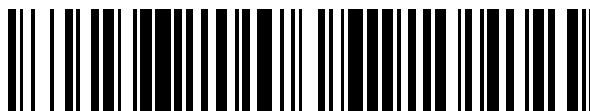


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 588 738**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.04.2009** **PCT/US2009/039656**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.10.2009** **WO09124312**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.04.2009** **E 09727698 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016** **EP 2274442**

54 Título: **Secuencias de consenso de proteínas del virus Chikungunya, moléculas de ácido nucleico que las codifican, y composiciones y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

04.04.2008 US 42661 P

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

04.11.2016

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA (100.0%)
3160 Chestnut Street, Suite 200
Philadelphia, PA 19104-6283, US**

72 Inventor/es:

**WEINER, DAVID, B. y
MUTHUMANI, KARUPPIAH**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 588 738 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Secuencias de consenso de proteínas del virus Chikungunya, moléculas de ácido nucleico que las codifican, y composiciones y métodos de uso de las mismas

Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas y a métodos de inmunización profiláctica y/o terapéutica de individuos contra el virus Chikungunya.

Antecedentes de la invención

La inmunoterapia se refiere a la modulación de las respuestas inmunes de una persona para conferir un efecto terapéutico deseable. Los agentes inmunoterapéuticos se refieren a aquellas composiciones que, cuando se administran a un individuo, modulan el sistema inmunológico del individuo lo suficiente para reducir, en última instancia, los síntomas que están asociados con respuestas inmunes no deseadas o aliviar, en última instancia, los síntomas mediante el aumento de respuestas inmunes deseadas. En algunos casos, la inmunoterapia forma parte de un protocolo de vacunación en el que un individuo recibe una vacuna que le expone a un inmunógeno contra el que el individuo genera una respuesta inmune. En dichos casos, el agente inmunoterapéutico aumenta la respuesta inmune y/o mejora selectivamente una parte de la respuesta inmune (tal como la rama celular o la rama humoral) que es deseable para tratar o prevenir la afección, infección o enfermedad en particular.

Los protocolos de vacunación se pueden mejorar mediante la administración de agentes que modulen las respuestas inmunes de una persona para inducir una mejor respuesta inmune. En algunos protocolos de vacunación en los que el individuo recibe una vacuna que le expone a un inmunógeno contra el que el individuo genera una respuesta inmune, se proporciona un agente que aumenta la respuesta inmune y/o mejora selectivamente una parte de la respuesta inmune (tal como la rama celular o la rama humoral) que es deseable para tratar o prevenir la afección, infección o enfermedad en particular.

Las vacunas son útiles para inmunizar individuos contra antígenos diana tales como alérgenos, antígenos patógenos o antígenos asociados con células implicadas en enfermedades humanas. Los antígenos asociados con células implicadas en enfermedades humanas incluyen antígenos tumorales asociados con el cáncer y antígenos asociados con células implicadas en enfermedades autoinmunes.

En el diseño de dichas vacunas, se ha reconocido que las vacunas que producen el antígeno diana en las células del individuo vacunado son eficaces para inducir la rama celular del sistema inmunológico. En concreto, las vacunas vivas atenuadas, las vacunas recombinantes que usan vectores avirulentos y las vacunas de ADN conducen cada una a la producción de antígenos en la célula del individuo vacunado, lo que produce la inducción de la rama celular del sistema inmunológico. Por otra parte, las vacunas muertas o desactivadas, y las vacunas de subunidades que solo comprenden proteínas no inducen buenas respuestas inmunes celulares, aunque sí inducen una respuesta humoral.

Normalmente, se necesita una respuesta inmune celular para proporcionar protección contra la infección por patógenos y para proporcionar una terapia eficaz mediada por la inmunidad para el tratamiento de la infección por patógenos, el cáncer o enfermedades autoinmunes. Por consiguiente, a menudo se prefieren vacunas que producen el antígeno diana en las células del individuo vacunado tales como vacunas vivas atenuadas, vacunas recombinantes que usan vectores avirulentos y vacunas de ADN.

El virus Chikungunya (CHIKV) es un alfavirus originario de África tropical y Asia, donde se transmite a los seres humanos por la picadura de los mosquitos infectados, en general del género *Aedes* [1]. La fiebre Chikungunya, la enfermedad causada por CHIKV, fue reconocida por primera vez en forma epidémica en África oriental durante 1952-1953 [2]. La infección de los seres humanos por CHIKV puede causar un síndrome caracterizado por fiebre, dolor de cabeza, sarpullido, malestar, náuseas, vómitos, mialgia, artralgia grave y manifestaciones neurológicas ocasionales tales como debilidad aguda de las extremidades. También se asocia con una afección hemorrágica letal. Otros síntomas incluyen dolores musculares y dolores retro-orbitales. La enfermedad Chikungunya rara vez es mortal, pero se asocia con una morbilidad significativa. La enfermedad Chikungunya tiene un período de incubación de aproximadamente 1-2 semanas. Se cree que el término "Chikungunya" deriva de la descripción en el dialecto local de la postura contorsionada de los pacientes afectados con el dolor grave de las articulaciones asociado con esta enfermedad [1-3].

Dado que el Chikungunya tiene potencial epidémico que puede producir una enfermedad debilitante repentina, es una amenaza potencial para el mundo en desarrollo y para el mundo desarrollado basándose en su propagación continua, suponiendo una considerable amenaza militar debido al despliegue militar en zonas de conflicto de las regiones endémicas de reciente aparición. Las infecciones por CHIKV tienen un impacto económico significativo, pues las empresas locales se ven afectadas por el absentismo en las zonas endémicas debido a los síntomas incapacitantes de esta infección en sus empleados. Este efecto económico es más elevado en los miembros de las

familias que no pueden trabajar durante semanas o meses. Debido a las secuelas de la infección debilitante, la falta de tratamiento antiviral específico y de cualquier vacuna que se pueda usar en la actualidad para evitar la enfermedad es un importante impedimento para el tratamiento o el control de los nuevos brotes de CHIKV.

El CHIKV se transmite por la picadura de un mosquito infectado. Los mosquitos se infectan cuando se alimentan de las personas infectadas por el CHIKV. Los monos, y posiblemente otros animales salvajes, también se pueden infectar, pero su papel como reservorios del CHIKV todavía no está documentado. Los mosquitos infectados pueden transmitir el virus a otros seres humanos cuando pican. *Aedes aegypti* (el mosquito de la fiebre amarilla), que se cría en los recipientes domésticos y pica de manera agresiva durante el día, atraído por los seres humanos, es el vector principal del CHIKV hacia los seres humanos. *Aedes albopictus* (el mosquito tigre) también puede participar en la transmisión humana en Asia, y se han encontrado diversas especies de mosquitos que habitan en los bosques de África que están infectados con el virus [11-17]. Dado que las epidemias de fiebre CHIK son mantenidas por la transmisión de seres humanos-mosquitos-seres humanos, el ciclo epidémico es similar al del dengue y al de la fiebre amarilla urbana. Recientemente, se ha informado de grandes brotes de fiebre CHIK sobre varias islas del Océano Índico y en India [4-7].

Desde finales de 2004, el virus Chikungunya ha resurgido con grandes brotes en diversas partes del mundo, predominantemente en las islas del Océano Índico. A principios de 2006, tras un período de transmisión más baja durante el invierno y con la llegada del verano en el hemisferio sur, la Isla de la Reunión sufrió un brote explosivo. Se informó de una estimación de 266.000 habitantes (población de 770.000) infectados con el CHIKV, y la concesión de 248 certificados de defunción con el CHIKV como la posible causa del fallecimiento [10,12]. Se ha documentado la evidencia de infección intrauterina en mujeres embarazadas y la transmisión vertical [12,13,17]. El análisis de la secuencia ha revelado la existencia de linajes agrupados geográficamente del virus. Los análisis filogenéticos basados en secuencias E1 parciales revelaron la existencia de tres filogrupos distintos para el CHIKV: uno con los aislados de África Occidental, otro incluyendo los aislados asiáticos, y un reagrupamiento de los aislados de África Oriental, África Central y Sudáfrica [15,17].

En 2006, también se informó de casos de fiebre CHIK en personas que habían regresado de zonas de brotes conocidos a Europa, Canadá, el Caribe (Martinica) y América del Sur (Guyana francesa) [5-9]. Durante el período 2005-2006, se diagnosticaron serológicamente y virológicamente 12 casos de fiebre CHIK en CDC (EE.UU.) en personas que habían llegado a Estados Unidos desde zonas conocidas por su carácter epidémico o endémico para la fiebre CHIK [10].

Estas infecciones han causado crisis de salud pública y han captado la atención de los investigadores en todo el mundo. Es importante destacar que la mayoría de las infecciones por el virus Chikungunya se curan por completo en cuestión de semanas o meses. No obstante, ha habido casos documentados de artralgia inducida por el CHIKV persistente durante varios años que ha generado problemas crónicos de las articulaciones. El hecho de que la infección se cure tras un largo período de tiempo apoya la idea de que el sistema inmunológico se puede recuperar para controlar esta infección con el tiempo. Además, dicho fenotipo de aclaramiento apoya un papel en el aclaramiento de la respuesta de los linfocitos T. Los primeros intentos para desarrollar vacunas contra el Chikungunya tales como la vacuna muerta de formalina, la vacuna de virus inactivado con éter/Tween y vacunas vivas atenuadas tuvieron un éxito moderado, pero se interrumpieron por varias razones [3]. Además, se informó que todas estas vacunas solo producían una respuesta serológica sin inducción de una inmunidad celular útil.

La frecuencia de las recientes epidemias en las islas del Océano Índico y la Isla de la Reunión sugiere que, tal vez, sea un nuevo vector el que porte el virus, dado que *Aedes aegypti* no se encuentra allí. De hecho, un pariente, el mosquito tigre asiático, *Aedes albopictus*, puede ser el culpable de la preocupación generada en la comunidad sanitaria mundial con respecto a la posibilidad de una pandemia producida por el virus CHIK.

Por consiguiente, se deben adoptar medidas para desarrollar métodos de control del CHIKV. Por desgracia, en la actualidad, no existe un tratamiento específico para el virus Chikungunya ni se dispone de una vacuna. Recientemente, algunos estudios han demostrado que una mutación A226V en la envoltura E1 es directamente responsable de un aumento significativo en la infectividad del CHIKV por *Aedes albopictus*, y aún más confirmado que la sustitución de un solo aminoácido puede influir en la especificidad del vector. Este hallazgo proporciona una explicación plausible de cómo este virus mutante causó una epidemia en una región que carecía del insecto que comúnmente servía como vector [18]. No hay vacuna ni tratamiento antiviral específicos para el Chikungunya. En 2000, se llevaron a cabo ensayos con vacunas atenuadas vivas, pero se retiró la financiación para el proyecto y, en la actualidad, no se dispone de vacuna. Sin embargo, se han documentado bien varios acontecimientos adversos asociados con esta vacuna previa, y por lo tanto, se han de desarrollar nuevas estrategias de vacunación [3,5].

La mera magnitud de los brotes del Chikungunya en 2005-2007 pone de relieve la necesidad de una vacuna segura y eficaz contra el CHIKV [6]. Sigue existiendo la necesidad de una vacuna que pueda impedir que las personas sufran la infección por el CHIKV. Sigue existiendo la necesidad de tratamientos que sean eficaces para tratar a individuos que tengan la infección por CHIKV.

Sumario de la invención

La materia objeto para la que se busca protección se define en las reivindicaciones.

- 5 En particular, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 13;

una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 15;

- 10 una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 250 aminoácidos;

una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 250 aminoácidos y que comprende además una secuencia líder de IgE;

- 15 una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 210 aminoácidos;

una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 210 aminoácidos y que comprende además una secuencia líder de IgE;

- 20 una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 125 aminoácidos; y

una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 125 aminoácidos y que comprende además una secuencia líder de IgE.

- 25 La presente invención también proporciona composiciones que comprenden moléculas de ácido nucleico de la invención.

- 30 La presente invención proporciona además vacunas recombinantes que comprenden un ácido nucleico de la invención.

La invención proporciona además composiciones y vacunas de la invención para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un individuo contra el CHIKV.

- 35 Breve descripción de las figuras

- Figura 1: (A) Representación esquemática de la estrategia de clonación del gen de fusión CHIKV líder de IgE en el vector pVax1. (B) Fotografía de gel de agarosa que muestra la banda específica lineal del plásmido CHIKV (envoltura E1, E2 y cápside) indicada (carril 4) con la digestión doble de Kpn1 y Not1 que produjo el tamaño de

- 40 1.403 pb, 1.355 pb y 869 pb, respectivamente.
- Figura 2: Caracterización de construcciones de CHIKV. (A) Muestra la traducción *in vitro* marcada con S³⁵ de la construcción sintetizada. Los antígenos CHIKV-E1, CHIKV-E2 y CHIKV-cápside se tradujeron y se inmunoprecipitaron usando los anticuerpos específicos de E1, E2 y cápside respectivamente, y se desarrollaron en un gel de SDS al 12 % y se sometieron a análisis radiográfico. El antígeno se desarrolla en su peso molecular predicho, confirmando la expresión. (B) Análisis de transferencia Western de la construcción CHIKV-E1 y CHIKV-cápside en células BHK-21. Dos días después de la transfección, se prepararon los lisados de células transfectados, y la inmunotransferencia con antisuero CHIKV-E1 policlonal, que se generó en ratones, muestra la expresión de la proteína E1 de 52 kDa y 36 kDa para la proteína de cápside.

- Figura 3: ELISA de anticuerpos. (A), (B) y (C) Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces, cada 2 semanas, con 25 µg de vector pVax1 o plásmidos CHIKV como se indica, y se sacrificaron 1 semana más tarde. Se extrajo suero y se sometió al análisis de la producción total de IgG contra CHIKV-E1, CHIKV-E2 o CHIKV-cápside. El suero se incubó durante 1 h a 37 °C en placas de 96 pocillos recubiertas con 2 µg/ml de los respectivos péptidos CHIKV, y el anticuerpo se detectó usando IgG-HRP anti-ratón. Los valores representan la media (± D.T.) de los pocillos por duplicado.

- Figura 4: Respuesta del interferón-γ a la envoltura E1 mediante ELISpot. Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces, cada 2 semanas, con 25 µg del vector pVax1 o pCHIKV-E1, y se sacrificaron 1 semana más tarde. (A) Se recogieron los esplenocitos y se cultivaron durante la noche en presencia de R10 (control negativo) o 10 µg/ml de uno de los cuatro grupos de péptidos, compuestos de péptidos 15-meros superpuestos en 9 aminoácidos, que abarcaban la longitud de la proteína E1. Las respuestas a CHIKV-E1 se muestran como respuestas medias de los grupos apilados. (B) Se recogieron los esplenocitos y se cultivaron durante la noche en presencia de R10 (control negativo) o 10 µg/ml de uno de los dieciocho grupos de péptidos, compuestos de péptidos 15-meros superpuestos en 9 aminoácidos, que abarcaban la longitud de la proteína E1 de la matriz. Se cuantificaron las unidades formadoras de manchas (UFM) con un lector de ELISpot automatizado, y los valores en bruto se normalizaron a UFM por millón de esplenocitos. Los valores representan la media de los pocillos por triplicado.

- Figura 5: Respuesta del interferón-γ a la envoltura E2 de CHIKV mediante ELISpot. Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces, cada 2 semanas, con 25 µg del vector pVax1 o pCHIKV-E2, y se sacrificaron 1 semana más

tarde. (A) Se recogieron los esplenocitos y se cultivaron durante la noche en presencia de R10 (control negativo) o 10 µg/ml de uno de los cuatro grupos de péptidos, compuestos de péptidos 15-meros superpuestos en 9 aminoácidos, que abarcaban la longitud de la proteína E2. Las respuestas a CHIKV-E2 se muestran como respuestas medias de los grupos apilados. (B) Se recogieron los esplenocitos y se cultivaron durante la noche en presencia de R10 (control negativo) o 10 µg/ml de uno de los dieciocho grupos de péptidos, compuestos de péptidos 15-meros superpuestos en 9 aminoácidos, que abarcaban la longitud de la proteína E1 de la matriz. Se cuantificaron las unidades formadoras de manchas (UFM) con un lector de ELISpot automatizado, y los valores en bruto se normalizaron a UFM por millón de esplenocitos. Los valores representan la media de los pocillos por triplicado.

Figura 6: Respuesta del interferón-γ a la cápside de CHIKV mediante ELISpot. Se inmunizaron ratones C57BL/6 dos veces, cada 2 semanas, con 25 µg del vector pVax1 o pCHIKV-cápside, y se sacrificaron 1 semana más tarde. (A) Se recogieron los esplenocitos y se cultivaron durante la noche en presencia de R10 (control negativo) o 10 µg/ml de uno de los cuatro grupos de péptidos, compuestos de péptidos 15-meros superpuestos en 9 aminoácidos, que abarcaban la longitud de la proteína de cápside. Las respuestas a CHIKV-cápside se muestran como respuestas medias de los grupos apilados. (B) Se recogieron los esplenocitos y se cultivaron durante la noche en presencia de R10 (control negativo) o 10 µg/ml de uno de los dieciocho grupos de péptidos, compuestos de péptidos 15-meros superpuestos en 9 aminoácidos, que abarcaban la longitud de la proteína de cápside de la matriz. Se cuantificaron las unidades formadoras de manchas (UFM) con un lector de ELISpot automatizado, y los valores en bruto se normalizaron a UFM por millón de esplenocitos. Los valores representan la media de los pocillos por triplicado.

