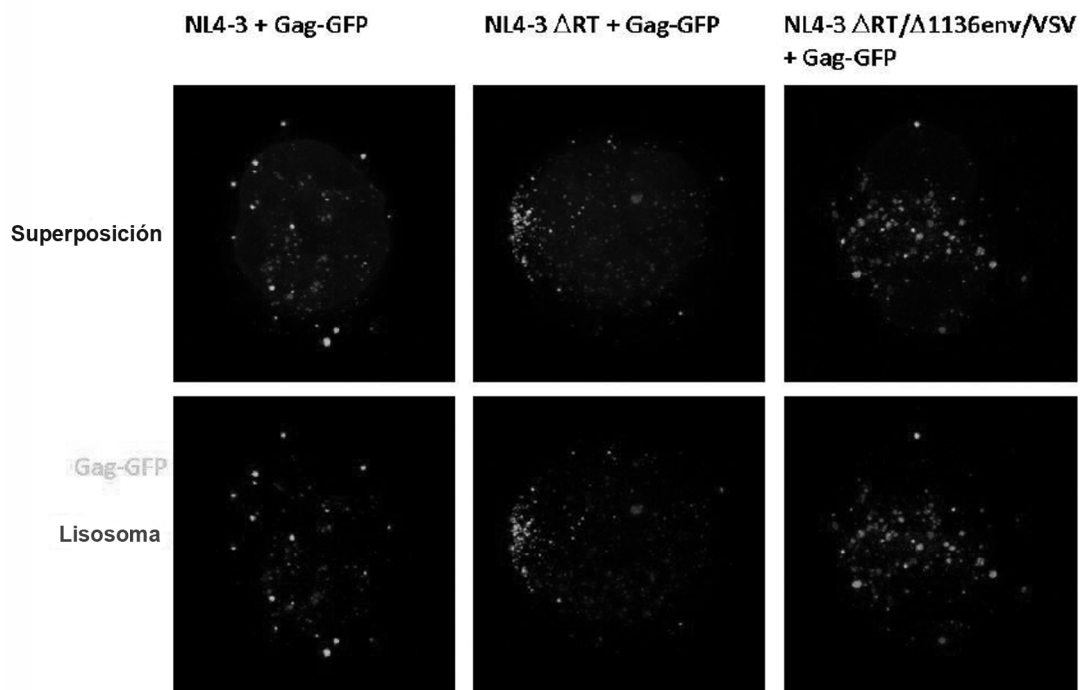


FIG. 14

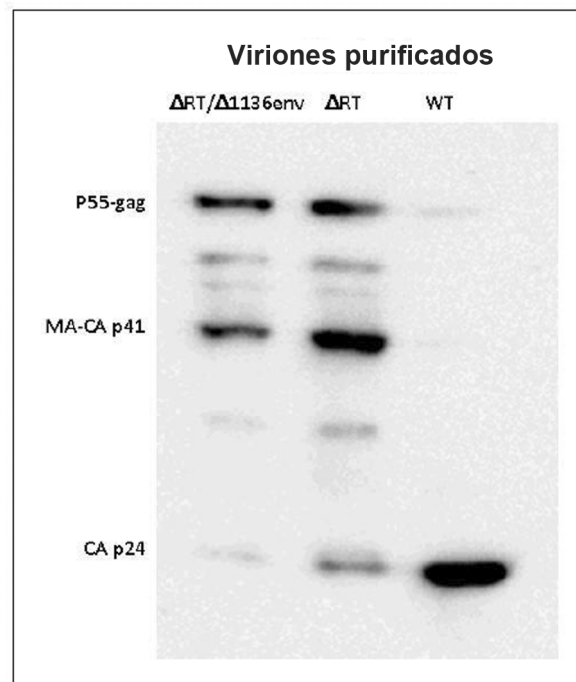


FIG. 15

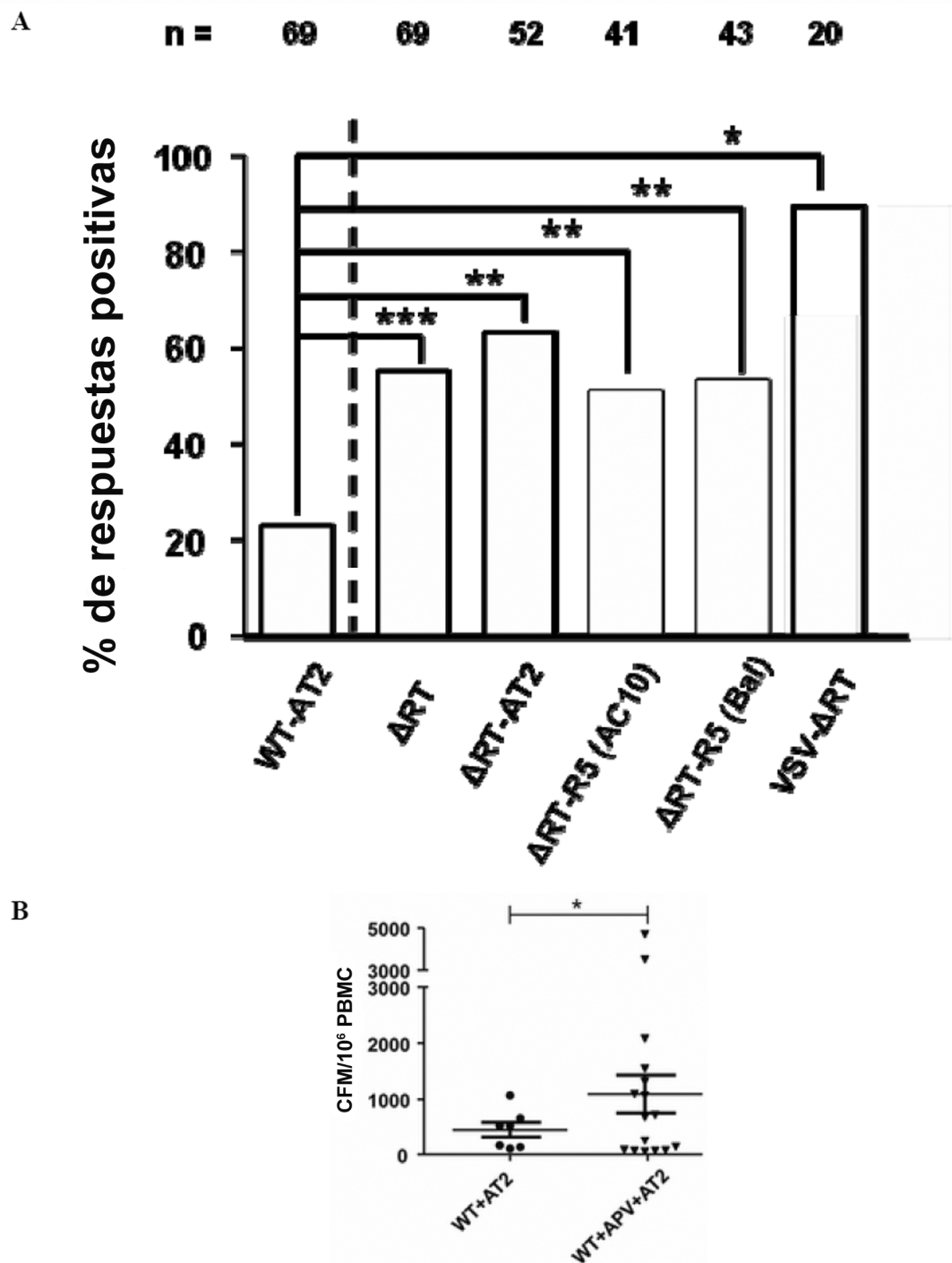
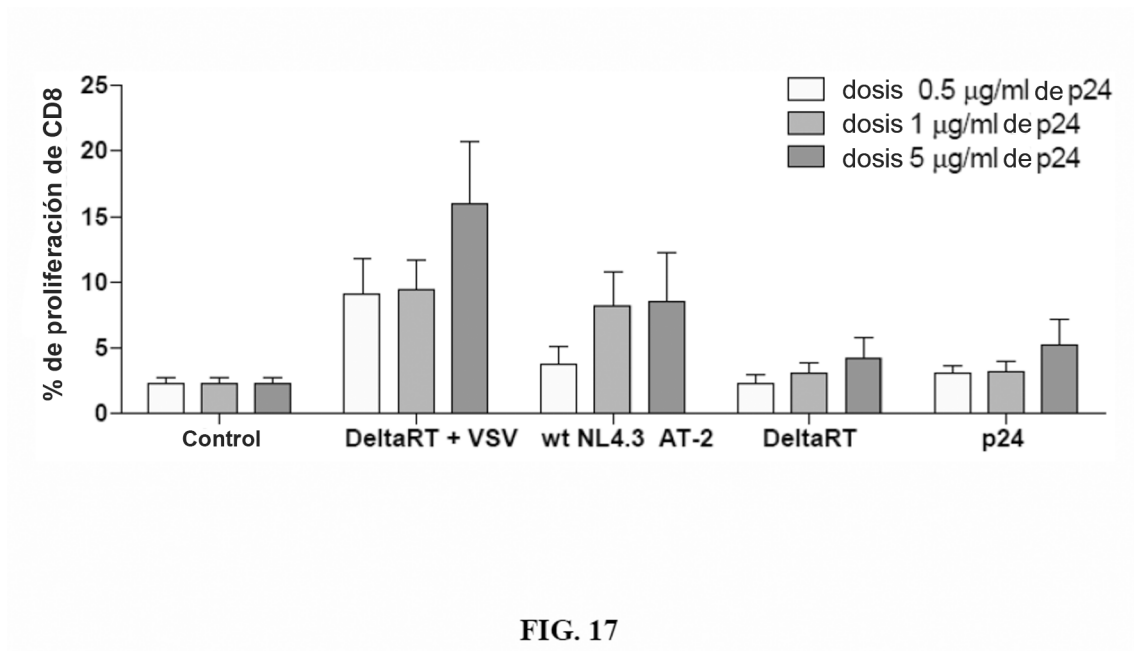


FIG. 16



ES 2 549 209 A2

LISTA DE SECUENCIAS

<110> LABORATORIOS DEL DR. ESTEVE S.A.
FUNDACIÓN PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA-CAIXA

<120> Partículas víricas VSV-HIV que carecen de funcionalidad transcriptasa inversa y aplicaciones terapéuticas de las mismas

<130> P8768ESPC

<150> EP12382340.3
<151> 2012-09-04

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 14825
<212> ADN
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 1
tggaagggtc aatttgggtcc caaaaaagac aagagatcct tgatctgtgg atctaccaca 60
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120
tgacctttgg atggtgcttc aagttagtac cagttgaacc agagcaagta gaagaggcca 180
atgaaggaga gaacaacagc ttgttacacc ctatgagcca gcatgggatg gaggaccgag 240
agggagaagt attagtgtgg aagtttgaca gcctcctagc atttcgtcac atggcccgag 300
agctgcatcc ggagtactac aaagactgct gacatcgagc tttctacaag ggactttccg 360
ctgggggactt tccagggagg tgtggcctgg gcgggactgg ggagtggcga gccctcagat 420
gctacatata agcagctgct ttttgctgtg actgggtctc tctgggttaga ccagatctga 480
gcctgggagc tctctggcta actaggaac ccactgctta agcctcaata aagcttgcct 540
tgagtgtcga aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact ctggtaacta gagatccctc 600
agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg cccgaacagg gacttgaaag 660
cgaaagtaaa gccagaggag atctctcgac gcaggactcg gcttgctgaa ggcgcacagg 720
caagaggcga ggggcggcga ctggtgagta cgccaaaaat tttgactagc ggaggctaga 780
aggagagaga tgggtgagag agcgtcggtg ttaagcgggg gagaattaga taaatgggaa 840
aaaattcggt taaggccagg gggaaagaaa caatataaac taaaacatat agtatgggca 900
agcagggagc tagaacgatt cgaggttaat cctggccttt tagagacatc agaaggctgt 960
agacaaatac tgggacagct acaaccatcc cttcagacag gatcagaaga acttagatca 1020
ttatataata caatagcagt cctctattgt gtgcatcaaa ggatagatgt aaaagacacc 1080

ES 2 549 209 A2

aaggaagcct	tagataagat	agaggaagag	caaaacaaaa	gtaagaaaaa	ggcacagcaa	1140
gcagcagctg	acacaggaaa	caacagccag	gtcagccaaa	attaccctat	agtgcagaac	1200
ctccaggggc	aaatgggtaca	tcaggccata	tcacctagaa	ctttaaatgc	atgggtaaaa	1260
gtagtagaag	agaaggcttt	cagcccagaa	gtaataccca	tgttttcagc	attatcagaa	1320
ggagccaccc	cacaagattt	aaataccatg	ctaaacacag	tggggggaca	tcaagcagcc	1380
atgcaaagt	taaaagagac	catcaatgag	gaagctgcag	aatgggatag	attgcatcca	1440
gtgcatgcag	ggcctattgc	accaggccag	atgagagaac	caaggggaag	tgacatagca	1500
ggaactacta	gtacccttca	ggaacaaata	ggatggatga	cacataatcc	acctatccca	1560
gtaggagaaa	tctataaaaag	atggataatc	ctgggattaa	ataaaatagt	aagaatgtat	1620
agccctacca	gcattctgga	cataagacaa	ggaccaaagg	aaccctttag	agactatgta	1680
gaccgattct	ataaaaactct	aagagccgag	caagcttcac	aagaggtaaa	aaattggatg	1740
acagaaacct	tgttgggtcca	aaatgcgaac	ccagattgta	agactatttt	aaaagcattg	1800
ggaccaggag	cgacactaga	agaaatgatg	acagcatgtc	agggagtggg	gggacccggc	1860
cataaagcaa	gagtttttggc	tgaagcaatg	agccaagtaa	caaateccagc	taccataatg	1920
atacagaaaag	gcaatttttag	gaaccaaaga	aagactgtta	agtgtttcaa	ttgtggcaaa	1980
gaagggcaca	tagccaaaaa	ttgcagggcc	cctaggaaaa	agggctgttg	gaaatgtgga	2040
aaggaaggac	accaaatagaa	agattgtact	gagagacagg	ctaatttttt	aggggaagatc	2100
tggccttccc	acaaggggaag	gccaggggaat	tttcttcaga	gcagaccaga	gccaacagcc	2160
ccaccagaag	agagcttcag	gtttggggaa	gagacaacaa	ctccctctca	gaagcaggag	2220
ccgatagaca	aggaactgta	tccttttagct	tccctcagat	cactcttttg	cagcgacccc	2280
tcgtcacaat	aaagataggg	gggcaattaa	aggaagctct	attagatata	ggagcagatg	2340
atacagtatt	agaagaaatg	aatttgccag	gaagatggaa	acaaaaaatg	atagggggaa	2400
ttggagggtt	tatcaaagta	agacagtatg	atcagatact	catagaaatc	tgcgacata	2460
aagctatagg	tacagtatta	gtaggaccta	cacctgtcaa	cataattgga	agaaatctgt	2520
tgactcagat	tggctgcact	ttaaattttc	ccattagtcc	tattgagact	gtaccagtaa	2580
aattaaagcc	aggaatggat	ggcccaaaag	ttaaacaatg	gccattgaca	gaagaaaaaa	2640
taaaagcatt	agtagaaatt	tgtacagaaa	tggaaaagga	aggaaaaatt	tcaaaaattg	2700
ggcctgaaaa	tccatacaat	actccagtat	ttgccataaa	gaaaaaagac	agtactaaat	2760
ggagaaaatt	agtagatttc	agagaactta	ataagagaac	tcaagatttc	tgggaagttc	2820

ES 2 549 209 A2

aattaggaat	accacatcct	gcagggttaa	aacagaaaaa	atcagtaaca	gtactggatg	2880
tgggcgatgc	atatttttca	gttcccttag	ataaagactt	caggaagtat	actgcattta	2940
ccatacctag	tataaacaat	gagacaccag	ggattagata	tcagtacaat	gtgcttccac	3000
agggatggaa	aggatcacca	gcaatattcc	agtgtagcat	gacaaaaatc	ttagagcctt	3060
ttagaaaaca	aatccagac	atagtcatct	atcaatacat	ggatgatttg	tatgtaggat	3120
ctgacttaga	aatagggcag	catagaacaa	aaatagagga	actgagacaa	catctgttga	3180
ggtggggatt	taccacacca	gacaaaaaac	atcagaaaga	acctccattc	ctttggatgg	3240
gttatgaact	ccatcctgat	aaatggacag	tacagcctat	agtgctgcc	gaaaaggaca	3300
gctggactgt	caatgacata	cagaaattag	tgggaaaatt	gaattgggca	agtcagattt	3360
atgcagggat	taaagtaagg	caattatgta	aacttcttag	gggaaccaa	gcactaacag	3420
aagtagtacc	actaacagaa	gaagcagagc	tagaactggc	agaaaacagg	gagattctaa	3480
aagaaccggt	acatggagtg	tattatgacc	catcaaaaga	cttaatagca	gaaatacaga	3540
agcaggggca	aggccaatgg	acatatcaaa	tttatcaaga	gccattttaa	aatctgaaaa	3600
caggaaaagta	tgcaagaatg	aagggtgccc	acactaatga	tgtgaaacaa	ttaacagagg	3660
cagtacaaaa	aatagccaca	gaaagcatag	taatatgggg	aaagactcct	aaattttaa	3720
taccataca	aaaggaaaca	tgggaagcat	ggtggacaga	gtattggcaa	gccacctgga	3780
ttcctgagtg	ggagtttgtc	aatacccctc	ccttagtgaa	gttatggtac	cagttagaga	3840
aagaacccat	aataggagca	gaaactttct	atgtagatgg	ggcagccaat	agggaaacta	3900
aattaggaaa	agcaggatat	gtaactgaca	gaggaagaca	aaaagttgtc	cccctaacgg	3960
acacaacaaa	tcagaagact	gagttacaag	caattcatct	agctttgcag	gattcgggat	4020
tagaagtaaa	catagtgaca	gactcacaat	atgcattggg	aatcattcaa	gcacaaccag	4080
ataagagtga	atcagagtta	gtcagtcaaa	taatagagca	gttaataaaa	aaggaaaaag	4140
tctacctggc	atgggtacca	gcacacaaag	gaattggagg	aatgaacaa	gtagataaat	4200
tggtcagtgc	tggaatcagg	aaagtactat	ttttagatgg	aatagataag	gccaagaag	4260
aacatgagaa	atatcacagt	aattggagag	caatggctag	tgattttaac	ctaccacctg	4320
tagtagcaaa	agaaatagta	gccagctgtg	ataaatgtca	gctaaaaggg	gaagccatgc	4380
atggacaagt	agactgtagc	ccaggaatat	ggcagctaga	ttgtacacat	ttagaaggaa	4440
aagttatctt	ggtagcagtt	catgtagcca	gtggatatat	agaagcagaa	gtaattccag	4500
cagagacagg	gcaagaaaca	gcatacttcc	tcttaaaatt	agcaggaaga	tggccagtaa	4560