Figura 7: gráfico que muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes de sueros de pacientes y del individuo sano (no tratado previamente) hacia el virus Chikungunya medidos usando el ensayo descrito en el Ejemplo 2.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Como se usa en el presente documento, "fragmento inmunogénico de consenso" se refiere a un fragmento de una proteína CHIKV de consenso que incluye secuencias de consenso suficientes para conferir protección cruzada contra dos o más cepas de CHIKV que no se produce cuando se usa una secuencia nativa correspondiente. En general, los fragmentos son de 10 o más aminoácidos de longitud. Algunas longitudes preferidas de E1 de CHIKV son de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 105, al menos 110, al menos 115, al menos 120, al menos 125, al menos 130, al menos 135, al menos 140, al menos 145, al menos 150, al menos 155, al menos 160, al menos 165, al menos 170, al menos 175, al menos 180, al menos 185, al menos 190, al menos 195, al menos 200, al menos 205, al menos 210, al menos 215, al menos 220, al menos 225, por lo menos 230, al menos 235, al menos 240, al menos 245, al menos 250, al menos 255, al menos 260, al menos 265, al menos 270, al menos 275, al menos 280, al menos 285, al menos 290, al menos 295, al menos 300, al menos 305, al menos 310, al menos 315, al menos 320, al menos 325, al menos 330, al menos 335, al menos 340, al menos 345, al menos 350, al menos 355, al menos 360, al menos 365, al menos 370, al menos 375, al menos 380, al menos 385, al menos 390, al menos 395, al menos 400, al menos 405, al menos 410, al menos 415, al menos 420, al menos 425 o al menos 430. Algunas longitudes preferidas de E1 de CHIKV son de 15 o menos, 20 o menos, 25 o menos, 30 o menos, 35 o menos, 40 o menos, 45 o menos, 50 o menos, 55 o menos, 60 o menos, 65 o menos, 70 o menos, 75 o menos, 80 o menos, 85 o menos, 90 o menos, 95 o menos, 100 o menos, 105 o menos, 110 o menos, 115 o menos, 120 o menos, 125 o menos, 130 o menos, 135 o menos, 140 o menos, 145 o menos, 150 o menos, 155 o menos, 160 o menos, 165 o menos, 170 o menos, 175 o menos, 180 o menos, 185 o menos, 190 o menos, 195 o menos, 200 o menos, 205 o menos, 210 o menos, 215 o menos, 220 o menos, 225 o menos, 230 o menos, 235 o menos, 240 o menos, 245 o menos, 250 o menos, 255 o menos, 260 o menos, 265 o menos, 270 o menos, 275 o menos, 280 o menos, 285 o menos, 290 o menos, 295 o menos, 300 o menos, 305 o menos, 310 o menos, 315 o menos, 320 o menos, 325 o menos, 330 o menos, 335 o menos, 340 o menos, 345 o menos, 350 o menos, 355 o menos, 360 o menos, 365 o menos, 370 o menos, 375 o menos, 380 o menos, 385 o menos, 390 o menos, 395 o menos, 400 o menos, 415 o menos, 420 o menos, 425 o menos, 430 o menos o 435 o menos. Algunas longitudes preferidas de E2 de CHIKV son de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 105, al menos 110, al menos 115, al menos 120, al menos 125, al menos 130, al menos 135, al menos 140, al menos 145, al menos 150, al menos 155, al menos 160, al menos 165, al menos 170, al menos 175, al menos 180, al menos 185, al menos 190, al menos 195, al menos 200, al menos 205, al menos 210, al menos 215, al menos 220, al menos 225, al menos 230, al menos 235, al menos 240, al menos 245, al menos 250, al menos 255, al menos 260, al menos 265, al menos 270, al menos 275, al menos 280, al menos 285, al menos 290, al menos 295, al menos 300, al menos 305, al menos 310, al menos 315, al menos 320, al menos 325, al menos 330, al menos 335, al menos 340, al menos 345, al menos 350, al menos 355, al menos 360, al menos 365, al menos 370, al menos 375, al menos 380, al menos 385, al menos 390, al menos 395, al menos 400, al menos 405, al menos 410, al menos 415 o al menos 420. Algunas longitudes preferidas de E2 de CHIKV son de 15 o menos, 20 o menos, 25 o menos, 30 o menos, 35 o menos, 40 o menos, 45 o menos, 50 o menos, 55 o menos, 60 o menos, 65 o menos, 70 o menos, 75 o menos, 80 o menos, 85 o menos, 90 o menos, 95 o menos, 100 o menos, 105 o menos, 110 o menos, 115 o menos, 120 o menos, 125 o menos, 130 o menos, 135 o menos, 140 o menos, 145 o menos, 150 o menos, 155 o menos, 160 o menos, 165 o menos, 170 o menos, 175 o

menos, 180 o menos, 185 o menos, 190 o menos, 195 o menos, 200 o menos, 205 o menos, 210 o menos, 215 o menos, 220 o menos, 225 o menos, 230 o menos, 235 o menos, 240 o menos, 245 o menos, 250 o menos, 255 o menos, 260 o menos, 265 o menos, 270 o menos, 275 o menos, 280 o menos, 285 o menos, 290 o menos, 295 o menos, 300 o menos, 305 o menos, 310 o menos, 315 o menos, 320 o menos, 325 o menos, 330 o menos, 335 o menos, 340 o menos, 345 o menos, 350 o menos, 355 o menos, 360 o menos, 365 o menos, 370 o menos, 375 o menos, 380 o menos, 385 o menos, 390 o menos, 395 o menos, 400 o menos, 415 o menos, 422 o menos. Algunas longitudes preferidas de la cápside de CHIKV son de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35, al menos 40, al menos 45, al menos 50, al menos 55, al menos 60, al menos 65, al menos 70, al menos 75, al menos 80, al menos 85, al menos 90, al menos 95, al menos 100, al menos 105, al menos 110, al menos 115, al menos 120, al menos 125, al menos 130, al menos 135, al menos 140, al menos 145, al menos 150, al menos 155, al menos 160, al menos 165, al menos 170, al menos 175, al menos 180, al menos 185, al menos 190, al menos 195, al menos 200, al menos 205, al menos 210, al menos 215, al menos 220, al menos 225, al menos 230, al menos 235, al menos 240, al menos 245, al menos 250 o al menos 255. Algunas longitudes preferidas de la cápside de CHIKV son de 15 o menos, 20 o menos, 25 o menos, 30 o menos, 35 o menos, 40 o menos, 45 o menos, 50 o menos, 55 o menos, 60 o menos, 65 o menos, 70 o menos, 75 o menos, 80 o menos, 85 o menos, 90 o menos, 95 o menos, 100 o menos, 105 o menos, 110 o menos, 115 o menos, 120 o menos, 125 o menos, 130 o menos, 135 o menos, 140 o menos, 145 o menos, 150 o menos, 155 o menos, 160 o menos, 165 o menos, 170 o menos, 175 o menos, 180 o menos, 185 o menos, 190 o menos, 195 o menos, 200 o menos, 205 o menos, 210 o menos, 215 o menos, 220 o menos, 225 o menos, 230 o menos, 235 o menos, 240 o menos, 245 o menos, 250 o menos, 255 o menos o 260 o menos. Como se usa en el párrafo del presente documento, las referencias a tamaños de fragmentos preferidos que pretenden referirse a toda permutación de los intervalos entre al menos y menos de dichos intervalos pueden ser cualquier número expuesto como "al menos" un tamaño a cualquier número expuesto como un tamaño "inferior a" para proporcionar un intervalo de tamaños, tal como 20-400, 20-30, 40-100, etc. Los fragmentos usados en la invención son como se especifican en las reivindicaciones.

Como se usa en el presente documento, la expresión "construcción genética" se refiere moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína diana o una proteína inmunomoduladora. La secuencia de codificación incluye señales de inicio y terminación unidas operativamente a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células del individuo a quien se administra la molécula de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "forma expresable" se refiere a construcciones génicas que contienen los elementos reguladores necesarios unidos operativamente a una secuencia de codificación que codifica una proteína diana o una proteína inmunomoduladora, de modo que cuando está presente en la célula del individuo, se expresará la secuencia de codificación.

Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una molécula de ácido nucleico se hibridará a otra molécula de ácido nucleico, pero no a otras secuencias. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en distintas circunstancias. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5 °C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para una determinada secuencia a una fuerza iónica y un pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, un pH y una concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Dado que, en general, las secuencias diana están presentes en exceso, a la T_m, el 50 % de las sondas se ocupa en equilibrio. Por lo general, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,0 M de ion sodio, normalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de ion sodio (u otras sales) a pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para las sondas, los cebadores o los oligonucleótidos cortos (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para las sondas, los cebadores o los oligonucleótidos más largos. Las condiciones rigurosas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como la formamida.

Como se usa en el presente documento, "homólogas" se refiere a la homología de secuencias entre dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácidos. Dos secuencias de ácido nucleico o dos secuencias de aminoácidos que son suficientemente homólogas para conservar la función inmunogénica son "homólogas". La homología de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se puede determinar usando FASTA, BLAST y BLAST con huecos (Altschul *et al.*, *Nuc. Acids Res.*, 1997, 25, 3389) y el software PAUP* 4.0b10 (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). El "porcentaje de similitud" se calcula usando el software PAUP* 4.0b10 (D. L. Swofford, Sinauer Associates, Massachusetts). La similitud media de la secuencia de consenso se calcula en comparación con todas las secuencias del árbol filogenético. En resumen, el algoritmo BLAST, que significa herramienta de búsqueda de alineamiento local básica es adecuado para determinar la similitud de secuencias (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 1990, 215, 403-410). El software para realizar el análisis BLAST está a disposición del público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica primero la identificación del par de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que bien coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al

umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul *et al.*, *Supra*). Estos aciertos iniciales de palabra vecina actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar los HSP que los contienen. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como se pueda aumentar la puntuación acumulada de alineamiento. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: 1) la puntuación de alineación acumulativa disminuye en la cantidad X con respecto a su valor máximo alcanzado; 2) la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o 3) se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1992, 89, 10915-10919), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST (Karlin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 1993, 90, 5873-5787) y BLAST con huecos realizan un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña (P(N)), que indica la probabilidad a la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a otro si la probabilidad de suma más pequeña en la comparación del ácido nucleico de ensayo con el otro ácido nucleico es inferior a aproximadamente 1, preferentemente inferior a aproximadamente 0,1, más preferentemente inferior a aproximadamente 0,01, y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 0,001.

En algunas realizaciones, se proporciona una vacuna de ADN para CHIKV que se puede usar para inmunizar individuos. La vacuna induce inmunidad tanto humoral como celular *in vivo*.

De acuerdo con algunas realizaciones, para desarrollar un inmunógeno con la capacidad de inducir respuestas inmunes de reactividad cruzada contra el virus Chikungunya (CHIKV), los presentes inventores diseñaron construcciones de consenso contra la proteína de envoltura E1 y E2, y la proteína de cápside del núcleo del virus CHIKV. Para estas construcciones, se seleccionaron 21 secuencias entre los virus Chikungunya aislados entre 1952 y 2006 que causaron la infección y la muerte en seres humanos. Las secuencias de ADN escogidas para cada gen eran de la cepa S27 (primer aislado) y de cepas de diversos países, incluyendo aislados del brote de la isla de La Reunión para evitar el sesgo del muestreo. Se alinearon las secuencias de ADN, y se escogió el nucleótido más común de cada posición para la secuencia sintética. Se usaron las secuencias de aminoácidos deducidas para guiar la introducción de huecos de alineamiento de modo que se introdujeran entre los codones que mantenían el marco de lectura. Tras la generación de las secuencias de consenso, se añadió una secuencia líder de IgE al extremo N-terminal para mejorar la expresión y la secreción, se optimizó la construcción mediante la optimización de codones y el reemplazo de la secuencia de Kozak existente por una secuencia más fuerte (GCCGCCACC) (Fig. 1 A). Para el análisis, se añadió un marcador de His al extremo C-terminal tanto de E1 como de la cápside para verificar la expresión. A continuación, se produjeron estas construcciones en bacterias y se purificaron como se ha descrito anteriormente para los estudios de análisis, expresión e inmunogenicidad [21]. La Fig. 1B representa la electroforesis en gel de agarosa de las construcciones que codifican ADN de la envoltura E1 y E2, y de la cápside.

De acuerdo con otra realización, se diseñó una construcción de consenso quimérica contra cada envoltura E1, E2 y E3 del virus CHIKV. Para estas construcciones, se generaron secuencias de consenso de cada una de E1, E2 y E3, y cada secuencia de consenso se enlazó con otra, preferentemente con una secuencia codificante de un sitio de escisión de la proteasa. Además, se añadió una secuencia líder de IgE al extremo N-terminal para mejorar la expresión y la secreción.

En realizaciones preferidas, las construcciones incluyen las secuencias de codificación del CHIKV enlazadas a la secuencia líder de IgE. Sin embargo, en algunas realizaciones, las secuencias de codificación del CHIKV no están enlazadas a la secuencia líder de IgE, sino que, opcionalmente, pueden estar enlazadas a una secuencia líder diferente.

SEQ ID NO: 1 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína E1 del CHIKV de consenso unida a una secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 2 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína E2 del CHIKV de consenso unida a una secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 3 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de cápside del CHIKV de consenso unida a una secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 4 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína E1 del CHIKV de consenso correspondiente a SEQ ID NO: 1, pero sin la secuencia de codificación de la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 5 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína E2 del CHIKV de consenso correspondiente a SEQ ID NO: 2, pero sin la secuencia de codificación de la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 6 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de cápside del CHIKV de consenso correspondiente a SEQ ID NO: 3, pero sin la secuencia de codificación de la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 7 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1 que es la proteína E1 del CHIKV de consenso con la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 8 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 2 que es la proteína E2 del CHIKV de consenso con la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 9 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 3 que es la proteína de

cápside del CHIKV de consenso con la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 10 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 4 que es la proteína E1 del CHIKV de consenso sin la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 11 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 5 que es la proteína E2 del CHIKV de consenso sin la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 12 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 6 que es la proteína de cápside del CHIKV de consenso sin la secuencia líder de IgE.

SEQ ID NO: 13 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica Env de consenso, que es secuencia de Kozak-secuencia líder de IgE-secuencia de codificación de CHIKV-E3-sitio de escisión-secuencia de codificación de CHIKV-E2-sitio de escisión-secuencia de codificación de CHIKV-E1-señal de detención-señal de detención.

SEQ ID NO: 14 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada SEQ ID NO: 13, que es la secuencia de la proteína Env de consenso que es secuencia líder de IgE-CHIKV-E3-sitio de escisión-CHIKV-E2-sitio de escisión-secuencia de codificación de CHIKV-E1.

SEQ ID NO: 15 se refiere a una secuencia de nucleótidos que codifica Env de consenso correspondiente a SEQ ID NO: 13, pero sin la secuencia líder de IgE, es decir, secuencia de codificación de CHIKV-E3-sitio de escisión-secuencia de codificación de CHIKV-E2-sitio de escisión-secuencia de codificación de CHIKV-E1-señal de detención-señal de detención.

SEQ ID NO: 16 se refiere a la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 15, que es la secuencia de la proteína Env de consenso sin la secuencia líder de IgE, es decir, CHIKV-E3-sitio de escisión-CHIKV-E2-sitio de escisión-secuencia de codificación de CHIKV-E1.

SEQ ID NO: 17 se refiere a la secuencia de aminoácidos de la secuencia líder de IgE. GCCGCCACC es una secuencia de Kozak preferida.

Cuando las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de consenso son absorbidas por las células del individuo, las secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de consenso se expresan en las células, y, por lo tanto, las proteínas se administran al individuo. Los aspectos de la divulgación proporcionan métodos de administración de las secuencias de codificación de las proteínas de consenso sobre un plásmido; o como parte de vacunas recombinantes y como parte de las vacunas atenuadas.

De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones y usos que inmunizan profiláctica y/o terapéuticamente a un individuo contra el CHIKV. La vacuna puede ser cualquier tipo de vacuna tal como una vacuna viva atenuada, una vacuna recombinante, o una vacuna de ácido nucleico o de ADN.

En algunas realizaciones, la vacuna comprende una, dos o las tres proteínas de consenso. En algunas realizaciones, la vacuna comprende secuencias de codificación de dos proteínas de consenso de la misma molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la vacuna comprende secuencias de codificación de dos proteínas de consenso de dos moléculas de ácido nucleico diferentes. En algunas realizaciones, la vacuna comprende secuencias de codificación de tres proteínas de consenso de la misma molécula de ácido nucleico. En algunas realizaciones, la vacuna comprende secuencias de codificación de tres proteínas de consenso, en la que las secuencias de codificación de dos están en la misma molécula de ácido nucleico y las secuencias de codificación de la tercera están en una segunda molécula de ácido nucleico. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico comprende las secuencias de codificación de E1 y E2, y la otra comprende secuencias de codificación de la cápside; o una molécula de ácido nucleico comprende secuencias de codificación de E1 y de la cápside, y la otra comprende secuencias de codificación de E2, o una molécula de ácido nucleico comprende las secuencias de codificación de E2 y la cápside, y la otra comprende secuencias de codificación de E1. En algunas realizaciones, la vacuna comprende secuencias de codificación de tres proteínas de consenso en las que hay tres moléculas de ácido nucleico diferentes y cada una comprende una secuencia de codificación diferente.

En algunas realizaciones, la secuencia de codificación de E1 de consenso que incluye la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la secuencia de codificación de E1 de consenso sin la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 4. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso con la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 7 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso es SEQ ID NO: 10 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso con la secuencia líder de IgE es un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % homóloga a SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso sin secuencia líder de IgE es un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % homóloga a SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, la secuencia de codificación de E2 de consenso que incluye la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, la secuencia de codificación de E2 de consenso sin la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la proteína E2 de consenso con la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 8 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína E2 de consenso es SEQ ID NO: 11 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína E2 de consenso con la secuencia líder de IgE es un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % homóloga a SEQ ID NO: 7. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso sin secuencia líder de IgE es un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % homóloga a SEQ ID NO: 11. En algunas realizaciones, la secuencia de codificación de la cápside de consenso que incluye la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, la secuencia de codificación de E1 de consenso sin la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 6. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso con la secuencia líder de IgE es SEQ ID NO: 9 o un fragmento de la misma. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso es SEQ ID NO: 12 o un fragmento de

la misma. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso con la secuencia líder de IgE es un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % homóloga a SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la proteína E1 de consenso sin secuencia líder de IgE es un 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % homóloga a SEQ ID NO: 12.

5 Puede haber múltiples genes en una sola molécula de ácido nucleico o múltiples moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico comprende secuencias de codificación de E1 y E2, y la otra comprende secuencias de codificación de la cápside; o una molécula de ácido nucleico comprende secuencias de codificación de E1 y la cápside, y la otra comprende secuencias de codificación de E2, o una molécula de ácido nucleico comprende secuencias de codificación de E2 y la cápside, y la otra comprende secuencias de codificación de E1. En
10 algunas realizaciones, la vacuna comprende secuencias de codificación de tres proteínas de consenso en las que hay tres moléculas de ácido nucleico diferentes, y cada una comprende una secuencia de codificación diferente. La vacuna puede comprender una combinación de dos o más secuencias de consenso para E1, E2 y la cápside.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una Env de consenso del CHIKV que comprende E1, E2 y E3 unidas entre sí como un único gen quimérico. En algunas realizaciones, las secuencias de consenso individuales están unidas entre sí con secuencias que codifican un sitio de escisión de la proteasa. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende fragmentos de cada una de E1, E2 y E3, de modo que la expresión del gen quimérico en un individuo genera una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que
20 la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 95 %
25 homóloga a SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 98 % homóloga a SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 99 %
30 homóloga a SEQ ID NO: 13 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende SEQ ID NO: 15 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada uno de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 15 o un fragmento de la misma que comprende suficientes
35 secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 95 % homóloga a SEQ ID NO: 15 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 98 % homóloga a SEQ ID NO: 15 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, el gen quimérico comprende una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 99 %
40 homóloga a SEQ ID NO: 15 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias para que la expresión de la proteína en un individuo genere una respuesta inmunitaria contra cada uno de E1, E2 y E3.