ES 2 549 209 A2

aaacagtaca	tacagacaat	ggcagcaatt	tcaccagtac	tacagttaag	gccgcctggt	4620
ggtgggcggg	gatcaagcag	gaatttggca	ttccctacaa	tccccaagt	caaggagtaa	4680
tagaatctat	gaataaagaa	ttaaagaaaa	ttataggaca	ggtaagagat	caggctgaac	4740
atcttaagac	agcagtacaa	atggcagtat	tcatccacaa	ttttaaaaga	aaagggggga	4800
ttggggggta	cagtgcaggg	gaaagaatag	tagacataat	agcaacagac	atacaaacta	4860
aagaattaca	aaaacaaatt	acaaaaattc	aaaattttcg	ggtttattac	agggacagca	4920
gagatccagt	ttggaaagga	ccagcaaagc	tcctctggaa	aggtgaaggg	gcagtagtaa	4980
tacaagataa	tagtgacata	aaagtagtgc	caagaagaaa	agcaaagatc	atcagggatt	5040
atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattaacaca	5100
tggaaaagat	tagtaaaaca	ccatatgtat	atttcaagga	aagctaagga	ctggttttat	5160
agacatcact	atgaaagtac	taatccaaaa	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	5220
gatgctaaat	tagtaataac	aacatattgg	ggctctgcata	caggagaaaag	agactggcat	5280
ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	5340
gacctagcag	accaactaat	tcatctgcac	tattttgatt	gtttttcaga	atctgctata	5400
agaaatacca	tattaggacg	tatagttagt	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	5460
aaggtaggat	ctctacagta	cttggcacta	gcagcattaa	taaaaccaa	acagataaag	5520
ccacctttgc	ctagtgttag	gaaactgaca	gaggacagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	5580
aagggccaca	gagggagcca	tacaatgaat	ggacactaga	gcttttagag	gaacttaaga	5640
gtgaagctgt	tagacatttt	cctaggatat	ggctccataa	cttaggacaa	catatctatg	5700
aaacttacgg	ggatacttgg	gcaggagtgg	aagccataat	aagaattctg	caacaactgc	5760
tgtttatcca	tttcagaatt	gggtgtcgac	atagcagaat	aggcgttact	cgacagagga	5820
gagcaagaaa	tggagccagt	agatcctaga	ctagagccct	ggaagcatcc	aggaagtcag	5880
cctaaaactg	cttgtaccaa	ttgctattgt	aaaaagtgtt	gctttcattg	ccaagtttgt	5940
ttcatgacaa	aagccttagg	catctcctat	ggcaggaaga	agcggagaca	gcgacgaaga	6000
gctcatcaga	acagtcagac	tcatcaagct	tctctatcaa	agcagtaagt	agtacatgta	6060
atgcaaccta	taatagtagc	aatagtagca	ttagtagtag	caataataat	agcaatagtt	6120
gtgtggtcca	tagtaatcat	agaatatagg	aaaatattaa	gacaaagaaa	aatagacagg	6180
ttaattgata	gactaataga	aagagcagaa	gacagtggca	atgagagtga	aggagaagta	6240
tcagcacttg	tggagatggg	ggtggaaatg	gggcaccatg	ctccttggga	tattgatgat	6300

ES 2 549 209 A2

ctgtagtgct	acagaaaaat	tgtgggtcac	agtctattat	ggggtacctg	tgtggaagga	6360
agcaaccacc	actctatttt	gtgcatcaga	tgctaaagca	tatgatacag	aggtacataa	6420
tgtttgggcc	acacatgcct	gtgtacccac	agaccccaac	ccacaagaag	tagtattggt	6480
aatgtgaca	gaaaatttta	acatgtggaa	aatgacatg	gtagaacaga	tgcatgagga	6540
tataatcagt	ttatgggatc	aaagcctaaa	gccatgtgta	aaattaaccc	cactctgtgt	6600
tagtttaaag	tgcaactgatt	tgaagaatga	tactaatacc	aatagtagta	gcgggagaat	6660
gataatggag	aaaggagaga	taaaaaactg	ctctttcaat	atcagcacia	gcataagaga	6720
taagggtgcag	aaagaatatg	cattctttta	taaacttgat	atagtaccaa	tagataatac	6780
cagctatagg	ttgataagtt	gtaacacctc	agtcattaca	caggcctgtc	caaaggtatc	6840
ctttgagcca	attcccatac	attattgtgc	cccggtctgt	tttgcgattc	taaaatgtaa	6900
taataagacg	ttcaatggaa	caggaccatg	tacaaatgtc	agcacagtac	aatgtacaca	6960
tggaatcagg	ccagtagtat	caactcaact	gctgttaaat	ggcagtctag	cagaagaaga	7020
tgtagtaatt	agatctgcc	atttcacaga	caatgctaaa	accataatag	tacagctgaa	7080
cacatctgta	gaaattaatt	gtacaagacc	caacaacaat	acaagaaaaa	gtatccgtat	7140
ccagagggga	ccaggagag	catttgttac	aataggaaaa	ataggaaata	tgagacaagc	7200
acattgtaac	attagtagag	caaatggaa	tgccacttta	aaacagatag	ctagcaaatt	7260
aagagaacaa	tttggaata	ataaaacaat	aatctttaag	caatcctcag	gaggggaccc	7320
agaaattgta	acgcacagtt	ttaattgtgg	aggggaattt	ttctactgta	attcaacaca	7380
actgtttaat	agtacttgg	ttaatagtac	ttggagtact	gaagggtcaa	ataaactga	7440
aggaagtgc	acaatcacac	tcccatgcag	aataaaacaa	tttataaaca	tgtggcagga	7500
agtaggaaaa	gcaatgtatg	cccctcccat	cagtggacaa	attagatggt	catcaaatat	7560
tactgggctg	ctattaacaa	gagatggtgg	taataacaac	aatgggtccg	agatcttcag	7620
acctggagga	ggcgatatga	gggacaattg	gagaagtga	ttatataaat	ataaagtagt	7680
aaaaattgaa	ccattaggag	tagcaccac	caaggcaaag	agaagagtgg	tgagagagga	7740
aaaaagagca	gtgggaatag	gagctttgtt	ccttggggtc	ttgggagcag	caggaagcac	7800
tatgggcgca	gcgtcaatga	cgctgacggt	acaggccaga	caattattgt	ctgatatagt	7860
gcagcagcag	aacaatttgc	tgagggttat	tgaggcgcaa	cagcatctgt	tgcaactcac	7920
agtctggggc	atcaaacagc	tccaggcaag	aatcctggct	gtggaaagat	acctaaagga	7980
tcaacagctc	ctggggatth	ggggttgctc	tgaaaaactc	atttgaccca	ctgctgtgcc	8040