En algunas realizaciones, las vacunas comprenden una Env del CHIKV de consenso que codifica secuencias de aminoácidos de consenso para E1, E2 y E3 unidas entre sí. En algunas realizaciones, las secuencias de consenso individuales están unidas entre sí con secuencias que codifican un sitio de escisión de la proteasa. En algunas
50 realizaciones, el gen quimérico codifica fragmentos de cada una de E1, E2 y E3, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende la SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma que comprende suficientes secuencias, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas
55 realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % homóloga a SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas
60 realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % homóloga a SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas
65 realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % homóloga a SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas

de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % homóloga a SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % homóloga a SEQ ID NO: 16 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 16 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % homóloga a SEQ ID NO: 16 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % homóloga a SEQ ID NO: 16 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3. En algunas realizaciones, la proteína Env del CHIKV de consenso comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 99 % homóloga a SEQ ID NO: 14 o un fragmento de la misma, siendo las secuencias de aminoácidos codificadas de ese modo inmunogénicas e inductoras de una respuesta inmunitaria contra cada una de E1, E2 y E3.

Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse usando cualquiera de varias tecnologías bien conocidas, incluyendo la inyección de ADN (también denominada vacunación de ADN), vectores recombinantes tales como adenovirus recombinante, virus asociado a adenovirus recombinante y virus vaccinia recombinante.

Las vacunas de ADN se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.593.972, 5.739.118, 5.817.637, 5.830.876, 5.962.428, 5.981.505, 5.580.859, 5.703.055, 5.676.594, y las solicitudes prioritarias citadas en las mismas. Además de los protocolos de administración descritos en estas solicitudes, en las patentes de EE.UU. n.º 4.945.050 y 5.036.006, se describen métodos alternativos de administración de ADN.

Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, la vía intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intraocular y oral, así como la vía tópica, transdérmica, por inhalación o supositorio, o al tejido mucoso tal como mediante lavado del tejido vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual. Las vías preferidas de administración incluyen inyección en el tejido mucoso, intramuscular, intraperitoneal, intradérmica y subcutánea. Las construcciones genéticas pueden administrarse por medios que incluyen, pero sin limitación, jeringas tradicionales, dispositivos de inyección sin aguja o "pistolas génicas de bombardeo de microproyectiles".

Según lo descrito en las patentes de EE.UU. n.º 5.273.525, 5.439.440, 5.702.359, 5.810.762, 5.993.434, 6.014.584, 6.055.453, 6.068.650, 6.110.161, 6.120.493, 6.135.990, 6.181.964, 6.216.034, 6.233.482, 6.241.701, 6.347.247, 6.418.341, 6.451.002, 6.516.223, 6.567.694, 6.569.149, 6.610.044, 6.654.636, 6.678.556, 6.697.669, 6.763.264, 6.778.853, 6.865.416, 6.939.862 y 6.958.060, otra vía de administración implica el uso de la electroporación para administrar la construcción genética.

Los ejemplos de dispositivos de electroporación y métodos de electroporación preferidos para facilitar la administración de las vacunas de ADN incluyen los descritos en la patente de EE.UU. n.º 7.245.963 de Draghia-Akli, *et al.*, la publicación de patente de EE.UU. 2005/0052630 presentada por Smith, *et al.* También se prefieren los dispositivos de electroporación y los métodos de electroporación para facilitar la administración de las vacunas de ADN proporcionados en la solicitud de patente de EE.UU., en trámite junto con la presente y del mismo propietario que la presente, con n.º de serie 11/874072, presentada el 17 de octubre de 2007, que reivindica el beneficio en virtud de 35 USC 119(e) con respecto a las solicitudes provisional de EE.UU. con n.º de serie 60/852.149, presentada el 17 de octubre de 2006, y 60/978.982, presentada el 10 de octubre de 2007.

A continuación, se presenta un ejemplo de una realización en la que se usa la tecnología de electroporación, y que se describe en más detalle en las referencias de patentes citadas anteriormente: los dispositivos de electroporación se pueden configurar para administrar en un tejido deseado de un mamífero un pulso de energía que produzca una corriente constante similar a una entrada de corriente preestablecida por un usuario. El dispositivo de electroporación comprende un componente de electroporación y un conjunto de electrodos o mango. El componente de electroporación puede incluir e incorporar uno o más de los diversos elementos de los dispositivos de electroporación, incluyendo: controlador, generador de formas de onda de corriente, medidor de la impedancia, dispositivo de registro de formas de onda, elemento de entrada, elemento de información del estado, puerto de comunicación, componente de memoria, fuente de alimentación e interruptor de encendido. El componente de electroporación puede funcionar como un elemento de los dispositivos de electroporación, siendo el resto de elementos (o componentes) separados comunicados con el componente de electroporación. En algunas realizaciones, el componente de electroporación puede funcionar como más de un elemento de los dispositivos de electroporación, pudiendo estar comunicado con otros elementos más de los dispositivos de electroporación separados del componente de electroporación. El uso de la tecnología de electroporación para administrar las vacunas no está limitado por los elementos de los dispositivos de electroporación existentes como partes de un

dispositivo electromecánico o mecánico, pues los elementos pueden funcionar como un dispositivo o como elementos separados comunicados entre sí. El componente de electroporación es capaz de administrar el pulso de energía que produce la corriente constante en el tejido deseado, e incluye un mecanismo de retroalimentación. El conjunto de electrodos incluye un grupo de electrodos que tiene una pluralidad de electrodos en una disposición espacial, en el que el conjunto de electrodos recibe el pulso de energía desde el componente de electroporación y administra el mismo al tejido deseado a través de los electrodos. Al menos uno de la pluralidad de electrodos es neutro durante la administración del pulso de energía, y mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al componente de electroporación. El mecanismo de retroalimentación puede recibir la impedancia medida y puede ajustar el pulso de la energía administrado por el componente de electroporación para mantener la corriente constante.

En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos puede administrar el pulso de energía en un patrón descentralizado. En algunas realizaciones, la pluralidad de electrodos puede administrar el pulso de energía en el patrón descentralizado a través del control de los electrodos en virtud de una secuencia programada, y la secuencia programada es introducida por un usuario en el componente de electroporación. En algunas realizaciones, la secuencia programada comprende una pluralidad de pulsos administrados por orden, en el que cada pulso de la pluralidad de pulsos es administrado por al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia, y en el que un pulso subsiguiente de la pluralidad de pulsos es administrado por uno diferente de al menos dos electrodos activos con un electrodo neutro que mide la impedancia.

En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación se realiza por hardware o software. Preferentemente, el mecanismo de retroalimentación se realiza con un circuito de bucle cerrado analógico. Preferentemente, esta retroalimentación se produce cada 50 μ s, 20 μ s, 10 μ s o 1 μ s, pero es preferentemente una retroalimentación en tiempo real o instantánea (es decir, esencialmente instantánea según lo determinado mediante técnicas disponibles para la determinación del tiempo de respuesta). En algunas realizaciones, el electrodo neutro mide la impedancia en el tejido deseado y comunica la impedancia al mecanismo de retroalimentación, y el mecanismo de retroalimentación responde a la impedancia y ajusta el pulso de energía para mantener la corriente constante en un valor similar al valor deseado. En algunas realizaciones, el mecanismo de retroalimentación mantiene la corriente constante de forma continua e instantánea durante la administración del pulso de energía.

Cuando es absorbida por una célula, la una o más construcciones genéticas pueden permanecer presentes en la célula como una molécula extracromosómica funcional. El ADN puede introducirse en las células, donde está presente de forma transitoria, en forma de un plásmido o plásmidos. Como alternativa, se puede administrar ARN a la célula. También se contempla proporcionar la construcción genética como un minicromosoma lineal que incluye un centrómero, telómeros y un origen de replicación. Las construcciones génicas pueden formar parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que se administran a los sujetos. Las construcciones génicas pueden formar parte de genomas de vacunas virales recombinantes en las que el material genético se mantiene extracromosómico. Las construcciones genéticas incluyen elementos reguladores necesarios para la expresión génica de una molécula de ácido nucleico. Los elementos incluyen: un promotor, un codón de iniciación, un codón de parada y una señal de poliadenilación. Además, los potenciadores suelen requerir la expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína inmunomoduladora. Es necesario que estos elementos se unan operativamente a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores sean operativos en el individuo en el que se administran.

Un codón de iniciación y un codón de parada se consideran, en general, parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo al que se administra la construcción génica. Los codones de iniciación y terminación deben estar en fase con la secuencia de codificación.

Los promotores y las señales de poliadenilación usados deben ser funcionales dentro de las células del individuo.

Los ejemplos de promotores útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, pero sin limitación, los promotores del virus de simio 40 (SV40), el promotor del virus del tumor de mama de ratón (MMTV), Virus de la Inmunodeficiencia Humana (MV) tal como el promotor de repetición terminal larga (LTR) del BIV, virus de Moloney, ALV, citomegalovirus (CMV) tales como el promotor temprano inmediato del CMV, virus de Epstein Barr (EBV), virus del sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y metalotioneína humana.

Los ejemplos de señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente en la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, pero sin limitación, las señales de poliadenilación de SV40, la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina (bgh-PolyA) y señales de poliadenilación de LTR. En particular, se usa la señal de poliadenilación de SV40 que está en el plásmido pCEP4 (Invitrogen, San Diego Calif.), conocida como señal de poliadenilación de SV40.

Además de los elementos reguladores requeridos para la expresión del ADN, también se pueden incluir otros elementos en la molécula de ADN. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede seleccionarse del grupo que incluye, pero sin limitación: actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina de músculo humano y potenciadores virales tales como los del CMV, RSV y EBV.

Las construcciones genéticas pueden recibir un origen de replicación de mamífero para mantener la construcción extracromosómicamente y producir múltiples copias de la construcción en la célula. Los plásmidos pVAX1, pCEP4 y pREP4 de Invitrogen (San Diego, Calif.) contienen el origen de replicación del virus de Epstein Barr y la región de codificación del antígeno nuclear EBNA-1, que produce la replicación episomal de alto número de copias sin integración.

En algunas realizaciones preferidas relacionadas con las aplicaciones de inmunización, se administran una o más moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican una proteína de consenso y, además, genes de proteínas que mejoran aún más la respuesta inmune contra dichas proteínas diana. Los ejemplos de dichos genes son aquellos que codifican otras citocinas y linfocinas tales como alfa-interferón, gamma-interferón, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF, GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-28, incluyendo IL-15, que tiene la secuencia de señal eliminada e incluyendo, opcionalmente, el péptido señal de IgE.

Las composiciones usadas en los métodos pueden comprender además una o más de las siguientes proteínas y/o moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas, como se establece en el documento de EE.UU. n.º de serie 10/139.423, que corresponde a la publicación de EE.UU. n.º 20030176378: antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad que incluyen el antígeno de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad o el antígeno de clase II del Complejo Mayor de Histocompatibilidad; receptores del dominio de muerte incluyendo, pero sin limitación, Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2 y DR6; señales de muerte, es decir, proteínas que interactúan con los receptores del dominio de muerte, incluyendo, pero sin limitación FADD, FAP-1, TRADD, RIP, FLICE y RAIDD; o las señales de muerte que incluyen ligandos que se unen a receptores del dominio de muerte e inician la apoptosis incluyendo, pero sin limitación, FAS-L y TNF; y mediadores que interactúan con los receptores del dominio de muerte, incluyendo, pero sin limitación, FADD, MORT1 y MyD88; toxinas que incluyen proteínas que destruyen células tales como, pero sin limitación, venenos de insecto y de serpiente, endotoxinas bacterianas tales como endotoxina de *Psuedomoneus*, ribosoma bicatenaria que inactiva proteínas tales como la ricina, incluyendo la toxina monocatenaria y la gelonina.

Las composiciones usadas en los métodos pueden comprender además una o más de las siguientes proteínas y/o moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas, como se establece en el documento de EE.UU. n.º de serie 10/560.650, que corresponde a la publicación de EE.UU. n.º 20070041941: IL-15, que incluye proteínas de fusión que comprenden el péptido señal no IL-15 enlazado con secuencias de proteína IL-15 tales como proteínas de fusión que comprenden un péptido señal de IgE enlazado con secuencias de proteína IL-15, CD40L, TRAIL; TRAILrecDRC5, TRAIL-R2, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, ligando de RANK, Ox40, ligando de Ox40, NKG2D, F461811 o MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, CD30, CD153 (CD30L), Fos, c-jun, Sp-1, Ap1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, NIK, SAP K, SAP1, JNK2, JNK1B2, JNK1B1, JNK2B2, JNK2B1, JNK1A2, JNK2A1, JNK3A1, JNK3A2, NF-kappa-B2, forma de corte y empalme de p49, NF-kappa-B2, forma de corte y empalme de p100, NF-kappa-B2, forma de corte y empalme de p105, precursor de la cadena de 50 K de NF-kappa-B, p50 de NFκB, IL-1alfa humana, IL-2 humana, IL-4 humana, IL-4 murina, IL-5 humana, IL-10 humana, IL-15 humana, IL-18 humana, TNF-alfa humano, TNF-beta humano, interleucina 12 humana, MadCAM-1, IL-7 de NGF, VEGF, TNF-R, Fas, CD40L, IL-4, CSF, G-CSF, GM-CSF, M-CSF, LFA-3, ICAM-3, ICAM-2, ICAM-1, PECAM, P150.95, Mac-1, LFA-1, CD34, RANTES, IL-8, MIP-1alfa, E-selecton, CD2, MCP-1, L-selecton, P-selecton, FLT, Apo-1, Fas, TNFR-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4 (TRAIL), DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, ICE, VLA-1 y CD86 (B7.2)

Las composiciones usadas en los métodos pueden comprender además una o más de las siguientes proteínas y/o moléculas de ácido nucleico que codifican dichas proteínas, como se establece en el documento de EE.UU. n.º de serie 10/560.653, que corresponde a la publicación de EE.UU. n.º 20070104686: Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, IκB, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta al interferón, NFκB, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAIL-R3, TRAIL-R4, RANK, RANK LIGAND, Ox40, Ox40 LIGAND, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1 y TAP2.

Se puede añadir un elemento adicional que sirva como diana para la destrucción de células si, por cualquier motivo, se desean eliminar las células que reciben la construcción genética. Se puede incluir en la construcción genética un gen de la timidina quinasa (tk) del herpes en una forma expresable. Se puede administrar el fármaco ganciclovir al individuo, y ese fármaco causará la muerte selectiva de cualquier célula productora de tk, proporcionando así los medios para la destrucción selectiva de las células con la construcción genética.

Para maximizar la producción de proteínas, se pueden seleccionar secuencias reguladoras que sean muy adecuadas para la expresión de genes en las células en las que se administra la construcción. Por otra parte, se pueden seleccionar codones que se transcriban más eficazmente en la célula. Un experto en la materia puede

producir construcciones de ADN que sean funcionales en las células.

En algunas realizaciones, se pueden proporcionar construcciones de genes para producir secuencias de codificación de las proteínas inmunomoduladoras descritas en el presente documento unidas al péptido señal de IgE.

Una realización de la presente invención proporciona moléculas de ácido nucleico para la administración por vía intramuscular, intranasal, intraperitoneal, subcutánea, intradérmica o tópica, o para la administración por lavado al tejido mucoso seleccionada del grupo que consiste en administración por inhalación, vaginal, rectal, uretral, bucal y sublingual.

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se administra a las células conjuntamente con la administración de un potenciador de la función del polinucleótido o un agente facilitador de vacunas genéticas. Los potenciadores de la función de los polinucleótidos se describen en las patentes de EE.UU. n.º 5.593.972 y 5.962.428. Los agentes facilitadores de vacunas genéticas se describen en la patente de EE.UU. n.º 5.739.118. Los coagentes que se administran conjuntamente con moléculas de ácido nucleico pueden administrarse como una mezcla con la molécula de ácido nucleico o administrarse por separado simultáneamente, antes o después de la administración de las moléculas de ácido nucleico. Además, también se pueden administrar en combinación con la construcción genética otros agentes que pueden funcionar como agentes de transfección y/o agentes de replicación y/o agentes inflamatorios, y que pueden administrarse junto con un potenciador de la función del polinucleótido incluyendo factores de crecimiento, citocinas y linfocinas tales como α -interferón, gamma-interferón, GM-CSF, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-15, así como factor de crecimiento de fibroblastos, agentes tensioactivos tales como complejos inmunoestimulantes (ISCOM), análogo de LPS, incluyendo monofosforil lípido A (WL), péptidos de muramilo, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno, y escualeno y ácido hialurónico. En algunas realizaciones, se puede usar una proteína inmunomoduladora como potenciador de la función del polinucleótido. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se proporciona en asociación con poli(lactida-co-glicólido) (PLG), para mejorar la administración/absorción.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 2.000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 1.000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 10 nanogramos a aproximadamente 800 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 500 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 1 a aproximadamente 350 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas contienen de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 microgramos de ADN.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se formulan de acuerdo con el modo de administración que se vaya a usar. En los casos en los que las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, apirógenas y exentas de partículas. Preferentemente, se usa una formulación isotónica. En general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En algunos casos, se prefieren soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Los estabilizantes incluyen gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se añade un agente de vasoconstricción a la formulación.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, se proporcionan moléculas de ácido nucleico y vacunas recombinantes para su uso en la inducción de respuestas inmunes contra el virus Chikungunya. La vacuna puede ser una vacuna viva atenuada, una vacuna recombinante, o una vacuna de ácido nucleico o ADN.

La/s molécula/s de ácido nucleico se pueden proporcionar como ADN de plásmido, moléculas de ácido nucleico de vectores recombinantes o como parte del material genético proporcionado en una vacuna atenuada. Como alternativa, en algunas realizaciones, la proteína de consenso se puede administrar como una proteína, además de las moléculas de ácido nucleico que las codifican o en lugar de las moléculas de ácido nucleico que las codifican.

Las construcciones genéticas pueden comprender una secuencia de nucleótidos que codifique una proteína diana o una proteína inmunomoduladora unida operativamente a elementos reguladores necesarios para la expresión génica. De acuerdo con la invención, se proporcionan combinaciones de construcciones génicas que incluyen una construcción que comprende una forma expresable de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína diana y una construcción que incluye una forma expresable de la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína inmunomoduladora. La administración a una célula viva de la/s molécula/s de ADN o ARN que incluyen la combinación de construcciones génicas da lugar a la expresión del ADN o ARN y a la producción de la proteína diana y una o más proteínas inmunomoduladoras. Se produce una mejor respuesta inmune contra la proteína diana.

Además de usar formas expresables de secuencias de codificación de proteínas inmunomoduladoras para mejorar las vacunas genéticas, la presente invención se refiere a mejores vacunas vivas atenuadas y a mejores vacunas que usan vectores recombinantes para administrar genes foráneos que codifican antígenos. Los ejemplos de vacunas vivas atenuadas y de las que usan vectores recombinantes para administrar antígenos foráneos se describen en las patentes de EE.UU. n.º 4.722.848; 5.017.487; 5.077.044; 5.110.587; 5.112.749; 5.174.993; 5.223.424; 5.225.336; 5.240.703; 5.242.829; 5.294.441; 5.294.548; 5.310.668; 5.387.744; 5.389.368; 5.424.065; 5.451.499; 5.453.364; 5.462.734; 5.470.734; y 5.482.713. Se proporcionan construcciones génicas que incluyen la secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de consenso o fragmentos de consenso inmunogénicos de la misma, en las que la secuencia de nucleótidos está unida operativamente a secuencias reguladoras que pueden funcionar en la vacuna para efectuar la expresión. Las construcciones génicas se incorporan a las vacunas vivas atenuadas y las vacunas recombinantes para producir mejores vacunas de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona composiciones de vacuna que incluyen vacunas de ADN, vacunas vivas atenuadas y vacunas recombinantes para su uso en un método mejorado de inmunización de individuos que comprende la etapa de administrar construcciones génicas a las células de los individuos. Las construcciones génicas comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de consenso o fragmentos de consenso inmunogénicos de la misma que está unida operativamente a secuencias reguladoras que pueden funcionar en la vacuna para efectuar la expresión. Las vacunas generan protección cruzada frente a diferentes cepas.

Ejemplos

Ejemplo 1

En el presente documento, se presentan los datos de una nueva metodología basada en el consenso para el diseño de vacunas para el CHIKV, empleando una estrategia de vacuna de ADN. El casete de la vacuna se diseñó basado en las secuencias de consenso específicas de la cápside y de la envoltura del CHIKV con varias modificaciones. La expresión de la cápside, y de la envoltura E1 y E2 se evaluó usando la transcripción/traducción acopladas a T7 y el análisis de inmunotransferencia. Se usó la técnica de electroporación de corriente constante de adaptación para inmunizar ratones C57BL/6 con una inyección intramuscular de plásmido codificante de la cápside, E1 y E2 de CHIK. El análisis de las respuestas inmunes celulares, incluyendo la cartografía de los epítopes, demuestra que la electroporación de estas construcciones induce inmunidad celular tanto potente como amplia. Además, los ELISA de anticuerpos demuestran que estos inmunógenos sintéticos son capaces de inducir anticuerpos con título alto capaces de reconocer el antígeno nativo. Tomados en conjunto, estos datos apoyan el estudio adicional del uso de antígenos de CHIK de consenso en un posible cóctel de vacuna.

En este estudio, se diseñó un casete de vacuna basado en las secuencias de consenso específicas de la Cápside (Cáp), y la envoltura (E1) y la envoltura (E2) con varias modificaciones, incluyendo la optimización de codones, la optimización del ARN, la adición de una secuencia Kozak y una secuencia líder de inmunoglobulina E sustituida. Se introdujo el casete de la vacuna en el vector pVax1 de la vacuna de ADN, en el sitio específico. Se comprobaron las construcciones de vacuna en referencia a los insertos usando digestión de restricción específica y mediante la secuenciación con el cebador del promotor T7. Las construcciones finales se expresaron eficazmente basándose tanto en la expresión *in vitro*, como en el uso del análisis de transferencia Western *in vivo*. Esto confirmó que las construcciones virales se expresaron y se procesaron correctamente para estudios de inmunogenicidad adicionales.

Recientemente, ha habido mucho interés en el uso de EP para la administración de vacunas de ADN. Estudios recientes de inmunización IM + EP en modelos de animales pequeños y primates no humanos han informado consecuentemente de aumentos en las respuestas celulares y, en particular, en las respuestas de anticuerpos [20-22].

Materiales y Métodos

Células y animales:

Se cultivó la línea celular BHK-21 obtenida de la ATCC y se mantuvo en medio DMEM suplementado con suero de ternera fetal al 10 %. El vector de expresión de plásmido de mamífero, pVax1, se adquirió en Invitrogen (Carlsbad, CA). En estos experimentos, se usaron ratones hembra C57BL/6 de tres a 4 semanas de vida (Jackson Laboratories, Indianápolis, IN), y se dividieron en tres grupos experimentales (n4). Todos los animales fueron alojados en una instalación con control de la temperatura y ciclos de iluminación de acuerdo con las directrices de los Institutos Nacionales de Sanidad (Bethesda, MD, EE.UU.) y el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Pensilvania (Filadelfia, PA, EE.UU.) (IACUC).

Construcción y síntesis de ADN del CHIKV:

Se diseñaron los genes del núcleo y de la envoltura del CHIKV mediante la síntesis de cebadores sintéticos, seguida de la amplificación por PCR del ADN usando la cepa de consenso predicha de las secuencias recogidas de la base

de datos NCBI de todos los virus CHIKV. Las secuencias de consenso se optimizaron para la expresión, incluyendo la optimización de codones y de ARN (GeneArt, Regensburg, Alemania) y se insertaron en el vector de expresión pVax1 (Invitrogen).

5 Expresión *in vitro* e *in vivo*:

La expresión de la construcción se confirmó utilizando un promotor T7 en la cadena principal de pVax1 y el sistema de transcripción/traducción acoplado basado en T7 (Promega, Madison, WI) que contenía los genes S35-metionina del CHIKV. Se inmunoprecipitó la proteína sintetizada usando anticuerpos anti-E1, anti-E2 o anti-Cap. La proteína inmunoprecipitada se sometió a electroforesis en un gel de SDS-PAGE NuPage al 12 % (Invitrogen, CA), y posteriormente se fijó y se secó. Se realizó una autorradiografía para detectar un producto génico marcado con S35 incorporado. Para la expresión *in vivo*, se transfectaron células BHK-21 (1×10^6) con construcciones de CHIKV usando el método de transfección de Eugene (Roche, NJ). Setenta y dos horas después de la transfección, se fraccionaron las proteínas (50 µg) en SDS-PAGE (12 %) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA). Los análisis de inmunotransferencia se realizaron con un antisuero específico, que se desarrolló en los ratones, y las proteínas expresadas se visualizaron con IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante usando un sistema de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) [19].

20 Inmunización y electroporación

Se usó un protocolo convencional para sensibilizar animales con el plásmido de ADN [20]. Se inmunizaron grupos de cuatro ratones dos veces con genes pCHIKV (25 µg) 2-3 veces, con 2 semanas de diferencia, y se sacrificaron 1 semana después de la inmunización final. Todas las inmunizaciones se administraron en los músculos cuádriceps en un volumen total de 100 µl mediante electroporación *in vivo* (EP) (VGX Pharmaceuticals Inc., Blue Bell, PA). Los animales se sacrificaron 7 días después de la última inmunización, tras lo que se extrajeron el suero y el bazo para los ensayos de inmunología. Se obtuvo sangre tanto de los ratones de control como de los ratones inmunizados 1 semana después de la segunda y de la tercera inmunización, respectivamente. Se usaron pulsos de onda cuadrada en todos los experimentos y se administraron con la EKD de corriente constante que se había diseñado y ensayado en nuestro laboratorio [20-22]. En los experimentos con ratones, se usó una matriz de tres electrodos (3-EA). La 3-EA consiste en tres electrodos sólidos de acero inoxidable de calibre 26 en una formación de triángulo isósceles, con dos lados largos de 0,5 mm de longitud y el lado corto de 0,3 mm de longitud, unidos con un plástico no conductor. Las condiciones específicas de la EP para los experimentos con ratones estaban usando corriente constante, 0,1 amperios, tres pulsos, 52 ms/pulso, 4 segundos entre pulsos. El lapso de tiempo entre la inyección de plásmido y la EP fue de aproximadamente 20 s. El orden de los eventos para la administración de plásmido/EP fue el siguiente: se coloca un conjunto de electrodos desechables en el recipiente del mango, se pulsa el botón de inicio del mango y se introduce el número de animales del grupo experimental, se inyectan 50 µl de plásmido de construcción de ADN (25 µg de ADN total) usando una jeringa de insulina, se colocan de inmediato las agujas en la zona que rodea el lugar de la inyección, se pulsa el botón de inicio del mango, y tras 4 segundos de cuenta atrás, se administran los pulsos. Tras 5 segundos después de la electroporación, se retira la matriz suavemente de músculo. Todos los electrodos se insertaron completamente en el músculo durante todos los tratamientos [21, 22]. Todos los ADN se crearon usando columnas Qiagen exentas de endotoxinas. Todos los animales fueron alojados en una instalación de temperatura controlada y ciclos de iluminación de la Universidad de Pensilvania, y se cuidaron siguiendo las directrices de los Institutos Nacionales de Sanidad y la Universidad de Pensilvania.

45 Respuesta celular: ensayo ELISpot

Se realizó un ensayo ELISpot como se ha descrito anteriormente [23]. En resumen, se recubrieron placas ELISpot de 96 pocillos (Millipore) con Ab de captura de anti-IFN-γ de ratón, y se incubaron durante 24 h a 4 °C (R&D Systems). Al día siguiente, se lavaron las placas y se bloquearon durante 2 h con BSA al 1 %. Se añadieron doscientos mil esplenocitos de los ratones inmunizados a cada pocillo y se estimularon durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 % en presencia de RPMI 1640 (control negativo), Con A (control positivo) o péptido específico Ags (10 µg/ml; Invitrogen). Las agrupaciones de péptidos consisten en péptidos 15-meros solapados en 11 aminoácidos. Tras 24 h de la estimulación, se lavaron las células y se incubaron durante 24 horas a 4 °C con Ab anti-IFN-γ de ratón biotinilado (R&D Systems). Se lavaron las placas, y se añadió estreptavidina-fosfatasa alcalina (R&D Systems) a cada pocillo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó la placa, y se añadieron sal de *p*-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato y cloruro de tetrazolio azul nitro (reactivo de color cromógeno R&D Systems) a cada pocillo. A continuación, se enjuagó la placa con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. Las manchas se contaron mediante un lector de ELISpot automatizado (CTL Limited) [21-23].

60 Respuesta inmune humoral: ELISA de anticuerpos

Se determinaron los niveles de anticuerpos tras cada inyección de sensibilización de ADN y la respuesta inmune humoral a la vacunación para cada construcción de ADN del CHIKV. En resumen, se recubrieron placas de poliestireno de alta unión de 96 pocillos (Corning, NY) durante la noche a 4 °C con péptidos específicos sintetizados (2 µg/ml), que se diluyeron en PBS. Al día siguiente, se lavaron las placas con PBST (PBS, Tween 20 al 0,05 %), se bloquearon durante 1 h con BSA al 3 % en PBST, y se incubaron con diluciones 1:100 de suero de los ratones

inmunizados y sin tratamiento durante 1 h a 37 °C. La IgG unida se detectó usando IgG anti-ratón de cabra-HRP (Research Diagnostics, NJ) a una dilución de 1:5000. La enzima unida se detectó mediante la adición de la solución de sustrato cromógeno TMB (R&D Systems), y se leyó a 450 nm en un lector EL312e Bio-Kinetics de Biotek. Todas las muestras de suero se ensayaron por duplicado [22].

Resultados

Expresión de las construcciones de consenso:

Se verificaron las expresiones de las tres construcciones de consenso de CHIKV usando múltiples técnicas. Para visualizar las proteínas producidas *in vitro*, se realizó un ensayo de transcripción y traducción acoplado a T7 *in vitro* marcado con S³⁵. Los productos de la traducción se inmunoprecipitaron usando el anticuerpo con marcador de His, y se realizó el análisis en gel. El análisis de SDS-PAGE y el análisis radiográfico mostraron que cada construcción (envoltura E1 y E2, y la cápside) se desarrolla a su peso molecular predicho teóricamente (Fig. 2A). A continuación, se trató de examinar la expresión de estas construcciones en células de mamíferos *in vivo*. Tras la transfección a células BHK-21, se extrajeron las proteínas tras tres días y se detectó la expresión usando anticuerpos policlonales específicos mediante análisis de transferencia Western (Fig. 2B). En las células transfectadas a la construcción de la envoltura E1, se observó una proteína de 52 kDa, observándose una proteína de 36 kDa en las células transfectadas a la construcción de la cápside tras la inmunotransferencia con anticuerpos específicos.

Inmunogenicidad humoral

Los presentes inventores tienen la hipótesis de que la fuerza de los presentes inmunógenos de consenso para proteger contra el virus CHIK letal recaerá en el grupo celular del sistema inmune. Además, los anticuerpos de reacción cruzada, pero no neutralizantes, pueden proporcionar un cierto grado de protección contra la gravedad de la enfermedad. Para determinar si las presentes construcciones inducen respuestas de anticuerpos, se realizó un ELISA de anticuerpos en suero de ratón inmunizado con CHIK para determinar el título de los anticuerpos de los sueros obtenidos tras las inmunizaciones de ADN que se ensayaron para determinar la respuesta de los anticuerpos por ELISA. El anticuerpo IgG específico anti-E1 de los sueros de los ratones inmunizados con la envoltura E1 fue significativamente superior que en los sueros de los ratones inmunizados con control de vector (Fig. 3A). Del mismo modo, el anticuerpo IgG específico anti-E2 y el anticuerpo IgG específico anti-cápside en los sueros de ratones inmunizados con las construcciones de envoltura E2 y de cápside respectivamente fueron significativamente superiores que en los sueros de ratones inmunizados con control de vector (Fig. 3B y C). Estos resultados apoyaron aún más los medios alternativos de administración de plásmidos, en concreto, la electroporación aumentó la respuesta de producción de anticuerpos hacia el inmunógeno de vacuna de ADN.

Inmunogenicidad celular

A continuación, se determinó la capacidad de las construcciones de E1, E2 y cápside para inducir las respuestas de CTL CD8⁺ mediante ensayos ELISpot de IFN-γ. Las construcciones de envoltura E1 y E2 de consenso, así como las vacunas de cápside fueron capaces de inducir fuertes respuestas de IFN-γ en ratones C57BL/6 tras tres inmunizaciones (Fig. 4A, 5A y 6A). Para la caracterización molecular de las respuestas inmunes celulares inducidas por la envoltura E1, se realizó el ensayo ELISpot contra una biblioteca de péptidos que abarcaban toda la envoltura E1. Se usaron setenta y cuatro péptidos 15-meros con 9 solapamientos de aminoácidos entre ellos, que abarcaban los restos 1-435 de la proteína E1, y péptidos que abarcaban 1-423 de la proteína E2. Las envolturas indujeron un epítipo dominante HSMTNAVTI en la proteína E1 (Fig. 4B) e IILYYYELY en la proteína E2 (Fig. 5B). Del mismo modo, para la proteína de cápside, se realizó el ensayo ELISpot contra una biblioteca de péptidos que abarcaban toda proteína de cápside. Se usaron cuarenta y cinco péptidos 15-meros con solapamientos de 9 aminoácidos entre ellos, que abarcaban los restos 1-261 de la proteína de cápside. El epítipo dominante ACLVGDKVM fue inducido por la construcción de cápside (Fig. 5B). Cabe señalar que el epítipo dominante que es inducido por la construcción CHIKV-E1 porta la mutación 226A-V, lo que sugiere que la construcción también puede inducir eficazmente la respuesta inmune contra el virus mutante recién surgido. Este hallazgo puede sugerir que la respuesta inmune puede ser capaz de impulsar la evolución del virus a través del proceso de selección celular.

Discusión

La evaluación de la respuesta inmune inducida en los ratones C57BL/6 mostró que las construcciones eran altamente inmunogénicas y que provocaron la respuesta inmune de linfocitos T en términos de una respuesta y proliferación de IFN-γ. Los datos del ELISpot del presente estudio sugieren que la magnitud de la respuesta de IFN-γ fue generalizada en cuanto al número obtenido de manchas. Aunque se sabe que la proteína de envoltura y cápside en otros virus alfa relacionados es inmunogénica, poco se sabe sobre la inmunogenicidad de las proteínas de envoltura y cápside del Chikungunya. La generación de producción de IFN-γ a partir de esplenocitos por agrupaciones de péptidos de la matriz de diferentes regiones de la envoltura E1 y la cápside identificaron los epítopos dominantes de linfocitos T HSMTNAVTI y ACLVGDKVM en las proteínas E1 y cápside, respectivamente. Se encontró el aumento de los niveles totales de IgG en los ratones vacunados en comparación con los de los controles no vacunados, lo que sugiere la inducción de una potente respuesta inmune humoral. Actualmente, se

encuentran en curso estudios posteriores para analizar más a fondo el tipo de respuestas inducidas de los anticuerpos, además de la capacidad de estas vacunas para impulsar la protección contra una amplia selección de desafíos del virus Chikungunya.

Este estudio sugiere que estas construcciones se podrían estudiar más a fondo como candidatos vacunales. Sin embargo, como este estudio se limita a la demostración de la expresión eficaz, así como a la inmunogenicidad tras la inyección intramuscular de construcciones vacunales, seguida de la electroporación en ratones, es importante una evaluación elaborada de su inmunogenicidad en más modelos incluyendo el modelo de primates no humanos. Las construcciones de casetes de síntesis descritas parecen ser una herramienta conveniente para investigar aún más la inmunobiología del virus Chikungunya.

Ejemplo 2

Se diseñó un ensayo para medir los títulos de los anticuerpos neutralizantes que proporciona un diagnóstico rápido y viable de la infección humana clínica por CHIKV y para su aplicación en la vigilancia serológica preclínica de hospedadores vertebrados susceptibles.