ES 2 549 209 A2

ttggaatgct	agttggagta	ataaatctct	ggaacagatt	tggaataaca	tgacctggat	8100
ggagtgggac	agagaaatta	acaattacac	aagcttaata	cactccttaa	ttgaagaatc	8160
gcaaaaccag	caagaaaaga	atgaacaaga	attattggaa	ttagataaat	gggcaagttt	8220
gtggaattgg	tttaacataa	caaattggct	gtggtatata	aaattattca	taatgatagt	8280
aggaggcttg	gtaggtttta	gaatagtttt	tgctgtactt	tctatagtga	atagagttag	8340
gcagggatat	tcaccattat	cgtttcagac	ccacctccca	atcccgaggg	gacccgacag	8400
gcccgaagga	atagaagaag	aaggtggaga	gagagacaga	gacagatcca	ttcgattagt	8460
gaacggatcc	ttagcactta	tctgggacga	tctgcggagc	ctgtgcctct	tcagctacca	8520
ccgcttgaga	gacttactct	tgattgtaac	gaggattgtg	gaacttctgg	gacgcagggg	8580
gtgggaagcc	ctcaaataat	ggtggaatct	cctacagtat	tgaggtcagg	aactaaagaa	8640
tagtgctgtt	aacttgctca	atgccacagc	catagcagta	gctgagggga	cagatagggt	8700
tatagaagta	ttacaagcag	cttatagagc	tattcgccac	atacctagaa	gaataagaca	8760
gggcttggaa	aggatthttgc	tataagatgg	gtggcaagtg	gtcaaaaagt	agtgtgattg	8820
gatggcctgc	tgtaagggaa	agaatgagac	gagctgagcc	agcagcagat	ggggtgggag	8880
cagtatctcg	agacctagaa	aaacatggag	caatcacaag	tagcaataca	gcagctaaca	8940
atgctgcttg	tgcttggtta	gaagcacaag	aggaggaaga	ggtgggtttt	ccagtcacac	9000
ctcaggtacc	tttaagacca	atgacttaca	aggcagctgt	agatcttagc	cactttttta	9060
aagaaaaggg	gggactggaa	gggctaattc	actcccaaag	aagacaagat	atccttgatc	9120
tgtggatcta	ccacacacaa	ggctacttcc	ctgattggca	gaactacaca	ccagggccag	9180
gggtcagata	tccactgacc	tttgatgggt	gctacaagct	agtaccagtt	gagccagata	9240
aggtagaaga	ggccaataaa	ggagagaaca	ccagcttggt	acaccctgtg	agcctgcatg	9300
gaatggatga	ccctgagaga	gaagtgttag	agtggaggtt	tgacagccgc	ctagcatttc	9360
atcacgtggc	ccgagagctg	catccggagt	acttcaagaa	ctgctgacat	cgagcttgct	9420
acaagggact	ttccgctggg	gactttccag	ggaggcgtgg	cctgggcggg	actggggagt	9480
ggcgagccct	cagatgctgc	atataagcag	ctgctttttg	cctgtactgg	gtctctctgg	9540
ttagaccaga	tctgagcctg	ggagctctct	ggctaactag	ggaaccact	gcttaagcct	9600
caataaagct	tgcttgaggt	gcttcaagta	gtgtgtgccc	gtctgttgtg	tgactctggg	9660
aactagagat	ccctcagacc	cttttagtca	gtgtggaaaa	tctctagcac	ccaggaggta	9720
gaggttgacg	tgagccaaga	tcgcgccact	gcattccagc	ctgggcaaga	aaacaagact	9780

ES 2 549 209 A2

```

gtctaaaata ataataataa gttaagggtg ttaaataatat ttatacatgg aggtcataaa 9840
aatatatata tttgggctgg gcgcagtggc tcacacctgc gcccggccct ttgggaggcc 9900
gaggcaggtg gatcacctga gtttgggagt tccagaccag cctgaccaac atggagaaac 9960
cccttctctg tgtattttta gtagatttta ttttatgtgt attttattca caggtatttc 10020
tggaactg aaactgtttt tcctctactc tgataccaca agaatcatca gcacagagga 10080
agacttctgt gatcaaatgt ggtgggagag ggaggttttc accagcacat gagcagtcag 10140
ttctgccgca gactcggcgg gtgtccttcg gttcagttcc aacaccgcct gcctggagag 10200
aggtcagacc acaggggtgag ggctcagtc ccaagacata aacacccaag acataaacac 10260
ccaacaggtc caccgcgcct gctgccaggg cagagccgat tcaccaagac gggaattagg 10320
atagagaaaag agtaagtcac acagagccgg ctgtgcggga gaacggagtt ctattatgac 10380
tcaaatcagt ctccccaagc attcggggat cagagttttt aaggataact tagtgtgtag 10440
ggggccagtg agttggagat gaaagcgtag ggagtcgaag gtgtcctttt gcgccagtc 10500
agttcctggg tggggggccac aagatcggat gagccagttt atcaatccgg ggtgccagc 10560
tgatccatgg agtgcagggg ctgcaaaata tctcaagcac tgattgatct taggttttac 10620
aatagtgatg ttaccccagg aacaatttgg ggaaggtcag aatcttgtag cctgtagctg 10680
catgactcct aaaccataat ttcttttttg tttttttttt tttatttttg agacagggtc 10740
tcaactctgtc acctaggctg gagtgcagtg gtgcaatcac agctcactgc agcctcaacg 10800
tcgtaagctc aagcgatcct cccacctcag cctgcctggt agctgagact acaagcgacg 10860
ccccagttaa tttttgtatt tttggtagag gcagcgtttt gccgtgtggc cctggctggt 10920
ctcgaactcc tgggctcaag tgatccagcc tcagcctccc aaagtgctgg gacaaccggg 10980
gccagtcact gcacctggcc ctaaaccata atttctaatac ttttggtctaa tttgttagtc 11040
ctacaaaggc agtctagtcc ccaggcaaaa agggggtttg tttcgggaaa gggctgttac 11100
tgtctttgtt tcaaactata aactaagttc ctctaaact tagttcggcc tacaccag 11160
aatgaacaag gagagcttgg aggttagaag cacgatggaa ttggttaggt cagatctctt 11220
tcaactgtctg agttataatt ttgcaatggt ggttcaaaga ctgcccgtt ctgacaccag 11280
tcgctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgat tgggcgctct 11340
tccgcttcct cgctcactga ctgctgcgc tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca 11400
gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc aggaaagaac 11460
atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggccgcgtt gctggcgttt 11520

```

ES 2 549 209 A2

```

ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg 11580
cgaaacccga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc 11640
tctcctgttc cgaccctgcc gcttacccga tacctgtccg cttttctccc ttcgggaagc 11700
gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgctcc 11760
aagctgggct gtgtgcacga acccccgtt cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac 11820
tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc agccactggg 11880
aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct 11940
aactacggct acactagaag aacagtatth ggatatctgcg ctctgctgaa gccagttacc 12000
ttcggaaaaa gagttggtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg tagcgggtgg 12060
ttttttgttt gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg 12120
atcttttcta cggggctctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg gattttggtc 12180
atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg aagttttaaa 12240
tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttgg tctgacagtt accaatgctt aatcagttag 12300
gcacctatct cagegatctg tctatttcgt tcatccatag ttgcctgact ccccgctctg 12360
tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga 12420
gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg aagggccgag 12480
cgcagaagtg gtcttgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa 12540
gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc 12600
atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg gcttcattca gctccggttc ccaacgatca 12660
aggcgagtta catgatcccc catgttggtc aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg 12720
atcgttggtc gaagtaagtt ggccgcagtg ttatcactca tggttatggc agcactgcat 12780
aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactggtga gtactcaacc 12840
aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga ccgagttgct cttgcccggc gtcaatacgg 12900
gataataccg cgccacatag cagaacttta aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg 12960
gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt 13020
gcaccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca 13080
ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata agggcgacac ggaaatgttg aatactcata 13140
ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat gagcggatac 13200
atatttgaat gtatttagaa aaataaaca ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa 13260

```

ES 2 549 209 A2

```

gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt atcatgacat taacctataa aaataggcgt 13320
atcacgaggc ctttctgtct cgcgcgtttc ggtgatgacg gtgaaaacct ctgacacatg 13380
cagctcccgg agacgggtcac agcttgtctg taagcggatg ccgggagcag acaagcccgt 13440
cagggcgctg cagcgggtgt tggcgggtgt cggggctggc ttaactatgc ggcatcagag 13500
cagattgtac tgagagtgc ccatatgcgg tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga 13560
aaataccgca tcaggcgcca ttcgccattc aggctgcgca actggtggga agggcgatcg 13620
gtgcgggcct cttcgctatt acgccagggg aggcagagat tgcagtaagc tgagatcgca 13680
gcactgcact ccagcctggg cgacagagta agactctgtc tcaaaaataa aataaataaa 13740
tcaatcagat attccaatct tttcctttat ttattttatt attttctatt ttggaaacac 13800
agtccttcct tattccagaa ttacacatat attctatttt tctttatatg ctccagtttt 13860
ttttagacct tcacctgaaa tgtgtgtata caaaatctag gccagtccag cagagcctaa 13920
aggtaaaaaa taaaataata aaaaataaat aaaatctagc tcactccttc acatcaaaat 13980
ggagatacag ctgttagcat taaataccaa ataaccatc ttgtcctcaa taattttaag 14040
cgcctctctc caccacatct aactcctgtc aaaggcatgt gcccttccg ggcgctctgc 14100
tgtgctgcca accaactggc atgtggactc tgcagggtcc ctaactgcca agccccacag 14160
tgtgccctga ggctgcccct tccttctagc ggctgcccc actcggcttt gctttcccta 14220
gtttcagtta cttgcgttca gccaaagtct gaaactaggt gcgcacagag cggtaagact 14280
gcgagagaaa gagaccagct ttacaggggg tttatcacag tgcaccctga cagtcgtcag 14340
cctcacaggg ggtttatcac attgcaccct gacagtcgtc agcctcacag ggggtttatc 14400
acagtgcacc cttacaatca ttccatttga ttcacaattt ttttagtctc tactgtgcct 14460
aacttgtaag ttaaatttga tcagaggtgt gttcccagag gggaaaacag tatatacagg 14520
gttcagtact atcgcatctc aggctccac ctgggtcttg gaatgtgtcc cccgaggggt 14580
gatgactacc tcagttggat ctccacaggt cacagtgaca caagataacc aagacacctc 14640
ccaaggctac cacaatgggc cgcctccac gtgcacatgg ccggagggaac tgccatgtcg 14700
gaggtgcaag cacacctgcg catcagagtc cttggtgtgg agggagggaac cagcgcagct 14760
tccagccatc cacctgatga acagaaccta gggaaagccc cagttctact tacaccagga 14820
aaggc 14825