Se identificó el CHIKV mediante RT-PCR. Se extrajo ARN de los sueros de pacientes usando el mini kit de ARN viral QIAamp. Se llevó a cabo un ensayo de RT-PCR de una sola etapa usando el kit de RT-PCR de una sola etapa de Quiagen. El producto de amplificación fue de 305 pb dentro del gen que codifica la proteína de envoltura viral E2. Cuando se observan las células, el CHIKV causa el efecto citopático espumoso (CPE), en el que se observa el redondeo de las células tras 24-48 horas después de la infección (pi).

El ensayo de microneutralización se diseñó de la siguiente manera. El ensayo de neutralización se basa en la reacción de antígeno y anticuerpo. Se observa la presencia del anticuerpo homólogo hacia el virus CHIKV en el suero del paciente que inhibe el título viral conocido. Se diluyen los sueros en serie (normalmente, por ejemplo, de 1:10 a 1:640) y se incuban con CHIKV de un título conocido en condiciones y durante una cantidad de tiempo suficiente para que el anticuerpo del suero inhiba el virus. Tras la incubación, se añade la mezcla a células permisivas en condiciones que darán como resultado la infección viral de las células si el virus no ha sido neutralizado por los anticuerpos de los sueros. La dilución más alta de suero que inhibe la propagación viral se indica como el título de los anticuerpos. Se puede usar el CPE (efecto citopático) como una medida de la propagación viral en las células.

El ensayo de neutralización del CHIKV se realizó usando muestras de pacientes. La Figura 7 es un gráfico que muestra los títulos de los anticuerpos neutralizantes de sueros de ratones pre-inmunizados e inmunizados con ADN. Se inmunizaron ratones con construcciones que codificaban E1, E2, la cápside, E1+E2, o el vector pVax). Se diluyeron los sueros en serie (de 1:10 a 1:640) y se incubaron con CHIKV (100TC₅₀) durante 90 minutos a 37 °C. Tras la incubación, se añadió la mezcla a células Vero (15.000 células/pocillo) en una placa de fondo plano de 96 pocillos y se incubaron durante 5 días a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %. El título más alto al que no se observó ningún CPE (efecto citopático) se registró como el título de los anticuerpos neutralizantes.

Referencias

1. Strauss, J. H. y Strauss, E. G. (1994). "The Alphaviruses: gene expression, replication, and evolution", *Microbiol. Rev.* 58, 491-562.
2. Robinson, M. C. (1955). "An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53". *I. Clinical features. Trans R Soc Trop Med Hyg* 49, 28-32.
3. Powers, A. M. y Logue, C. H. (2007). "Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus". *Journal of General Virology*, vol. 88, parte 9, pág. 2363-2377.
4. Porterfield, J. H. (1980). "Antigenic characteristics and classification of the Togaviridae". En: Schlesinger R, editor. *The Togaviruses*. Nueva York: Academic Press. 13-46.
5. Weaver, S. C y Barrett D. T. (2004). "Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease". *Nat. Rev. Microbiol.* 2, pág. 789-801.
6. Chevillon C., Briant L., Renaud F., Devaux C. (2008). "The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective". *Trends Microbiol.* 16 (2) 80-88.
7. Lahariya, C. y Pradhan S. K. (2006). "Emergence of chikungunya virus in Indian subcontinent after 32 years: a review", *J. Vector Borne Dis.* 43 pág. 151-160.
8. Vanlandingham D. L., Hong C., Klingler K., Tsetsarkin K., McElroy K. L., Powers A. M., Lehane M. J., Higgs S. (2005). "Differential infectivities of o'nyong-nyong and chikungunya virus isolates in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes". *Am J Trop Med Hyg* 72 (5): 616-21.
9. Yergolkar, P. N. et al., (2006). "Chikungunya outbreaks caused by African genotype", *India, Emerg. Infect. Dis.* 12; 45 1 580-1583.
10. Warner, E., Garcia-Diaz, J., Balsamo, G., Shranatan, S., Bergmann, A., Blauwet, L., Sohail, M., Baddour, L., Reed, C. y otros autores (2006). "Chikungunya fever diagnosed among international travelers" - Estados Unidos, 2005-2006. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 55, 1040-1042.
11. Turell, M. J., Beaman, J. R. y Tammariello, R. F. (1992). "Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti*

and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to chikungunya virus". *J Med Entomol* 29, 49-53.

12. Reiter, P., Fontenille, D. y Paupy, C. (2006). "Aedes albopictus as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem?". *Lancet Infect Dis* 6, 463-464.

13. Johnston R. E., Peters C. J. (1996) "Alphaviruses associated primarily with fever and polyarthritis". En: Fields B. N., Knipe D. M., Howley P. M., editores. *Fields virology*. Filadelfia: Lippincott-Raven Publishers. pág. 843-898.

14. Savarino A., Boelaert J. R., Cassone A., Majori G., Cauda R. (2003). "Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases?". *Lancet Infect Dis*. 3(11):722-7.

15. Tsetsarkin K. A., Vanlandingham D. L., McGee C. E., Higgs S. (2007). "A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential". *PLoS Pathog*. 7; 3(12):e201.

16. Grivard P., Le Roux K., Laurent P., Fianu A., Perrau J., Gigan J., Hoarau G., Grondin N., Staikowsky F., Favier F., Michault A. (2007). "Molecular and serological diagnosis of Chikungunya virus infection". *Pathol Biol* (París); 55(10):490-4.

17. Vazeille-Falcoz M., Mousson L., Rodhain F., Chungue E., Failloux A. B. (1999). "Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia". *Am J Trop Med Hyg* 60: 292-299.

18. Marie Vazeille *et al.*, (2007). "Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*". *PLoS ONE* 11: 1-9.

19. Muthumani, K., A. Y. Choo, W. X. Zong, M. Madesh, D. S. Hwang, A. Premkumar, K. P. Thieu, J. Emmanuel, S. Kumar, C. B. Thompson y D. B. Weiner. 2006. "The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1". *Nat Cell Biol*. 8:170-179.

20. Khan A. S., Smith L. C., Abruzzese R. V., Cummings K. K., Pope M. A., Brown P. A., Draghia-Akli R. (2003). "Optimization of electroporation parameters for the intramuscular delivery of plasmids in pigs". *DNA Cell Biol*. 22(12):807-1.

21. Lauren L. A., Hirao L. A., Wu L., Khan A. S., Satishchandran A., Draghia-Akli R., Weiner D. B. (2008) "Intradermal/subcutaneous immunization by electroporation improves plasmid vaccine delivery and potency in pigs and rhesus macaques". *Vaccine* 17; 26(3):440-8.

22. Laddy D. J., Yan J., Corbitt N., Kobasa D., Kobinger G. P., Weiner D. B. (2007) "Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against avian influenza". *Vaccine*. 25(16):2984-9.

23. Boyer J. D., Robinson T. M., Kutzler M. A., Vansant G., Hokey D. A., Kumar S., Parkinson R., Wu L., Sidhu M. K., Pavlakis G. N., Felber B. K., Brown C., Silvera P., Lewis M. G., Monforte J., Waldmann T.A., Eldridge J., Weiner D. B. (2007). "Protection against simian/human immunodeficiency virus (SHIV) 89.6P in macaques after coimmunization with SHIV antigen and IL-15 plasmid". *Proc Natl Acad Sci.*, EE.UU. 20:104(47):18648-53.

24. Feng G. H., Liu N., Zhou Y., Zhai Y. Z., Li X. M., Dou X. G. (2007). "Immunologic analysis induced by DNA vaccine encoding E protein of Beijing-1 strain derived from Japanese encephalitis virus. *Intervirology*". 50(2):93-8.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania David, Weiner B. Karrupiah, Muthumani

<120> SECUENCIAS DE CONSENSO DE PROTEÍNAS DEL VIRUS CHIKUNGUNYA, MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE LAS CODIFICAN, Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS

<130> 133172.3102

<140> PCT/US09/839656

<141> 06-04-2009

<150> 61/042661

<151> 04-04-2008

<160> 18

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 1374

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHIKV E1 de consenso

<400> 1

ES 2 588 738 T3

atggactgga cctggatcct gtttctggtc gctgctgcc	cccgggtgca cagctacgag	60
cacgtgaccg tgatcccaa caccgtgggc gtgccctaca	agaccctggt gaacaggccc	120
ggctacagcc ccatggtgct ggaaatgga ctgctgtccg	tgaccctgga acccaccctg	180
agcctggact acatcacctg cgagtacaag acagtgatcc	ccagccccta cgtgaagtgc	240
tgcggcaccg ccgagtgcaa ggacaagaac ctgcccgaact	acagctgcaa ggtgttcacc	300
ggcgtgtacc cttcatgtg gggcggagcc tactgcttct	gcgacgccga gaacaccag	360
ctgtccgagg ccacgtgga gaagagcgag agctgcaaga	ccgagttcgc cagcgcctac	420
cgggcccaca cagccagcgc cagcgccaag ctgccgggtgc	tgtaccaggg caacaacatc	480
accgtgaccg cctacgcaa cggcgaccac gccgtgacag	tgaaggacgc caagttcatc	540
gtgggcccc tgaagcagcgc ctggaccccc ttgcacaaca	agatcgtggt gtacaagggc	600
gacgtgtaca acatggacta ccccccttc ggagccggca	gacccggcca gttcggcgac	660
atccagagcc ggacccccga gagcaaggac gtgtacgcca	ataccagct ggtgctgcag	720
agacccgccg tgggcaccgt gcacgtgcct tacagccagg	ccccagcgg cttcaagtac	780
tggctgaaag agaggggccc cagcctgcag cacaccgccc	ccttcggtg ccagatcgcc	840
accaaccccc tgcgggcccgt gaattgtgcc gtgggcaaca	tgcccatcag catcgacatc	900
cccagggccc ccttcaccag ggtggtggac gcccagcc	tgaccgacat gagctgcgag	960
gtgcccgcct gcacccacag cagcgacttc ggcgccgtgg	ccatcatcaa gtacgcggcc	1020
agcaagaaag gcaagtgcgc cgtgcacagc atgaccaatg	ccgtgaccat ccgggaggcc	1080
gagatcgagg tggagggcaa cagccagctg cagatcagct	tcagcaccgc cctggccagc	1140
gccgagttcc ggggtgcaggt ctgcagcacc caggtgcact	gtgccgccga gtgtcaccac	1200
cccaaggacc acatcgtgaa ctaccccgcc agccacacca	ccctggcggt gcaggacatc	1260
agcggcaccg ccatgagctg ggtgcagaag atcacaggcg	gcgtcggcct ggtggtggcc	1320
gtggccgccc tgatcctgat cgtggtgctg tgcgtgagct	tcagccggca ctga	1374

<210> 2
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV E2 de consenso

<400> 2

ES 2 588 738 T3

```

atggactgga cctggatcct gttcctggtc gctgctgcca caagagtgca cagcagcacc      60
aaggacaact tcaacgtgta caaggccacc oggcccctacc tggcccactg ccccgattgc      120
ggcgagggcc acagctgcca cagccccgtg gccctggaac ggatccggaa cgaggccacc      180
gacggcacc c tgaagatcca ggtgtccctg cagatcggca tcaagaccga cgacagccac      240
gactggacca agctgcggta catggacaac cacatgcccg ccgacgccga gagagccggc      300
ctgttcgtcc ggaccagcgc cccctgcacc atcaccggca ccatgggcca cttcatcctg      360
gcccgtgccc ccaaggcgga gacactgacc gtgggcttca ccgacagccg gaagatcagc      420
cactcctgca cccaccctt ccaccacgac cccccctga tcggccggga gaagttccac      480
agcaggcccc agcacggcaa agagctgccc tgcagcacct acgtgcagag caccgcccgc      540
acaaccgagg aaatcgaggc gcacatgccc cccgataccc ccgaccggac cctgatgagc      600
cagcagagcg gcaacgtgaa gatcacctg aacggccaga ccgtgcggta caagtgcaac      660
tgcgccggca gcaacgaggc cctgaccacc accgacaagg tgatcaacaa ctgcaaggtg      720
gaccagtgcc acgccgccgt gaccaaccac aagaagtggc agtacaacag ccccctgggtg      780
ccccggaatg ccgagctggg cgaccggaag ggcaagatcc acatcccctt ccccctggcc      840
aacgtgacct gccgggtgcc caaggcccgg aaccccaccg tgacctacgg caagaaccag      900
gtgatcatgc tgctgtaccc cgaccacccc accctgctgt cctaccgga catgggcgag      960
gaacccaact accaagagga gtgggtcatg cacaagaaag aagtgggtgct gaccgtcccc      1020
accgagggcc tggaagtgac ctggggcaac aacgagccct acaagtactg gcccagctg      1080
tccaccaacg gcaccgcccc cggccacccc cagcagatca tcctgtacta ctacgagctg      1140
taccctacca tgaccgtggt ggtggtgtcc gtggccacct ttatcctgct gtccatggtc      1200
ggcatggccg ctggcatgtg catgtgcgcc aggagcgct gtatcacccc ctacgagctg      1260
acacctggcg ccaccgtgcc cttctgtctg tcctgatct gctgcatccg gaccgccaag      1320

gcctga      1326

```

<210> 3
 <211> 840
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cápside de CHIKV de consenso
 <400> 3

ES 2 588 738 T3

```

atggactgga cctggatcct gttcctgggtg gccgctgcc a cccgggtgca cagcatggaa      60
ttcatcccca cccagacctt ctacaaccgg cgctaccagc ccagacctg gacccccagg      120
cccaccatcc aggtgatccg gcccaggccc agaccccaga ggcaggccgg gcagctggca      180
cagctgatca gcgccgtgaa caagctgacc atgagagccg tgccccagca gaagcccagg      240
cggaaccgga agaacaagaa gcagaagcag aaacagcagg cccccagaa caacaccaac      300
cagaagaagc agccccccaa gaagaagcct gcccagaaga agaagaaacc cggcaggcgg      360
gagcggatgt gcatgaagat cgagaacgac tgcattctcg aggtgaagca cgagggcaag      420
gtgaccggct acgcctgcct ggtcggcgac aaagtgatga agcccggcca cgtgaagggc      480
accatcgaca acgccgacct ggccaagctg gccttcaagc ggagcagcaa gtacgacctg      540
gaatgcgccc agatccccgt gcacatgaag agcgacgcca gcaagttcac ccacgagaag      600
cccgagggct actacaactg gcaccacgga gccgtgcagt acagcggcgg caggttcacc      660
atccccacag gcgccggaaa gcccggcgac agcggcaggc ccatcttcga caacaagggc      720
cgggtggtgg ccatcgtgct gggcgagacc aacgagggcg ccaggaccgc cctgagcgtg      780
gtgacctgga acaaggacat cgtgaccaag atcacccccg agggcgccga agagtgggtga      840

```

<210> 4
 <211> 1320
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV E1 de consenso

<400> 4

```

tacgagcacg tgaccgtgat ccccaacacc gtgggcgtgc cctacaagac cctggtgaac      60
aggcccggct acagccccat ggtgctggaa atggaactgc tgtccgtgac cctggaaccc      120
accctgagcc tggactacat cacctgcgag tacaagacag tgatccccag ccctacgtg      180
aagtgctgcg gcaccgccga gtgcaaggac aagaacctgc ccgactacag ctgcaagggtg      240
ttcaccggcg tgtaccctt catgtggggc ggagcctact gcttctgcga cgccgagaac      300
accagctgt ccgaggccca cgtggagaag agcgagagct gcaagaccga gttcgccagc      360
gcctaccggg ccacacacag cagcgccagc gccaaactgc ggggtgctgta ccagggaac      420

```

ES 2 588 738 T3

```

aacatcaccg tgaccgccta cgccaacggc gaccacgccg tgacagtga ggacgccaag      480
ttcatcgtgg gcccctgag cagcgcctgg acccccttcg acaacaagat cgtggtgtac      540
aagggcgacg tgtacaacat ggactacccc cccttcggag ccggcagacc cggccagttc      600
ggcgacatcc agagccggac ccccgagagc aaggacgtgt acgccaatac ccagctggtg      660
ctgcagagac cggccgtggg caccgtgcac gtgccttaca gccaggcccc cagcggcttc      720
aagtactggc tgaaagagag gggcgccagc ctgcagcaca ccgccccctt cggctgccag      780
atcgccacca acccctgcg ggccgtgaat tgtgccgtgg gcaacatgcc catcagcatc      840
gacatccccg aggcgcctt caccagggtg gtggacgcc ccagcctgac cgacatgagc      900
tgcgaggtgc ccgctgcac ccacagcagc gacttcggcg gcgtggccat catcaagtac      960
gccgccagca agaaaggcaa gtgcgccgtg cacagcatga ccaatgccgt gaccatccgg     1020
gaggccgaga tcgaggtgga gggcaacagc cagctgcaga tcagcttcag caccgccctg     1080
gccagcgccg agttccgggt gcaggtctgc agcaccagc tgcactgtgc cggcgagtgt     1140
caccccccta aggaccacat cgtgaactac cccgccagcc acaccaccct gggcgtgcag     1200
gacatcagcg ccaccgccat gagctgggtg cagaagatca caggcggcgt cggcctggtg     1260
gtggccgtgg ccgccctgat cctgatcgtg gtgctgtgcg tgagcttcag ccggcactga     1320

```

<210> 5
 <211> 1273
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV E2 de consenso
 <400> 5

ES 2 588 738 T3

```

cagcaccaag gacaacttca acgtgtacaa ggccacccgg ccctacctgg cccactgccc      60
cgattgoggc gagggccaca gctgccacag ccccgaggcc ctggaacgga tccggaacga      120
ggccacogac ggcaccctga agatccaggt gtccctgcag atcggcacga agaccgacga      180
cagccacgac tggaccaagc tgcggtacat ggacaaccac atgcccggcg acgcccagag      240
agccggcctg ttcgtccgga ccagcgcccc ctgcaccatc accggcacca tggggcactt      300
catcctggcc cggtgcccca agggcgagac actgaccgtg ggcttcaccg acagccggaa      360
gatcagocac tcttgcaccc accccttcca ccacgacccc cccgtgatcg gccgggagaa      420
gttccacagc agggcccagc acggcaaaga gctgcctcgc agcacctacg tgcagagcac      480
cgccgccaca accgaggaaa tcgagggtgca catgcccccc gatacccccg accggaccct      540
gatgagccag cagagcggca acgtgaagat caccgtgaac ggccagaccg tgcgggtacaa      600
gtgcaactgc ggcgccagca acgagggcct gaccaccacc gacaaggtga tcaacaactg      660
caaggtggac cagtgccacg ccgccgtgac caaccacaag aagtggcagt acaacagccc      720
cctggtgccc cggaatgccg agctgggcga ccggaagggc aagatccaca tccccttccc      780

cctggccaac gtgacctgcc gggtgcccaa ggcccggaac cccaccgtga cctacggcaa      840
gaaccagggtg atcatgctgc tgtaccccca ccaccccacc ctgctgtcct accggaacat      900
gggcgaggaa cccaactacc aagaggagtg ggtcatgcac aagaaagaag tgggtgctgac      960
cgccccacc gagggcctgg aagtgaacctg gggcaacaac gagccctaca agtactggcc      1020
ccagctgtcc accaacggca ccgccacagg ccaccccacc gagatcatcc tgtactacta      1080
cgagctgtac cctaccatga ccgtgggtggg ggtgtccgtg gccaccttta tccgtgtgtc      1140
catggtcggc atggccgctg gcatgtgcat gtgcgccagg aggcgctgta tcacccccta      1200
cgagctgaca cctggcgcca ccgtgccttt tctgctgtcc ctgatctgct gcatccggac      1260
cgccaaggcc tga                                                                1273

```

<210> 6
 <211> 786
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Cápside de CHIKV de consenso
 <400> 6

ES 2 588 738 T3

atggaattca tccccaccca gacotttctac aaccggcgct accagcccag accctggacc	60
cccaggccca ccatccaggt gatccggccc aggccagac cccagaggca ggccgggcag	120
ctggcacagc tgatcagcgc cgtgaacaag ctgaccatga gagccgtgcc ccagcagaag	180
cccaggcgga accggaagaa caagaagcag aagcagaaac agcaggcccc ccagaacaac	240
accaaccaga agaagcagcc ccccaagaag aagcctgccc agaagaagaa gaaacccggc	300
aggcgggagc ggatgtgcat gaagatcgag aacgactgca tcttcgaggt gaagcacgag	360
ggcaagggtga cgggctacgc ctgcctggtc ggcgacaaag tgatgaagcc cggccacgtg	420
aagggcacca tcgacaacgc cgacctggcc aagctggcct tcaagcggag cagcaagtac	480
gacctggaat gcgcccagat ccccgctgcac atgaagagcg acgccagcaa gttcaccac	540
gagaagcccg agggctacta caactggcac cacggagccg tgcagtacag cgcgggcagg	600
ttcaccatcc ccacaggcgc cggaaagccc ggcgacagcg gcaggcccat cttcgacaac	660
aagggccggg tgggtggccat cgtgctgggc ggagccaacg agggcgccag gaccgcctg	720
agcgtggtga cctggaacaa ggacatcgtg accaagatca ccccgaggg cgccgaagag	780
tggtga	786

<210> 7
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV E1 de consenso

<400> 7

ES 2 588 738 T3

Met	Asp	Trp	Thr	Trp	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val	1	5	10	15
His	Ser	Tyr	Glu	His	Val	Thr	Val	Ile	Pro	Asn	Thr	Val	Gly	Val	Pro	20	25	30	
Tyr	Lys	Thr	Leu	Val	Asn	Arg	Pro	Gly	Tyr	Ser	Pro	Met	Val	Leu	Glu	35	40	45	
Met	Glu	Leu	Leu	Ser	Val	Thr	Leu	Glu	Pro	Thr	Leu	Ser	Leu	Asp	Tyr	50	55	60	
Ile	Thr	Cys	Glu	Tyr	Lys	Thr	Val	Ile	Pro	Ser	Pro	Tyr	Val	Lys	Cys	65	70	75	80
Cys	Gly	Thr	Ala	Glu	Cys	Lys	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asp	Tyr	Ser	Cys	85	90	95	
Lys	Val	Phe	Thr	Gly	Val	Tyr	Pro	Phe	Met	Trp	Gly	Gly	Ala	Tyr	Cys	100	105	110	
Phe	Cys	Asp	Ala	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Ser	Glu	Ala	His	Val	Glu	Lys	115	120	125	
Ser	Glu	Ser	Cys	Lys	Thr	Glu	Phe	Ala	Ser	Ala	Tyr	Arg	Ala	His	Thr	130	135	140	
Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Lys	Leu	Arg	Val	Leu	Tyr	Gln	Gly	Asn	Asn	Ile	145	150	155	160
Thr	Val	Thr	Ala	Tyr	Ala	Asn	Gly	Asp	His	Ala	Val	Thr	Val	Lys	Asp	165	170	175	
Ala	Lys	Phe	Ile	Val	Gly	Pro	Met	Ser	Ser	Ala	Trp	Thr	Pro	Phe	Asp	180	185	190	
Asn	Lys	Ile	Val	Val	Tyr	Lys	Gly	Asp	Val	Tyr	Asn	Met	Asp	Tyr	Pro	195	200	205	
Pro	Phe	Gly	Ala	Gly	Arg	Pro	Gly	Gln	Phe	Gly	Asp	Ile	Gln	Ser	Arg	210	215	220	
Thr	Pro	Glu	Ser	Lys	Asp	Val	Tyr	Ala	Asn	Thr	Gln	Leu	Val	Leu	Gln	225	230	235	240
Arg	Pro	Ala	Val	Gly	Thr	Val	His	Val	Pro	Tyr	Ser	Gln	Ala	Pro	Ser	245	250	255	

ES 2 588 738 T3

Gly Phe Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr
260 265 270

Ala Pro Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn
275 280 285

Cys Ala Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala
290 295 300

Phe Thr Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu
305 310 315 320

Val Pro Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile
325 330 335

Lys Tyr Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr
340 345 350

Asn Ala Val Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser
355 360 365

Gln Leu Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg
370 375 380

Val Gln Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro
385 390 395 400

Pro Lys Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly
405 410 415

Val Gln Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr
420 425 430

Gly Gly Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val
435 440 445

Val Leu Cys Val Ser Phe Ser Arg His
450 455

<210> 8

<211> 441

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHIKV E2 de consenso

<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val

ES 2 588 738 T3

1	5	10	15
His Ser Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro	20	25	30
Tyr Leu Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser	35	40	45
Pro Val Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu	50	55	60
Lys Ile Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His	65	70	75
Asp Trp Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala	85	90	95
Glu Arg Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr	100	105	110
Gly Thr Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr	115	120	125
Leu Thr Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr	130	135	140
His Pro Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His	145	150	155
Ser Arg Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln	165	170	175
Ser Thr Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp	180	185	190
Thr Pro Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile	195	200	205
Thr Val Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser	210	215	220
Asn Glu Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val	225	230	235
Asp Gln Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn	245	250	255
Ser Pro Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys	260	265	270

Ile His Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys
 275 280 285

Ala Arg Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu
 290 295 300

Leu Tyr Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu
 305 310 315 320

Glu Pro Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val
 325 330 335

Leu Thr Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu
 340 345 350

Pro Tyr Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly
 355 360 365

His Pro His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met
 370 375 380

Thr Val Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val
 385 390 395 400

Gly Met Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr
 405 410 415

Pro Tyr Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu
 420 425 430

Ile Cys Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
 435 440

<210> 9

<211> 279

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cápside de CHIKV de consenso

<400> 9

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Met Glu Phe Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Asn Arg Arg Tyr
 20 25 30

Gln Pro Arg Pro Trp Thr Pro Arg Pro Thr Ile Gln Val Ile Arg Pro

ES 2 588 738 T3

35	40	45													
Arg	Pro	Arg	Pro	Gln	Arg	Gln	Ala	Gly	Gln	Leu	Ala	Gln	Leu	Ile	Ser
50						55					60				
Ala	Val	Asn	Lys	Leu	Thr	Met	Arg	Ala	Val	Pro	Gln	Gln	Lys	Pro	Arg
65					70					75					80
Arg	Asn	Arg	Lys	Asn	Lys	Lys	Gln	Lys	Gln	Lys	Gln	Gln	Ala	Pro	Gln
				85					90					95	
Asn	Asn	Thr	Asn	Gln	Lys	Lys	Gln	Pro	Pro	Lys	Lys	Lys	Pro	Ala	Gln
			100					105					110		
Lys	Lys	Lys	Lys	Pro	Gly	Arg	Arg	Glu	Arg	Met	Cys	Met	Lys	Ile	Glu
		115					120					125			
Asn	Asp	Cys	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	His	Glu	Gly	Lys	Val	Thr	Gly	Tyr
130						135					140				
Ala	Cys	Leu	Val	Gly	Asp	Lys	Val	Met	Lys	Pro	Ala	His	Val	Lys	Gly
145					150					155					160
Thr	Ile	Asp	Asn	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Leu	Ala	Phe	Lys	Arg	Ser	Ser
				165					170					175	
Lys	Tyr	Asp	Leu	Glu	Cys	Ala	Gln	Ile	Pro	Val	His	Met	Lys	Ser	Asp
			180					185					190		
Ala	Ser	Lys	Phe	Thr	His	Glu	Lys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Trp	His
		195					200					205			
His	Gly	Ala	Val	Gln	Tyr	Ser	Gly	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Pro	Thr	Gly
210						215					220				
Ala	Gly	Lys	Pro	Gly	Asp	Ser	Gly	Arg	Pro	Ile	Phe	Asp	Asn	Lys	Gly
225					230					235					240
Arg	Val	Val	Ala	Ile	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Asn	Glu	Gly	Ala	Arg	Thr
				245					250					255	
Ala	Leu	Ser	Val	Val	Thr	Trp	Asn	Lys	Asp	Ile	Val	Thr	Lys	Ile	Thr
			260					265					270		
Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Glu	Trp									
				275											

<210> 10
 <211> 439
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CHIKV E1 de consenso

5

<400> 10

```

Tyr Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys
1          5          10          15

Thr Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu
          20          25          30

Leu Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr
          35          40          45

Cys Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly
          50          55          60

Thr Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val
65          70          75          80

Phe Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys
          85          90          95

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

Ser Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser
          115          120          125

Ala Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val
          130          135          140

Thr Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys
145          150          155          160

Phe Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys
          165          170          175

Ile Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe
          180          185          190

Gly Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro
          195          200          205

Glu Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro
          210          215          220

Ala Val Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe

```

ES 2 588 738 T3

```

225                230                235                240

Lys Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro
                245                250                255

Phe Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala
                260                265                270

Val Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr
                275                280                285

Arg Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro
                290                295                300

Ala Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr
305                310                315                320

Ala Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala
                325                330                335

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

Gln Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln
                355                360                365

Val Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys
                370                375                380

Asp His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln
385                390                395                400

Asp Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly
                405                410                415

Val Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu
                420                425                430

Cys Val Ser Phe Ser Arg His
                435

```

<210> 11
 <211> 423
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV E2 consensus

<400> 11

ES 2 588 738 T3

Ser Thr Lys Asp Asn Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu
 1 5 10 15
 Ala His Cys Pro Asp Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val
 20 25 30
 Ala Leu Glu Arg Ile Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile
 35 40 45
 Gln Val Ser Leu Gln Ile Gly Ile Lys Thr Asp Asp Ser His Asp Trp
 50 55 60
 Thr Lys Leu Arg Tyr Met Asp Asn His Met Pro Ala Asp Ala Glu Arg
 65 70 75 80
 Ala Gly Leu Phe Val Arg Thr Ser Ala Pro Cys Thr Ile Thr Gly Thr
 85 90 95
 Met Gly His Phe Ile Leu Ala Arg Cys Pro Lys Gly Glu Thr Leu Thr
 100 105 110
 Val Gly Phe Thr Asp Ser Arg Lys Ile Ser His Ser Cys Thr His Pro
 115 120 125
 Phe His His Asp Pro Pro Val Ile Gly Arg Glu Lys Phe His Ser Arg
 130 135 140
 Pro Gln His Gly Lys Glu Leu Pro Cys Ser Thr Tyr Val Gln Ser Thr
 145 150 155 160
 Ala Ala Thr Thr Glu Glu Ile Glu Val His Met Pro Pro Asp Thr Pro
 165 170 175
 Asp Arg Thr Leu Met Ser Gln Gln Ser Gly Asn Val Lys Ile Thr Val
 180 185 190
 Asn Gly Gln Thr Val Arg Tyr Lys Cys Asn Cys Gly Gly Ser Asn Glu
 195 200 205
 Gly Leu Thr Thr Thr Asp Lys Val Ile Asn Asn Cys Lys Val Asp Gln
 210 215 220
 Cys His Ala Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro
 225 230 235 240
 Leu Val Pro Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His
 245 250 255
 Ile Pro Phe Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg

ES 2 588 738 T3

260 265 270

Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr
275 280 285

Pro Asp His Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro
290 295 300

Asn Tyr Gln Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr
305 310 315 320

Val Pro Thr Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr
325 330 335

Lys Tyr Trp Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro
340 345 350

His Glu Ile Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val
355 360 365

Val Val Val Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met
370 375 380

Ala Ala Gly Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr
385 390 395 400

Glu Leu Thr Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys
405 410 415

Cys Ile Arg Thr Ala Lys Ala
420

<210> 12

<211> 261

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cápside de CHIKV de consenso

<400> 12

Met Glu Phe Ile Pro Thr Gln Thr Phe Tyr Asn Arg Arg Tyr Gln Pro
1 5 10 15

Arg Pro Trp Thr Pro Arg Pro Thr Ile Gln Val Ile Arg Pro Arg Pro
20 25 30

Arg Pro Gln Arg Gln Ala Gly Gln Leu Ala Gln Leu Ile Ser Ala Val
35 40 45

ES 2 588 738 T3

Asn Lys Leu Thr Met Arg Ala Val Pro Gln Gln Lys Pro Arg Arg Asn
 50 55 60
 Arg Lys Asn Lys Lys Gln Lys Gln Lys Gln Gln Ala Pro Gln Asn Asn
 65 70 75 80
 Thr Asn Gln Lys Lys Gln Pro Pro Lys Lys Lys Pro Ala Gln Lys Lys
 85 90 95
 Lys Lys Pro Gly Arg Arg Glu Arg Met Cys Met Lys Ile Glu Asn Asp
 100 105 110
 Cys Ile Phe Glu Val Lys His Glu Gly Lys Val Thr Gly Tyr Ala Cys
 115 120 125
 Leu Val Gly Asp Lys Val Met Lys Pro Ala His Val Lys Gly Thr Ile
 130 135 140
 Asp Asn Ala Asp Leu Ala Lys Leu Ala Phe Lys Arg Ser Ser Lys Tyr
 145 150 155 160
 Asp Leu Glu Cys Ala Gln Ile Pro Val His Met Lys Ser Asp Ala Ser
 165 170 175
 Lys Phe Thr His Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Tyr Asn Trp His His Gly
 180 185 190
 Ala Val Gln Tyr Ser Gly Gly Arg Phe Thr Ile Pro Thr Gly Ala Gly
 195 200 205
 Lys Pro Gly Asp Ser Gly Arg Pro Ile Phe Asp Asn Lys Gly Arg Val
 210 215 220
 Val Ala Ile Val Leu Gly Gly Ala Asn Glu Gly Ala Arg Thr Ala Leu
 225 230 235 240
 Ser Val Val Thr Trp Asn Lys Asp Ile Val Thr Lys Ile Thr Pro Glu
 245 250 255
 Gly Ala Glu Glu Trp
 260

<210> 13
 <211> 3008
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV Env de consenso

<400> 13

atggactgga	cctggatcct	gttcctggtg	gctgctgcca	cccgcgtgca	cagcagcctg	60
gccatccccg	tgatgtgcct	gctggccaac	accaccttcc	cttgacagcca	gccccctgc	120
acccccctgct	gctacgagaa	agagcccag	gaaaccctgc	ggatgctgga	agataacgtg	180
atgaggccccg	gctactacca	gctgctccag	gccagcctga	cctgctcccc	ccaccggcag	240
cggcggcgcg	ggcgcaaacg	ccgctctgcc	accatggact	ggacctggat	cctgttcctg	300
gtcgtgctg	ccacaagagt	gcacagcagc	accaaggaca	acttcaacgt	gtacaaggcc	360
acccggccct	acctggccca	ctgccccgat	tgcggcgagg	gccacagctg	ccacagcccc	420
gtggccctgg	aacggatccg	gaacgaggcc	accgacggca	ccctgaagat	ccaggtgtcc	480
ctgcagatcg	gcacaaagac	cgacgacagc	cacgactgga	ccaagctgcg	gtacatggac	540
aaccacatgc	ccgccgacgc	cgagagagcc	ggcctgttcg	tccggaccag	cgccccctgc	600
accatcacccg	gcaccatggg	ccacttcac	ctggcccggt	gccccaaagg	cgagacactg	660
accgtgggct	tcaccgacag	ccggaagatc	agccactcct	gcacccaccc	cttccaccac	720
gacccccccg	tgatcgcccg	ggagaagtcc	cacagcaggc	cccagcacgg	caaagagctg	780
ccctgcagca	cctacgtgca	gagcacccgc	gccacaaccg	aggaaatcga	ggtgcacatg	840
ccccccgata	cccccgaccg	gacctgatg	agccagcaga	gcggcaacgt	gaagatcacc	900
gtgaacggcc	agaccgtgcg	gtacaagtgc	aactgcggcg	gcagcaacga	gggcctgacc	960
accaccgaca	aggtgatcaa	caactgcaag	gtggaccagt	gccacgccgc	cgtgaccaac	1020
cacaagaagt	ggcagtagaa	cagccccctg	gtgccccgga	atgccgagct	gggcgaccgg	1080
aagggcaaga	tccacatccc	cttccccctg	gccaaactga	cctgccgggt	gccccaaagg	1140
cggaacccca	ccgtgaccta	cggaagaagc	caggtgatca	tgctgctgta	ccccgaccac	1200
cccacccctg	tgctctaccg	gaacatgggc	gaggaaacca	actaccaaga	ggagtgggtc	1260
atgcacaaga	aagaagtggg	gctgaccgtc	cccaccgagg	gcctggaagt	gacctggggc	1320
aacaacgagc	cctacaagta	ctggccccag	ctgtccacca	acggcaccgc	ccacggccac	1380
ccccacgaga	tcacccctga	ctactacgag	ctgtacccta	ccatgaccgt	ggtggtggtg	1440
tccgtggcca	cctttatcct	gctgtccatg	gtcggcatgg	ccgctggcat	gtgcatgtgc	1500
gccaggaggc	gctgtatcac	ccctacgag	ctgacacctg	gcgccaccgt	gccctttctg	1560
ctgtccctga	tctgtgcat	ccggaccgcc	aaggcccgcg	ggcgcaaacg	ccgctctgcc	1620
accatggact	ggacctggat	cctgtttctg	gtcgtgctg	ccacccgggt	gcacagctac	1680
gagcacgtga	ccgtgatccc	caacaccgtg	ggcgtgccct	acaagaccct	ggtgaacagg	1740
cccggctaca	gccccatggt	gctggaaatg	gaactgctgt	ccgtgaccct	ggaaccacc	1800
ctgagcctgg	actacatcac	ctgcgagtac	aagacagtga	tccccagccc	ctacgtgaag	1860
tgctgcggca	ccgccgagtg	caaggacaag	aacctgcccg	actacagctg	caaggtgttc	1920
accggcgtgt	accccttcac	gtggggcgga	gcctactgct	tctgcgacgc	cgagaacacc	1980