```

<210> 2
<211> 1003

ES 2 549 209 A2

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 2

Phe	Phe	Arg	Glu	Asp	Leu	Ala	Phe	Pro	Gln	Gly	Lys	Ala	Arg	Glu	Phe
1				5					10					15	

Ser	Ser	Glu	Gln	Thr	Arg	Ala	Asn	Ser	Pro	Thr	Arg	Arg	Glu	Leu	Gln
			20					25					30		

Val	Trp	Gly	Arg	Asp	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Glu	Ala	Gly	Ala	Asp	Arg
		35					40					45			

Gln	Gly	Thr	Val	Ser	Phe	Ser	Phe	Pro	Gln	Ile	Thr	Leu	Trp	Gln	Arg
	50					55					60				

Pro	Leu	Val	Thr	Ile	Lys	Ile	Gly	Gly	Gln	Leu	Lys	Glu	Ala	Leu	Leu
65					70					75					80

Asp	Thr	Gly	Ala	Asp	Asp	Thr	Val	Leu	Glu	Glu	Met	Asn	Leu	Pro	Gly
				85					90					95	

Arg	Trp	Lys	Pro	Lys	Met	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Phe	Ile	Lys	Val
			100					105					110		

Arg	Gln	Tyr	Asp	Gln	Ile	Leu	Ile	Glu	Ile	Cys	Gly	His	Lys	Ala	Ile
		115					120					125			

Gly	Thr	Val	Leu	Val	Gly	Pro	Thr	Pro	Val	Asn	Ile	Ile	Gly	Arg	Asn
	130					135					140				

Leu	Leu	Thr	Gln	Ile	Gly	Cys	Thr	Leu	Asn	Phe	Pro	Ile	Ser	Pro	Ile
145					150					155					160

Glu	Thr	Val	Pro	Val	Lys	Leu	Lys	Pro	Gly	Met	Asp	Gly	Pro	Lys	Val
				165					170					175	

Lys	Gln	Trp	Pro	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Ala	Leu	Val	Glu	Ile
			180					185					190		

Cys	Thr	Glu	Met	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Ile	Gly	Pro	Glu
		195					200					205			

Asn	Pro	Tyr	Asn	Thr	Pro	Val	Phe	Ala	Ile	Lys	Lys	Lys	Asp	Ser	Thr
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

ES 2 549 209 A2

210		215		220
Lys Trp Arg Lys Leu Val Asp Phe Arg Glu Leu Asn Lys Arg Thr Gln				
225		230		235
Asp Phe Trp Glu Val Gln Leu Gly Ile Pro His Pro Ala Gly Leu Lys				
		245		250
Gln Lys Lys Ser Val Thr Val Leu Asp Val Gly Asp Ala Tyr Phe Ser				
		260		265
Val Pro Leu Asp Lys Asp Phe Arg Lys Tyr Thr Ala Phe Thr Ile Pro				
		275		280
Ser Ile Asn Asn Glu Thr Pro Gly Ile Arg Tyr Gln Tyr Asn Val Leu				
		290		295
Pro Gln Gly Trp Lys Gly Ser Pro Ala Ile Phe Gln Cys Ser Met Thr				
305		310		315
Lys Ile Leu Glu Pro Phe Arg Lys Gln Asn Pro Asp Ile Val Ile Tyr				
		325		330
Gln Tyr Met Asp Asp Leu Tyr Val Gly Ser Asp Leu Glu Ile Gly Gln				
		340		345
His Arg Thr Lys Ile Glu Glu Leu Arg Gln His Leu Leu Arg Trp Gly				
		355		360
Phe Thr Thr Pro Asp Lys Lys His Gln Lys Glu Pro Pro Phe Leu Trp				
		370		375
Met Gly Tyr Glu Leu His Pro Asp Lys Trp Thr Val Gln Pro Ile Val				
385		390		395
Leu Pro Glu Lys Asp Ser Trp Thr Val Asn Asp Ile Gln Lys Leu Val				
		405		410
Gly Lys Leu Asn Trp Ala Ser Gln Ile Tyr Ala Gly Ile Lys Val Arg				
		420		425
Gln Leu Cys Lys Leu Leu Arg Gly Thr Lys Ala Leu Thr Glu Val Val				
		435		440
				445

ES 2 549 209 A2

Pro Leu Thr Glu Glu Ala Glu Leu Glu Leu Ala Glu Asn Arg Glu Ile
 450 455 460

Leu Lys Glu Pro Val His Gly Val Tyr Tyr Asp Pro Ser Lys Asp Leu
 465 470 475 480

Ile Ala Glu Ile Gln Lys Gln Gly Gln Gly Gln Trp Thr Tyr Gln Ile
 485 490 495

Tyr Gln Glu Pro Phe Lys Asn Leu Lys Thr Gly Lys Tyr Ala Arg Met
 500 505 510

Lys Gly Ala His Thr Asn Asp Val Lys Gln Leu Thr Glu Ala Val Gln
 515 520 525

Lys Ile Ala Thr Glu Ser Ile Val Ile Trp Gly Lys Thr Pro Lys Phe
 530 535 540

Lys Leu Pro Ile Gln Lys Glu Thr Trp Glu Ala Trp Trp Thr Glu Tyr
 545 550 555 560

Trp Gln Ala Thr Trp Ile Pro Glu Trp Glu Phe Val Asn Thr Pro Pro
 565 570 575

Leu Val Lys Leu Trp Tyr Gln Leu Glu Lys Glu Pro Ile Ile Gly Ala
 580 585 590

Glu Thr Phe Tyr Val Asp Gly Ala Ala Asn Arg Glu Thr Lys Leu Gly
 595 600 605

Lys Ala Gly Tyr Val Thr Asp Arg Gly Arg Gln Lys Val Val Pro Leu
 610 615 620

Thr Asp Thr Thr Asn Gln Lys Thr Glu Leu Gln Ala Ile His Leu Ala
 625 630 635 640

Leu Gln Asp Ser Gly Leu Glu Val Asn Ile Val Thr Asp Ser Gln Tyr
 645 650 655

Ala Leu Gly Ile Ile Gln Ala Gln Pro Asp Lys Ser Glu Ser Glu Leu
 660 665 670

Val Ser Gln Ile Ile Glu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Lys Val Tyr Leu

ES 2 549 209 A2

675								680								685
Ala	Trp	Val	Pro	Ala	His	Lys	Gly	Ile	Gly	Gly	Asn	Glu	Gln	Val	Asp	
690						695					700					
Lys	Leu	Val	Ser	Ala	Gly	Ile	Arg	Lys	Val	Leu	Phe	Leu	Asp	Gly	Ile	
705					710					715					720	
Asp	Lys	Ala	Gln	Glu	Glu	His	Glu	Lys	Tyr	His	Ser	Asn	Trp	Arg	Ala	
				725					730					735		
Met	Ala	Ser	Asp	Phe	Asn	Leu	Pro	Pro	Val	Val	Ala	Lys	Glu	Ile	Val	
			740					745					750			
Ala	Ser	Cys	Asp	Lys	Cys	Gln	Leu	Lys	Gly	Glu	Ala	Met	His	Gly	Gln	
		755					760					765				
Val	Asp	Cys	Ser	Pro	Gly	Ile	Trp	Gln	Leu	Asp	Cys	Thr	His	Leu	Glu	
	770					775					780					
Gly	Lys	Val	Ile	Leu	Val	Ala	Val	His	Val	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ile	Glu	
785				790						795					800	
Ala	Glu	Val	Ile	Pro	Ala	Glu	Thr	Gly	Gln	Glu	Thr	Ala	Tyr	Phe	Leu	
				805					810					815		
Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Arg	Trp	Pro	Val	Lys	Thr	Val	His	Thr	Asp	Asn	
			820					825					830			
Gly	Ser	Asn	Phe	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Lys	Ala	Ala	Cys	Trp	Trp	Ala	
		835					840					845				
Gly	Ile	Lys	Gln	Glu	Phe	Gly	Ile	Pro	Tyr	Asn	Pro	Gln	Ser	Gln	Gly	
	850					855					860					
Val	Ile	Glu	Ser	Met	Asn	Lys	Glu	Leu	Lys	Lys	Ile	Ile	Gly	Gln	Val	
865					870					875					880	
Arg	Asp	Gln	Ala	Glu	His	Leu	Lys	Thr	Ala	Val	Gln	Met	Ala	Val	Phe	
				885					890					895		
Ile	His	Asn	Phe	Lys	Arg	Lys	Gly	Gly	Ile	Gly	Gly	Tyr	Ser	Ala	Gly	
		900					905						910			

ES 2 549 209 A2

Glu Arg Ile Val Asp Ile Ile Ala Thr Asp Ile Gln Thr Lys Glu Leu
 915 920 925

Gln Lys Gln Ile Thr Lys Ile Gln Asn Phe Arg Val Tyr Tyr Arg Asp
 930 935 940

Ser Arg Asp Pro Val Trp Lys Gly Pro Ala Lys Leu Leu Trp Lys Gly
 945 950 955 960

Glu Gly Ala Val Val Ile Gln Asp Asn Ser Asp Ile Lys Val Val Pro
 965 970 975

Arg Arg Lys Ala Lys Ile Ile Arg Asp Tyr Gly Lys Gln Met Ala Gly
 980 985 990

Asp Asp Cys Val Ala Ser Arg Gln Asp Glu Asp
 995 1000

<210> 3
 <211> 854
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 3

Met Arg Val Lys Glu Lys Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly Trp Lys
 1 5 10 15

Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Ile Leu Met Ile Cys Ser Ala Thr Glu
 20 25 30

Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
 35 40 45

Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 50 55 60

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 65 70 75 80

Pro Gln Glu Val Val Leu Val Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 85 90 95

Lys Asn Asp Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
 100 105 110

ES 2 549 209 A2

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Ser
 115 120 125

Leu Lys Cys Thr Asp Leu Lys Asn Asp Thr Asn Thr Asn Ser Ser Ser
 130 135 140

Gly Arg Met Ile Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn
 145 150 155 160

Ile Ser Thr Ser Ile Arg Asp Lys Val Gln Lys Glu Tyr Ala Phe Phe
 165 170 175

Tyr Lys Leu Asp Ile Val Pro Ile Asp Asn Thr Ser Tyr Arg Leu Ile
 180 185 190

Ser Cys Asn Thr Ser Val Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe
 195 200 205

Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu
 210 215 220

Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Thr Asn Val
 225 230 235 240

Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln
 245 250 255

Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Asp Val Val Ile Arg Ser
 260 265 270

Ala Asn Phe Thr Asp Asn Ala Lys Thr Ile Ile Val Gln Leu Asn Thr
 275 280 285

Ser Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser
 290 295 300

Ile Arg Ile Gln Arg Gly Pro Gly Arg Ala Phe Val Thr Ile Gly Lys
 305 310 315 320

Ile Gly Asn Met Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Arg Ala Lys Trp
 325 330 335

ES 2 549 209 A2

Asn Ala Thr Leu Lys Gln Ile Ala Ser Lys Leu Arg Glu Gln Phe Gly
 340 345 350

Asn Asn Lys Thr Ile Ile Phe Lys Gln Ser Ser Gly Gly Asp Pro Glu
 355 360 365

Ile Val Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn
 370 375 380

Ser Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Phe Asn Ser Thr Trp Ser Thr
 385 390 395 400

Glu Gly Ser Asn Asn Thr Glu Gly Ser Asp Thr Ile Thr Leu Pro Cys
 405 410 415

Arg Ile Lys Gln Phe Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Lys Ala Met
 420 425 430

Tyr Ala Pro Pro Ile Ser Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser Asn Ile Thr
 435 440 445

Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Asn Gly Ser Glu
 450 455 460

Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu
 465 470 475 480

Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu Gly Val Ala Pro
 485 490 495

Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys Arg Ala Val Gly
 500 505 510

Ile Gly Ala Leu Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met
 515 520 525

Gly Cys Thr Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser
 530 535 540

Asp Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gln
 545 550 555 560

Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys Gln Leu Gln Ala
 565 570 575

ES 2 549 209 A2

Arg Ile Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly
580 585 590

Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr Ala Val Pro Trp
595 600 605

Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Glu Gln Ile Trp Asn Asn Met
610 615 620

Thr Trp Met Glu Trp Asp Arg Glu Ile Asn Asn Tyr Thr Ser Leu Ile
625 630 635 640

His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln
645 650 655

Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe Asn
660 665 670

Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Leu Phe Ile Met Ile Val Gly
675 680 685

Gly Leu Val Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile Val Asn
690 695 700

Arg Val Arg Gln Gly Tyr Ser Pro Leu Ser Phe Gln Thr His Leu Pro
705 710 715 720

Ile Pro Arg Gly Pro Asp Arg Pro Glu Gly Ile Glu Glu Glu Gly Gly
725 730 735

Glu Arg Asp Arg Asp Arg Ser Ile Arg Leu Val Asn Gly Ser Leu Ala
740 745 750

Leu Ile Trp Asp Asp Leu Arg Ser Leu Cys Leu Phe Ser Tyr His Arg
755 760 765

Leu Arg Asp Leu Leu Leu Ile Val Thr Arg Ile Val Glu Leu Leu Gly
770 775 780

Arg Arg Gly Trp Glu Ala Leu Lys Tyr Trp Trp Asn Leu Leu Gln Tyr
785 790 795 800

ES 2 549 209 A2

Trp Ser Gln Glu Leu Lys Asn Ser Ala Val Asn Leu Leu Asn Ala Thr
805 810 815

Ala Ile Ala Val Ala Glu Gly Thr Asp Arg Val Ile Glu Val Leu Gln
820 825 830

Ala Ala Tyr Arg Ala Ile Arg His Ile Pro Arg Arg Ile Arg Gln Gly
835 840 845

Leu Glu Arg Ile Leu Leu
850

<210> 4
<211> 500
<212> PRT
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
<400> 4

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Lys Trp
1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Gln Tyr Lys Leu Lys
20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
65 70 75 80

Thr Ile Ala Val Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Asp Val Lys Asp
85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser Lys
100 105 110

Lys Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Asn Ser Gln Val
115 120 125

Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val His
130 135 140

ES 2 549 209 A2

Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Val Glu
145 150 155 160

Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu Ser
165 170 175

Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val Gly
180 185 190

Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn Glu Glu
195 200 205

Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile Ala
210 215 220

Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr Thr
225 230 235 240

Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr His Asn Pro Pro Ile
245 250 255

Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn Lys
260 265 270

Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln Gly
275 280 285

Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys Thr Leu
290 295 300

Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr
305 310 315 320

Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala
325 330 335

Leu Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly
340 345 350

Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser
355 360 365

Gln Val Thr Asn Pro Ala Thr Ile Met Ile Gln Lys Gly Asn Phe Arg

ES 2 549 209 A2

370 375 380
 Asn Gln Arg Lys Thr Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
 385 390 395 400
 Ile Ala Lys Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
 405 410 415
 Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 420 425 430
 Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
 435 440 445
 Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Glu Glu Ser Phe Arg
 450 455 460
 Phe Gly Glu Glu Thr Thr Thr Pro Ser Gln Lys Gln Glu Pro Ile Asp
 465 470 475 480
 Lys Glu Leu Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Arg Ser Leu Phe Gly Ser Asp
 485 490 495
 Pro Ser Ser Gln
 500
 <210> 5
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 5
 Met Gly Gly Lys Trp Ser Lys Ser Ser Val Ile Gly Trp Pro Ala Val
 1 5 10 15
 Arg Glu Arg Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala
 20 25 30
 Val Ser Arg Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr
 35 40 45
 Ala Ala Asn Asn Ala Ala Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu
 50 55 60

ES 2 549 209 A2

Glu Val Gly Phe Pro Val Thr Pro Gln Val Pro Leu Arg Pro Met Thr
65 70 75 80

Tyr Lys Ala Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly
85 90 95

Leu Glu Gly Leu Ile His Ser Gln Arg Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu
100 105 110

Trp Ile Tyr His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr
115 120 125

Pro Gly Pro Gly Val Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Tyr Lys
130 135 140

Leu Val Pro Val Glu Pro Asp Lys Val Glu Glu Ala Asn Lys Gly Glu
145 150 155 160

Asn Thr Ser Leu Leu His Pro Val Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro
165 170 175

Glu Arg Glu Val Leu Glu Trp Arg Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His
180 185 190

His Val Ala Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Phe Lys Asn Cys
195 200 205

<210> 6

<400> 6
000

<210> 7

<211> 116

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 7

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

Arg Leu Ile Lys Leu Leu Tyr Gln Ser Asn Pro Pro Pro Asn Pro Glu
20 25 30

Gly Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Arg
35 40 45

ES 2 549 209 A2

Gln Arg Gln Ile His Ser Ile Ser Glu Arg Ile Leu Ser Thr Tyr Leu
50 55 60

Gly Arg Ser Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu Arg
65 70 75 80

Leu Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln Gly
85 90 95

Val Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Thr Val Leu Glu Ser
100 105 110