ES 2 588 738 T3

```

cagctgtccg aggccacgt ggagaagagc gagagctgca agaccgagtt cggcagcgcc      2040
taccggggccc acacagccag cgccagcgcc aagctgcggg tgctgtacca gggcaacaac      2100
atcacctgta cgcctacgc caacggcgac caccgctgta cagtgaagga cgccaagttc      2160
atcgtggggc ccatgagcag cgcttgacc cccttcgaca acaagatcgt ggtgtacaag      2220
ggcgacgtgt acaacatgga ctaccccccc ttcgagcgcg gcagaccggg ccagttcggc      2280
gacatccaga gccggacccc cgagagcaag gacgtgtacg ccaataccca gctggtgctg      2340
cagagacccg ccgtgggcac cgtgcacgtg ccttacagcc agggccccag cggcttcaag      2400
tactggctga aagagagggg cgccagcctg cagcacaccg cccccttcgg ctgccagatc      2460
gccaccaacc ccgtgcgggc cgtgaattgt gccgtgggca acatgcccat cagcatcgac      2520
atccccgagg cgccttcac cagggtggtg gacgccccca gcctgaccga catgagctgc      2580
gaggtgcccc cctgcaccca cagcagcgac ttcggcggcg tggccatcat caagtacgcc      2640
gccagcaaga aaggcaagtg cgccgtgcac agcatgacca atgccgtgac catccgggag      2700
gccgagatcg aggtggaggg caacagccag ctgcagatca gcttcagcac cgccctggcc      2760
agcgccgagt tccgggtgca ggtctgcagc acccaggtgc actgtgccgc cgagtgtcac      2820
ccccccaagg accacatcgt gaactacccc gccagccaca ccaccctggg cgtgcaggac      2880
atcagcgcca ccgccatgag ctgggtgcag aagatcacag gcggcgctcg cctggtggtg      2940
gccgtggccg ccctgatcct gatcgtggtg ctgtgcgtga gcttcagccg gcactgatga      3000
gcggccgc                                          3008

```

<210> 14
 <211> 998
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV Env de consenso

<400> 14

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
 1 5 10 15

His Ser Ser Leu Ala Ile Pro Val Met Cys Leu Leu Ala Asn Thr Thr
 20 25 30

Phe Pro Cys Ser Gln Pro Pro Cys Thr Pro Cys Cys Tyr Glu Lys Glu
 35 40 45

Pro Glu Glu Thr Leu Arg Met Leu Glu Asp Asn Val Met Arg Pro Gly
 50 55 60

Tyr Tyr Gln Leu Leu Gln Ala Ser Leu Thr Cys Ser Pro His Arg Gln

ES 2 588 738 T3

65					70						75				80
Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Lys	Arg	Arg	Ser	Ala	Thr	Met	Asp	Trp	Thr	Trp
			85						90					95	
Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Ala	Ala	Thr	Arg	Val	His	Ser	Ser	Thr	Lys
			100					105					110		
Asp	Asn	Phe	Asn	Val	Tyr	Lys		Ala	Thr	Arg	Pro	Tyr	Leu	Ala	His
		115						120					125		Cys
Pro	Asp	Cys	Gly	Glu	Gly	His	Ser	Cys	His	Ser	Pro	Val	Ala	Leu	Glu
	130					135					140				
Arg	Ile	Arg	Asn	Glu	Ala	Thr	Asp	Gly	Thr	Leu	Lys	Ile	Gln	Val	Ser
145					150					155					160
Leu	Gln	Ile	Gly	Ile	Lys	Thr	Asp	Asp	Ser	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Leu
				165					170					175	
Arg	Tyr	Met	Asp	Asn	His	Met	Pro	Ala	Asp	Ala	Glu	Arg	Ala	Gly	Leu
			180					185					190		
Phe	Val	Arg	Thr	Ser	Ala	Pro	Cys	Thr	Ile	Thr	Gly	Thr	Met	Gly	His
		195					200					205			
Phe	Ile	Leu	Ala	Arg	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Leu	Thr	Val	Gly	Phe
	210					215					220				
Thr	Asp	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	His	Ser	Cys	Thr	His	Pro	Phe	His	His
225				230						235					240
Asp	Pro	Pro	Val	Ile	Gly	Arg	Glu	Lys	Phe	His	Ser	Arg	Pro	Gln	His
				245					250					255	
Gly	Lys	Glu	Leu	Pro	Cys	Ser	Thr	Tyr	Val	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Thr
			260					265					270		
Thr	Glu	Glu	Ile	Glu	Val	His	Met	Pro	Pro	Asp	Thr	Pro	Asp	Arg	Thr
		275					280					285			
Leu	Met	Ser	Gln	Gln	Ser	Gly	Asn	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Gln
	290					295					300				
Thr	Val	Arg	Tyr	Lys	Cys	Asn	Cys	Gly	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly	Leu	Thr
305					310					315				320	
Thr	Thr	Asp	Lys	Val	Ile	Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Asp	Gln	Cys	His	Ala
				325					330					335	

Ala Val Thr Asn His Lys Lys Trp Gln Tyr Asn Ser Pro Leu Val Pro
340 345 350

Arg Asn Ala Glu Leu Gly Asp Arg Lys Gly Lys Ile His Ile Pro Phe
355 360 365

Pro Leu Ala Asn Val Thr Cys Arg Val Pro Lys Ala Arg Asn Pro Thr
370 375 380

Val Thr Tyr Gly Lys Asn Gln Val Ile Met Leu Leu Tyr Pro Asp His
385 390 395 400

Pro Thr Leu Leu Ser Tyr Arg Asn Met Gly Glu Glu Pro Asn Tyr Gln
405 410 415

Glu Glu Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr Val Pro Thr
420 425 430

Glu Gly Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr Lys Tyr Trp
435 440 445

Pro Gln Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro His Glu Ile
450 455 460

Ile Leu Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val Val Val Val
465 470 475 480

Ser Val Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met Ala Ala Gly
485 490 495

Met Cys Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr Glu Leu Thr
500 505 510

Pro Gly Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys Cys Ile Arg
515 520 525

Thr Ala Lys Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Ala Thr Met Asp Trp
530 535 540

Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Tyr
545 550 555 560

Glu His Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr
565 570 575

Leu Val Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu
580 585 590

ES 2 588 738 T3

Leu Ser Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys
 595 600 605
 Glu Tyr Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr
 610 615 620
 Ala Glu Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe
 625 630 635 640
 Thr Gly Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp
 645 650 655
 Ala Glu Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser
 660 665 670
 Cys Lys Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala
 675 680 685
 Ser Ala Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr
 690 695 700
 Ala Tyr Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe
 705 710 715 720
 Ile Val Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile
 725 730 735
 Val Val Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly
 740 745 750
 Ala Gly Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu
 755 760 765
 Ser Lys Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala
 770 775 780
 Val Gly Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys
 785 790 795 800
 Tyr Trp Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe
 805 810 815
 Gly Cys Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val
 820 825 830
 Gly Asn Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg
 835 840 845

ES 2 588 738 T3

Val Val Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro Ala
850 855 860

Cys Thr His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr Ala
865 870 875 880

Ala Ser Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala Val
885 890 895

Thr Ile Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu Gln
900 905 910

Ile Ser Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln Val
915 920 925

Cys Ser Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys Asp
930 935 940

His Ile Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp
945 950 955 960

Ile Ser Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly Val
965 970 975

Gly Leu Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu Cys
980 985 990

Val Ser Phe Ser Arg His
995

<210> 15
<211> 2954
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> CHIKV Env de consenso

<400> 15

agcctggcca tccccgtgat gtgcctgctg gccaacacca ccttcccttg cagccagccc	60
ccctgcaccc cctgctgcta cgagaaagag cccgaggaaa ccctgcggat gctggaagat	120
aacgtgatga ggcccggtcta ctaccagctg ctccaggcca gcctgacctg ctccccccac	180
cggcagcggc ggcgcgggcg caaacgccgc tctgccacca tggactggac ctggatcctg	240
ttcctggctcg ctgctgccac aagagtgcac agcagcacca aggacaactt caacgtgtac	300
aagggcaccc ggccctacct ggcccactgc cccgattgog gcgagggcca cagctgccac	360
agccccgtgg ccctggaacg gatccggaac gaggccacog acggcacccct gaagatccag	420
gtgtccctgc agatcggcat caagaccgac gacagccacg actggaccaa gctgcggtac	480

atggacaacc	acatgcccgc	cgacgcccgc	agagccggcc	tgttcgtccg	gaccagcgcc	540
ccttgaccca	tcaccggcac	catggggccac	ttcatcctgg	cccgggtgcc	caagggcgag	600
acactgaccg	tgggcttcac	cgacagccgg	aagatcagcc	actcctgcac	ccacccttc	660
caccacgacc	ccccgtgat	cgccggggag	aagtccacac	gcaggcccca	gcacggcaaa	720
gagctgccct	gcagcaccta	cgtgcagagc	accgccggcc	caaccgagga	aatcgagggtg	780
cacatgcccc	ccgatacccc	cgaccggacc	ctgatgagcc	agcagagcgg	caacgtgaag	840
atcacccgtga	acggccagac	cgtgcgggtac	aagtgcgaact	gcggcggcag	caacgagggc	900
ctgaccacca	ccgacaaggt	gatcaacaac	tgcaagggtg	accagtgccca	cgccgcccgtg	960
accaaccaca	agaagtggca	gtacaacagc	cccctggtgc	cccggaatgc	cgagctgggc	1020
gaccggaagg	gcaagatcca	catcccttc	cccctggcca	acgtgacctg	ccgggtgcc	1080
aaggccccga	acccaccgt	gacctacggc	aagaaccagg	tgatcatgct	gctgtacccc	1140
gaccacccca	ccctgctgtc	ctaccggaac	atgggcgagg	aaccctaacta	ccaagaggag	1200
tgggtcatgc	acaagaaaga	agtgggtgctg	accgtcccca	ccgagggcct	ggaagtgaac	1260
tggggcaaca	acgagcccta	caagtactgg	cccagctgt	ccaccaacgg	caccgcccac	1320
ggccaccccc	acgagatcat	cctgtactac	tacgagctgt	accctaccat	gaccgtgggtg	1380
gtgggtgtccg	tggccacctt	tatcctgctg	tccatggtcg	gcatggccgc	tggcatgtgc	1440
atgtgcgccca	ggaggcgctg	tatcaccccc	tacgagctga	cacctggcgc	caccgtgccc	1500
tttctgctgt	ccctgatctg	ctgcatccgg	accgccaaag	cccgcgggcg	caaacgccgc	1560
tctgccacca	tggactggac	ctggatcctg	tttctggtcg	ctgctgccac	ccgggtgcac	1620
agctaagagc	acgtgaccgt	gatccccaac	accgtgggcg	tgccctacaa	gaccctggtg	1680
aacaggccccg	gctacagccc	catggtgctg	gaaatggaac	tgctgtccgt	gaccctggaa	1740
cccaccctga	gctggacta	catcacctgc	gagtacaaga	cagtgatccc	cagccctac	1800
gtgaagtgtc	gcggcaccgc	cgagtgcgaag	gacaagaacc	tgcccacta	cagctgcaag	1860
gtgttcacccg	gcgtgtaccc	cttcatgtgg	ggcggagcct	actgcttctg	cgacgcccag	1920
aacacccagc	tgtccgaggg	ccacgtggag	aagagcgaga	gctgcaagac	cgagttcgcc	1980
agcgccctacc	gggcccacac	agccagcgcc	agcgccaagc	tgccgggtgct	gtaccagggc	2040
aacaacatca	ccgtgaccgc	ctacgccaac	ggcgaccacg	ccgtgacagt	gaaggacgcc	2100
aagttcatcg	tgggccccat	gagcagcgcc	tggaccccct	tgcacaacaa	gatcgtggtg	2160
tacaagggcg	acgtgtacaa	catggactac	cccccttcg	gagccggcag	acccggccag	2220
ttcggcgaca	tccagagccg	gacccccgag	agcaaggacg	tgtacgcaa	taccagctg	2280
gtgctgcaga	gacccgccgt	gggcaccgtg	cacgtgcctt	acagccaggc	ccccagcggc	2340
ttcaagtact	ggctgaaaga	gagggcgcc	agcctgcagc	acaccgcccc	cttcggctgc	2400
cagatcgcca	ccaaccccg	gcgggcccgtg	aattgtgccg	tgggcaacat	gcccatcagc	2460

ES 2 588 738 T3

```

atcgacatcc ccgaggccgc cttcaccagg gtggtggacg ccccagcct gaccgacatg      2520
agctgcgagg tggccgcctg caccacagc agcgacttcg gcggcgtggc catcatcaag      2580
tacgcgcgcca gcaagaaagg caagtgcgcg gtgcacagca tgaccaatgc cgtgaccatc      2640
cgggaggccg agatcgaggt ggagggcaac agccagctgc agatcagctt cagcacccgc      2700
ctggccagcg ccgagttccg ggtgcaggtc tgcagcacc aggtgcactg tgccgccgag      2760
tgtcaccccc ccaaggacca catcgtgaac taccgcgcca gccacaccac cctgggcgtg      2820
caggacatca gcgccaccgc catgagctgg gtgcagaaga tcacaggcgg cgtcggcctg      2880
gtggtggccg tggccgcctt gatcctgac gtggtgctgt gcgtgagctt cagccggcac      2940
tgatgagcgg ccgc                                                         2954

```

<210> 16
 <211> 980
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> CHIKV Env de consenso

<400> 16

```

Ser Leu Ala Ile Pro Val Met Cys Leu Leu Ala Asn Thr Thr Phe Pro
1                               5                               10          15

Cys Ser Gln Pro Pro Cys Thr Pro Cys Cys Tyr Glu Lys Glu Pro Glu
20                               25                               30

Glu Thr Leu Arg Met Leu Glu Asp Asn Val Met Arg Pro Gly Tyr Tyr
35                               40                               45

Gln Leu Leu Gln Ala Ser Leu Thr Cys Ser Pro His Arg Gln Arg Arg
50                               55                               60

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Ala Thr Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu
65                               70                               75          80

Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Ser Thr Lys Asp Asn
85                               90                               95

Phe Asn Val Tyr Lys Ala Thr Arg Pro Tyr Leu Ala His Cys Pro Asp
100                              105                              110

Cys Gly Glu Gly His Ser Cys His Ser Pro Val Ala Leu Glu Arg Ile
115                              120                              125

Arg Asn Glu Ala Thr Asp Gly Thr Leu Lys Ile Gln Val Ser Leu Gln
130                              135                              140

```

Ile	Gly	Ile	Lys	Thr	Asp	Asp	Ser	His	Asp	Trp	Thr	Lys	Leu	Arg	Tyr
145					150					155					160
Met	Asp	Asn	His	Met	Pro	Ala	Asp	Ala	Glu	Arg	Ala	Gly	Leu	Phe	Val
				165					170					175	
Arg	Thr	Ser	Ala	Pro	Cys	Thr	Ile	Thr	Gly	Thr	Met	Gly	His	Phe	Ile
			180					185					190		
Leu	Ala	Arg	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Thr	Leu	Thr	Val	Gly	Phe	Thr	Asp
		195					200					205			
Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	His	Ser	Cys	Thr	His	Pro	Phe	His	His	Asp	Pro
	210					215					220				
Pro	Val	Ile	Gly	Arg	Glu	Lys	Phe	His	Ser	Arg	Pro	Gln	His	Gly	Lys
225					230					235					240
Glu	Leu	Pro	Cys	Ser	Thr	Tyr	Val	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr	Glu
				245					250					255	
Glu	Ile	Glu	Val	His	Met	Pro	Pro	Asp	Thr	Pro	Asp	Arg	Thr	Leu	Met
			260					265					270		
Ser	Gln	Gln	Ser	Gly	Asn	Val	Lys	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Gln	Thr	Val
		275					280					285			
Arg	Tyr	Lys	Cys	Asn	Cys	Gly	Gly	Ser	Asn	Glu	Gly	Leu	Thr	Thr	Thr
	290					295					300				
Asp	Lys	Val	Ile	Asn	Asn	Cys	Lys	Val	Asp	Gln	Cys	His	Ala	Ala	Val
305					310					315					320
Thr	Asn	His	Lys	Lys	Trp	Gln	Tyr	Asn	Ser	Pro	Leu	Val	Pro	Arg	Asn
				325					330					335	
Ala	Glu	Leu	Gly	Asp	Arg	Lys	Gly	Lys	Ile	His	Ile	Pro	Phe	Pro	Leu
			340					345					350		
Ala	Asn	Val	Thr	Cys	Arg	Val	Pro	Lys	Ala	Arg	Asn	Pro	Thr	Val	Thr
		355					360					365			
Tyr	Gly	Lys	Asn	Gln	Val	Ile	Met	Leu	Leu	Tyr	Pro	Asp	His	Pro	Thr
	370					375					380				
Leu	Leu	Ser	Tyr	Arg	Asn	Met	Gly	Glu	Glu	Pro	Asn	Tyr	Gln	Glu	Glu
385					390					395					400