Gly Thr Lys Glu
115

<210> 8

<211> 192

<212> PRT

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1

<400> 8

Met Glu Asn Arg Trp Gln Val Met Ile Val Trp Gln Val Asp Arg Met
1 5 10 15

Arg Ile Asn Thr Trp Lys Arg Leu Val Lys His His Met Tyr Ile Ser
20 25 30

Arg Lys Ala Lys Asp Trp Phe Tyr Arg His His Tyr Glu Ser Thr Asn
35 40 45

Pro Lys Ile Ser Ser Glu Val His Ile Pro Leu Gly Asp Ala Lys Leu
50 55 60

Val Ile Thr Thr Tyr Trp Gly Leu His Thr Gly Glu Arg Asp Trp His
65 70 75 80

Leu Gly Gln Gly Val Ser Ile Glu Trp Arg Lys Lys Arg Tyr Ser Thr
85 90 95

Gln Val Asp Pro Asp Leu Ala Asp Gln Leu Ile His Leu His Tyr Phe
100 105 110

Asp Cys Phe Ser Glu Ser Ala Ile Arg Asn Thr Ile Leu Gly Arg Ile

ES 2 549 209 A2

115	120	125
Val Ser Pro Arg Cys Glu Tyr Gln Ala Gly His Asn Lys Val Gly Ser 130 135 140		
Leu Gln Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ile Lys Pro Lys Gln Ile Lys 145 150 155 160		
Pro Pro Leu Pro Ser Val Arg Lys Leu Thr Glu Asp Arg Trp Asn Lys 165 170 175		
Pro Gln Lys Thr Lys Gly His Arg Gly Ser His Thr Met Asn Gly His 180 185 190		

<210> 9
 <211> 81
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 9

Met Gln Pro Ile Ile Val Ala Ile Val Ala Leu Val Val Ala Ile Ile 1 5 10 15	
Ile Ala Ile Val Val Trp Ser Ile Val Ile Ile Glu Tyr Arg Lys Ile 20 25 30	
Leu Arg Gln Arg Lys Ile Asp Arg Leu Ile Asp Arg Leu Ile Glu Arg 35 40 45	
Ala Glu Asp Ser Gly Asn Glu Ser Glu Gly Glu Val Ser Ala Leu Val 50 55 60	
Glu Met Gly Val Glu Met Gly His His Ala Pro Trp Asp Ile Asp Asp 65 70 75 80	

Leu

<210> 10
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1
 <400> 10

Met Glu Gln Ala Pro Glu Asp Gln Gly Pro Gln Arg Glu Pro Tyr Asn

ES 2 549 209 A2

1	5	10	15
Glu Trp Thr Leu Glu Leu Leu Glu Glu Leu Lys Ser Glu Ala Val Arg	20	25	30
His Phe Pro Arg Ile Trp Leu His Asn Leu Gly Gln His Ile Tyr Glu	35	40	45
Thr Tyr Gly Asp Thr Trp Ala Gly Val Glu Ala Ile Ile Arg Ile Leu	50	55	60
Gln Gln Leu Leu Phe Ile His Phe Arg Ile Gly Cys Arg His Ser Arg	65	70	75
Ile Gly Val Thr Arg Gln Arg Arg Ala Arg Asn Gly Ala Ser Arg Ser	85	90	95

<210> 11
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador 52EU

<400> 11
 gctataagat ggggtggcgcg gccgcaaaaa gta 33

<210> 12
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador 104ED

<400> 12
 agctggatcc gtctcgagat actgctccca ccc 33

<210> 13
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> Renilla reniformis

<400> 13

Met Thr Ser Lys Val Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr	1	5	10	15
---	---	---	----	----

ES 2 549 209 A2

Gly Pro Gln Trp Trp Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser
20 25 30

Phe Ile Asn Tyr Tyr Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile
35 40 45

Phe Leu His Gly Asn Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val
50 55 60

Pro His Ile Glu Pro Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly
65 70 75 80

Met Gly Lys Ser Gly Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp
85 90 95

His Tyr Lys Tyr Leu Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys
100 105 110

Lys Ile Ile Phe Val Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His
115 120 125

Tyr Ser Tyr Glu His Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu
130 135 140

Ser Val Val Asp Val Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu
145 150 155 160

Glu Asp Ile Ala Leu Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu
165 170 175

Glu Asn Asn Phe Phe Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg
180 185 190

Lys Leu Glu Pro Glu Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu
195 200 205

Lys Gly Glu Val Arg Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro
210 215 220

Leu Val Lys Gly Gly Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr
225 230 235 240

Asn Ala Tyr Leu Arg Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu
245 250 255

ES 2 549 209 A2

Ser Asp Pro Gly Phe Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys
 260 265 270

Phe Pro Asn Thr Glu Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln
 275 280 285

Glu Asp Ala Pro Asp Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu
 290 295 300

Arg Val Leu Lys Asn Glu Gln
 305 310

<210> 14
 <211> 1024
 <212> PRT
 <213> Escherichia coli

<400> 14

Met Thr Met Ile Thr Asp Ser Leu Ala Val Val Leu Gln Arg Arg Asp
 1 5 10 15

Trp Glu Asn Pro Gly Val Thr Gln Leu Asn Arg Leu Ala Ala His Pro
 20 25 30

Pro Phe Ala Ser Trp Arg Asn Ser Glu Glu Ala Arg Thr Asp Arg Pro
 35 40 45

Ser Gln Gln Leu Arg Ser Leu Asn Gly Glu Trp Arg Phe Ala Trp Phe
 50 55 60

Pro Ala Pro Glu Ala Val Pro Glu Ser Trp Leu Glu Cys Asp Leu Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Asp Thr Val Val Val Pro Ser Asn Trp Gln Met His Gly Tyr
 85 90 95

Asp Ala Pro Ile Tyr Thr Asn Val Thr Tyr Pro Ile Thr Val Asn Pro
 100 105 110

Pro Phe Val Pro Thr Glu Asn Pro Thr Gly Cys Tyr Ser Leu Thr Phe
 115 120 125

Asn Val Asp Glu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Gln Thr Arg Ile Ile Phe

ES 2 549 209 A2

130		135		140
Asp Gly Val Asn Ser Ala Phe His Leu Trp Cys Asn Gly Arg Trp Val				
145		150		155
Gly Tyr Gly Gln Asp Ser Arg Leu Pro Ser Glu Phe Asp Leu Ser Ala				
		165		170
				175
Phe Leu Arg Ala Gly Glu Asn Arg Leu Ala Val Met Val Leu Arg Trp				
		180		185
				190
Ser Asp Gly Ser Tyr Leu Glu Asp Gln Asp Met Trp Arg Met Ser Gly				
		195		200
				205
Ile Phe Arg Asp Val Ser Leu Leu His Lys Pro Thr Thr Gln Ile Ser				
		210		215
				220
Asp Phe His Val Ala Thr Arg Phe Asn Asp Asp Phe Ser Arg Ala Val				
225		230		235
				240
Leu Glu Ala Glu Val Gln Met Cys Gly Glu Leu Arg Asp Tyr Leu Arg				
		245		250
				255
Val Thr Val Ser Leu Trp Gln Gly Glu Thr Gln Val Ala Ser Gly Thr				
		260		265
				270
Ala Pro Phe Gly Gly Glu Ile Ile Asp Glu Arg Gly Gly Tyr Ala Asp				
		275		280
				285
Arg Val Thr Leu Arg Leu Asn Val Glu Asn Pro Lys Leu Trp Ser Ala				
		290		295
				300
Glu Ile Pro Asn Leu Tyr Arg Ala Val Val Glu Leu His Thr Ala Asp				
305		310		315
				320
Gly Thr Leu Ile Glu Ala Glu Ala Cys Asp Val Gly Phe Arg Glu Val				
		325		330
				335
Arg Ile Glu Asn Gly Leu Leu Leu Leu Asn Gly Lys Pro Leu Leu Ile				
		340		345
				350
Arg Gly Val Asn Arg His Glu His His Pro Leu His Gly Gln Val Met				
		355		360
				365

ES 2 549 209 A2

Asp Glu Gln Thr Met Val Gln Asp Ile Leu Leu Met Lys Gln Asn Asn
370 375 380

Phe Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn His Pro Leu Trp Tyr
385 390 395 400

Thr Leu Cys Asp Arg Tyr Gly Leu Tyr Val Val Asp Glu Ala Asn Ile
405 410 415

Glu Thr His Gly Met Val Pro Met Asn Arg Leu Thr Asp Asp Pro Arg
420 425 430

Trp Leu Pro Ala Met Ser Glu Arg Val Thr Arg Met Val Gln Arg Asp
435 440 445

Arg Asn His Pro Ser Val Ile Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Gly
450 455 460