ES 2 588 738 T3

Trp Val Met His Lys Lys Glu Val Val Leu Thr Val Pro Thr Glu Gly
 405 410 415
 Leu Glu Val Thr Trp Gly Asn Asn Glu Pro Tyr Lys Tyr Trp Pro Gln
 420 425 430
 Leu Ser Thr Asn Gly Thr Ala His Gly His Pro His Glu Ile Ile Leu
 435 440 445
 Tyr Tyr Tyr Glu Leu Tyr Pro Thr Met Thr Val Val Val Ser Val
 450 455 460
 Ala Thr Phe Ile Leu Leu Ser Met Val Gly Met Ala Ala Gly Met Cys
 465 470 475 480
 Met Cys Ala Arg Arg Arg Cys Ile Thr Pro Tyr Glu Leu Thr Pro Gly
 485 490 495
 Ala Thr Val Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ile Cys Cys Ile Arg Thr Ala
 500 505 510
 Lys Ala Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Ala Thr Met Asp Trp Thr Trp
 515 520 525
 Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val His Ser Tyr Glu His
 530 535 540
 Val Thr Val Ile Pro Asn Thr Val Gly Val Pro Tyr Lys Thr Leu Val
 545 550 555 560
 Asn Arg Pro Gly Tyr Ser Pro Met Val Leu Glu Met Glu Leu Leu Ser
 565 570 575
 Val Thr Leu Glu Pro Thr Leu Ser Leu Asp Tyr Ile Thr Cys Glu Tyr
 580 585 590
 Lys Thr Val Ile Pro Ser Pro Tyr Val Lys Cys Cys Gly Thr Ala Glu
 595 600 605
 Cys Lys Asp Lys Asn Leu Pro Asp Tyr Ser Cys Lys Val Phe Thr Gly
 610 615 620
 Val Tyr Pro Phe Met Trp Gly Gly Ala Tyr Cys Phe Cys Asp Ala Glu
 625 630 635 640
 Asn Thr Gln Leu Ser Glu Ala His Val Glu Lys Ser Glu Ser Cys Lys
 645 650 655
 Thr Glu Phe Ala Ser Ala Tyr Arg Ala His Thr Ala Ser Ala Ser Ala

ES 2 588 738 T3

660	665	670
Lys Leu Arg Val Leu Tyr Gln Gly Asn Asn Ile Thr Val Thr Ala Tyr		
675	680	685
Ala Asn Gly Asp His Ala Val Thr Val Lys Asp Ala Lys Phe Ile Val		
690	695	700
Gly Pro Met Ser Ser Ala Trp Thr Pro Phe Asp Asn Lys Ile Val Val		
705	710	715
Tyr Lys Gly Asp Val Tyr Asn Met Asp Tyr Pro Pro Phe Gly Ala Gly		
725	730	735
Arg Pro Gly Gln Phe Gly Asp Ile Gln Ser Arg Thr Pro Glu Ser Lys		
740	745	750
Asp Val Tyr Ala Asn Thr Gln Leu Val Leu Gln Arg Pro Ala Val Gly		
755	760	765
Thr Val His Val Pro Tyr Ser Gln Ala Pro Ser Gly Phe Lys Tyr Trp		
770	775	780
Leu Lys Glu Arg Gly Ala Ser Leu Gln His Thr Ala Pro Phe Gly Cys		
785	790	795
Gln Ile Ala Thr Asn Pro Val Arg Ala Val Asn Cys Ala Val Gly Asn		
805	810	815
Met Pro Ile Ser Ile Asp Ile Pro Glu Ala Ala Phe Thr Arg Val Val		
820	825	830
Asp Ala Pro Ser Leu Thr Asp Met Ser Cys Glu Val Pro Ala Cys Thr		
835	840	845
His Ser Ser Asp Phe Gly Gly Val Ala Ile Ile Lys Tyr Ala Ala Ser		
850	855	860
Lys Lys Gly Lys Cys Ala Val His Ser Met Thr Asn Ala Val Thr Ile		
865	870	875
Arg Glu Ala Glu Ile Glu Val Glu Gly Asn Ser Gln Leu Gln Ile Ser		
885	890	895
Phe Ser Thr Ala Leu Ala Ser Ala Glu Phe Arg Val Gln Val Cys Ser		
900	905	910
Thr Gln Val His Cys Ala Ala Glu Cys His Pro Pro Lys Asp His Ile		
915	920	925

ES 2 588 738 T3

Val Asn Tyr Pro Ala Ser His Thr Thr Leu Gly Val Gln Asp Ile Ser
930 935 940

Ala Thr Ala Met Ser Trp Val Gln Lys Ile Thr Gly Gly Val Gly Leu
945 950 955 960

Val Val Ala Val Ala Ala Leu Ile Leu Ile Val Val Leu Cys Val Ser
965 970 975

Phe Ser Arg His
980

<210> 17
<211> 18
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

Met Asp Trp Thr Trp Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Arg Val
1 5 10 15

His Ser

<210> 18

<400> 18
000

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 13;
- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 90 % homóloga a SEQ ID NO: 15;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 250 aminoácidos;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 250 aminoácidos y que comprende además una secuencia líder de IgE;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 210 aminoácidos;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 210 aminoácidos y que comprende además una secuencia líder de IgE;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 125 aminoácidos; y
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 125 aminoácidos y que comprende además una secuencia líder de IgE.

2. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 95 % homóloga a SEQ ID NO: 13; y
- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 95 % homóloga a SEQ ID NO: 15.

3. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 98 % homóloga a SEQ ID NO: 13; y
- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 98 % homóloga a SEQ ID NO: 15.

4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 99 % homóloga a SEQ ID NO: 13; y
- una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 99 % homóloga a SEQ ID NO: 15.

5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 13;
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 15;
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 1;
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 4;
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 2;
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 5;
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 3; y
- una secuencia de ácido nucleico que comprende SEQ ID NO: 6.

6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 320 aminoácidos;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 320 aminoácidos y comprende además una secuencia líder de IgE;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 300 aminoácidos;
- una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 300 aminoácidos y comprende además una secuencia líder de IgE;

una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 160 aminoácidos; y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 160 aminoácidos y comprende además una secuencia líder de IgE.

7. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 1 que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo que consiste en:

una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 420 aminoácidos; una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E1 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 4 que codifica al menos 420 aminoácidos y comprende además una secuencia líder de IgE; una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 400 aminoácidos; una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína E2 del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 5 que codifica al menos 400 aminoácidos y comprende además una secuencia líder de IgE; una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 225 aminoácidos; y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento inmunogénico de consenso de la proteína de cápside del CHIKV de consenso y es un fragmento de SEQ ID NO: 6 que codifica al menos 225 aminoácidos y comprende además una secuencia líder de IgE.

8. Una composición que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. La composición de la reivindicación 8 en la que la molécula de ácido nucleico aislada comprende SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6.

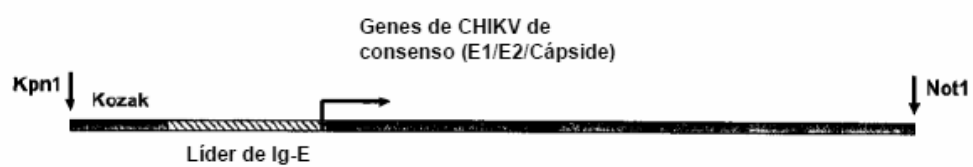
10. Una vacuna recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

11. La composición de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, o la vacuna recombinante de la reivindicación 10, para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un individuo contra el CHIKV.

12. La composición o la vacuna recombinante para el uso según la reivindicación 11, en la que la composición o la vacuna recombinante está adaptada a la administración por electroporación.

Figura 1

A



B

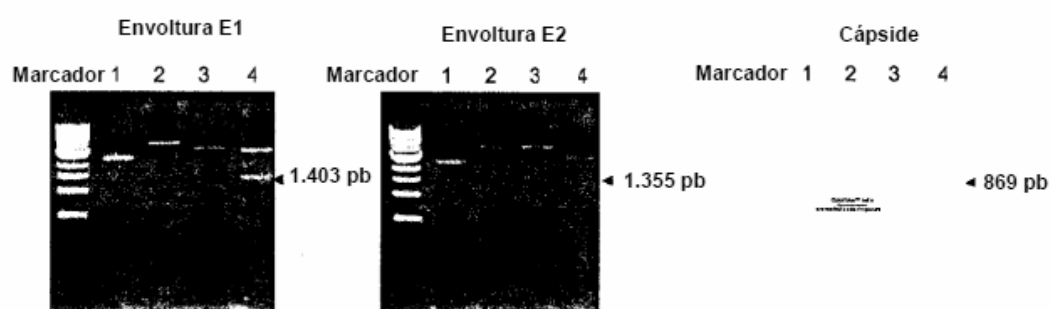


Figura 2

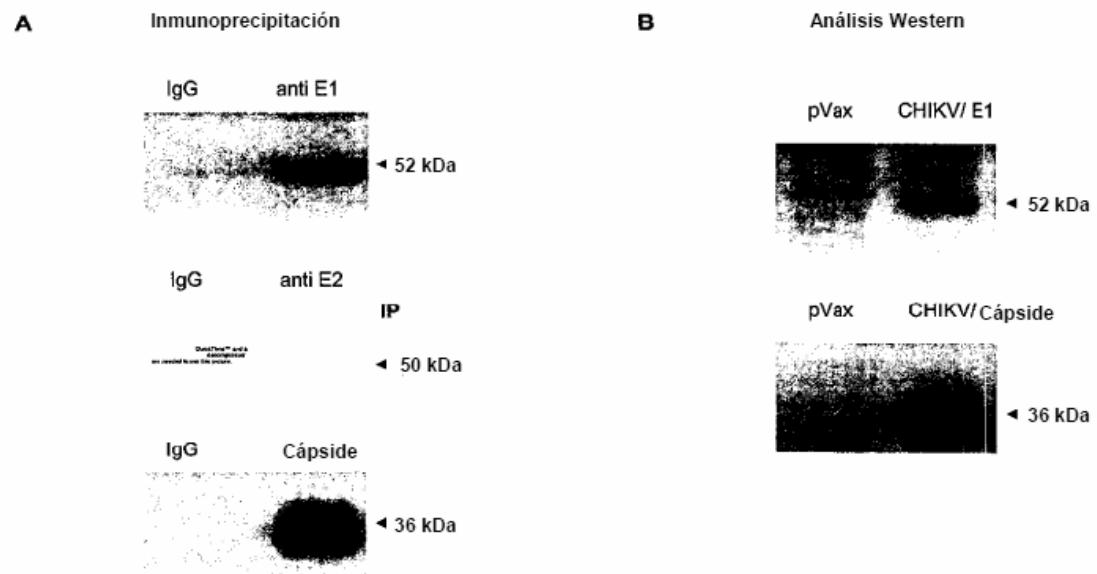


Figura 3

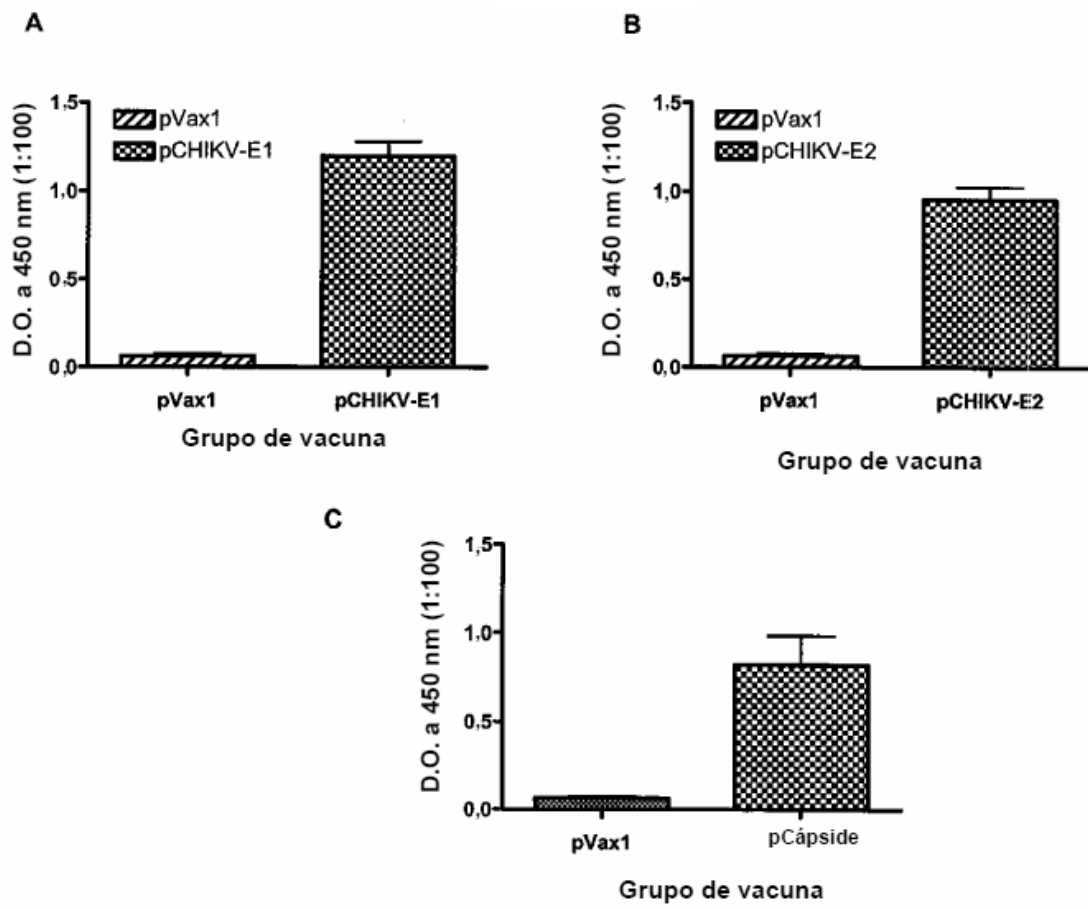


Figura 4

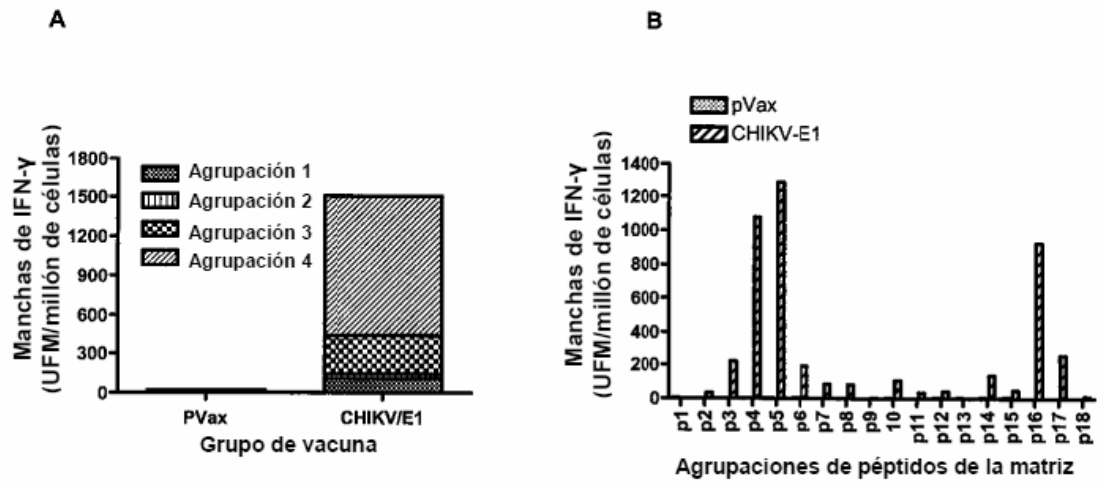


Figura 5

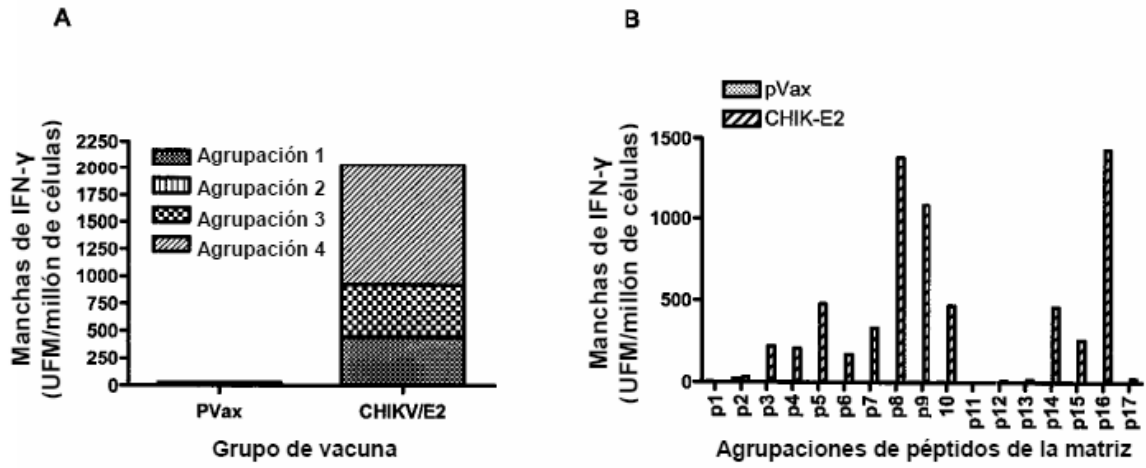


Figura 6

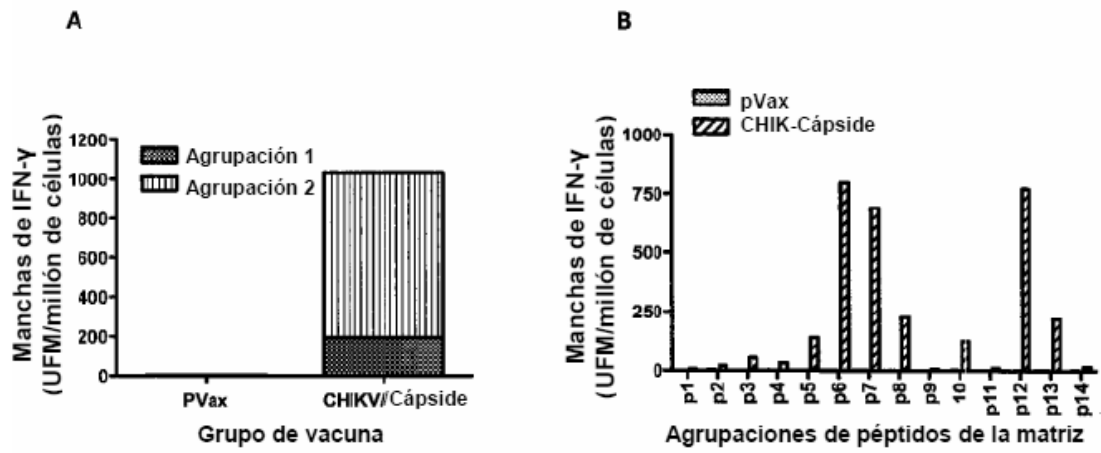


Figura 7