His Gly Ala Asn His Asp Ala Leu Tyr Arg Trp Ile Lys Ser Val Asp
465 470 475 480

Pro Ser Arg Pro Val Gln Tyr Glu Gly Gly Gly Ala Asp Thr Thr Ala
485 490 495

Thr Asp Ile Ile Cys Pro Met Tyr Ala Arg Val Asp Glu Asp Gln Pro
500 505 510

Phe Pro Ala Val Pro Lys Trp Ser Ile Lys Lys Trp Leu Ser Leu Pro
515 520 525

Gly Glu Thr Arg Pro Leu Ile Leu Cys Glu Tyr Ala His Ala Met Gly
530 535 540

Asn Ser Leu Gly Gly Phe Ala Lys Tyr Trp Gln Ala Phe Arg Gln Tyr
545 550 555 560

Pro Arg Leu Gln Gly Gly Phe Val Trp Asp Trp Val Asp Gln Ser Leu
565 570 575

Ile Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Asn Pro Trp Ser Ala Tyr Gly Gly Asp
580 585 590

Phe Gly Asp Thr Pro Asn Asp Arg Gln Phe Cys Met Asn Gly Leu Val

ES 2 549 209 A2

595	600	605														
Phe	Ala	Asp	Arg	Thr	Pro	His	Pro	Ala	Leu	Thr	Glu	Ala	Lys	His	Gln	
610						615					620					
Gln	Gln	Phe	Phe	Gln	Phe	Arg	Leu	Ser	Gly	Gln	Thr	Ile	Glu	Val	Thr	
625					630					635					640	
Ser	Glu	Tyr	Leu	Phe	Arg	His	Ser	Asp	Asn	Glu	Leu	Leu	His	Trp	Met	
				645					650					655		
Val	Ala	Leu	Asp	Gly	Lys	Pro	Leu	Ala	Ser	Gly	Glu	Val	Pro	Leu	Asp	
			660					665					670			
Val	Ala	Pro	Gln	Gly	Lys	Gln	Leu	Ile	Glu	Leu	Pro	Glu	Leu	Pro	Gln	
		675					680					685				
Pro	Glu	Ser	Ala	Gly	Gln	Leu	Trp	Leu	Thr	Val	Arg	Val	Val	Gln	Pro	
	690					695					700					
Asn	Ala	Thr	Ala	Trp	Ser	Glu	Ala	Gly	His	Ile	Ser	Ala	Trp	Gln	Gln	
705					710					715					720	
Trp	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	His	
				725					730					735		
Ala	Ile	Pro	His	Leu	Thr	Thr	Ser	Glu	Met	Asp	Phe	Cys	Ile	Glu	Leu	
			740					745					750			
Gly	Asn	Lys	Arg	Trp	Gln	Phe	Asn	Arg	Gln	Ser	Gly	Phe	Leu	Ser	Gln	
		755					760					765				
Met	Trp	Ile	Gly	Asp	Lys	Lys	Gln	Leu	Leu	Thr	Pro	Leu	Arg	Asp	Gln	
	770					775					780					
Phe	Thr	Arg	Ala	Pro	Leu	Asp	Asn	Asp	Ile	Gly	Val	Ser	Glu	Ala	Thr	
785					790					795					800	
Arg	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Trp	Val	Glu	Arg	Trp	Lys	Ala	Ala	Gly	His	
				805					810					815		
Tyr	Gln	Ala	Glu	Ala	Ala	Leu	Leu	Gln	Cys	Thr	Ala	Asp	Thr	Leu	Ala	
			820					825					830			

ES 2 549 209 A2

Asp Ala Val Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Trp Gln His Gln Gly Lys
 835 840 845

Thr Leu Phe Ile Ser Arg Lys Thr Tyr Arg Ile Asp Gly Ser Gly Gln
 850 855 860

Met Ala Ile Thr Val Asp Val Glu Val Ala Ser Asp Thr Pro His Pro
 865 870 875 880

Ala Arg Ile Gly Leu Asn Cys Gln Leu Ala Gln Val Ala Glu Arg Val
 885 890 895

Asn Trp Leu Gly Leu Gly Pro Gln Glu Asn Tyr Pro Asp Arg Leu Thr
 900 905 910

Ala Ala Cys Phe Asp Arg Trp Asp Leu Pro Leu Ser Asp Met Tyr Thr
 915 920 925

Pro Tyr Val Phe Pro Ser Glu Asn Gly Leu Arg Cys Gly Thr Arg Glu
 930 935 940

Leu Asn Tyr Gly Pro His Gln Trp Arg Gly Asp Phe Gln Phe Asn Ile
 945 950 955 960

Ser Arg Tyr Ser Gln Gln Gln Leu Met Glu Thr Ser His Arg His Leu
 965 970 975

Leu His Ala Glu Glu Gly Thr Trp Leu Asn Ile Asp Gly Phe His Met
 980 985 990

Gly Ile Gly Gly Asp Asp Ser Trp Ser Pro Ser Val Ser Ala Glu Phe
 995 1000 1005

Gln Leu Ser Ala Gly Arg Tyr His Tyr Gln Leu Val Trp Cys Gln
 1010 1015 1020

Lys

<210> 15

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador NarI-LacZ-UP

<400> 15
 gcagtggcgc cgcgcccaat acgcaaaccg cctc 34

<210> 16
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador ApaI-lacZ-D

<400> 16
 tcctaggggc ccgccattcg ccattcaggc tgcgc 35

<210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador M-KspI-UP

<400> 17
 tacaaggac tttccgcggg ggactttcca ggga 34

<210> 18
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador M-KspI-Down

<400> 18
 tccctggaaa gtccccgcg gaaagtcct tgta 34

<210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador NotI-LacZ-UP

<400> 19
 gtggcgcggc cgcgcgccca atacgcaaac cgcctc 36

<210> 20
 <211> 35
 <212> ADN

ES 2 549 209 A2

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador KspI-LacZ-D
 <400> 20
 agtccccgc gggccattcg ccattcaggc tgcgc 35
 <210> 21
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador Mut-NcoI-Env-UP
 <400> 21
 gtagtagcaa taataatagc catggttgtg tgggtccatag taatc 45
 <210> 22
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador Mut-NcoI-Env-down
 <400> 22
 gattactatg gaccacacaa ccatggctat tattattgct actac 45
 <210> 23
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador 127
 <400> 23
 gcagtccatg ggcgcccaat acgcaaaccg cctc 34
 <210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador Not-LacZ-down
 <400> 24
 ttttgcggcc gcgccattgc ccattcaggc tgcgc 35
 <210> 25

ES 2 549 209 A2

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador Mut-AgeI-UP

 <400> 25
 gtcctattga gactgtaccg gtaaaattaa agccagcc 38

 <210> 26
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador Mut-AgeI-Down

 <400> 26
 ggctggccttt aattttaccg gtacagtctc aataggac 38

 <210> 27
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador AgeI-lacZ-D

 <400> 27
 tcctagaccg gtgccattcg ccattcaggc tgctgc 36

 <210> 28
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 107 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 560 y 584

 <400> 28
 gtgcccgtct gttgtgtgac tctg 24

 <210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 122 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 2080 y 2106

 <400> 29
 cctgtctctc agtacaatct ttca 24

ES 2 549 209 A2

<210> 30
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 163 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 621 y 648

 <400> 30
 gaaaatctct agcagtggcg cccgaacag 29

 <210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 123 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 2017 y 2042

 <400> 31
 tcctaggggc cctgcaattt ttgg 24

 <210> 32
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 119 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 8739 y 8763

 <400> 32
 acatacctag aagaataaga cagg 24

 <210> 33
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 121 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 9443 y 9467

 <400> 33
 gtcccccgcg gaaagtcct tgta 24

 <210> 34
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador 118 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 9622 y 9648

 <400> 34

gcactcaagg caagctttat tgaggc

26

<210> 35

<211> 26

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador 117 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 8678 y 8704

<400> 35

gtagctgagg ggacagatag ggttat

26

<210> 36

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador 102 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 8927 y 8950

<400> 36

ttgctacttg tgattgctcc atgt

24

<210> 37

<211> 25

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador 101 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 5852 y 5876

<400> 37

tagagccctg gaagcatcca ggaag

25

<210> 38

<211> 34

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador 161 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 8780 y 8812

<400> 38

tactttttgc ggccgcgcca cccaatctta tagc

34

<210> 39

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador 126

ES 2 549 209 A2

<400> 39
 gccatggawg tgtggacat agtawcata gaatatarg 39

<210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador 125 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 3623 y 3643

<400> 40
 acatcattag tgtgggcacc 20

<210> 41
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador 159 localizado en pNL4-3 entre los nucleótidos 3467 y 3500

<400> 41
 cactccatgt accggttctt ttagaatctc cctg 34

<210> 42
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Mut-ClaI-Up

<400> 42
 gggacagcag agatcgattt tggaaaggac cagcaaagct cc 42

<210> 43
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Mut-ClaI-Down

<400> 43
 ggagctttgc tggtcctttc caaaatcgat ctctgctgtc cc 42

<210> 44
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 549 209 A2

<220>

<223> cebador Mut-NcoI-Up

<400> 44

cccagtatta tgtgaggtcc tgaccgaaat taaaatggcc

40

<210> 45

<211> 41

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador Mut-NcoI-Down

<400> 45

ggccatttta atttcggtca ggtacctcac ataatactgg g

41