

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 589 013**

51 Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2007 E 13187666 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.07.2016 EP 2708549**

54 Título: **Vacunas mejoradas para abordar la telomerasa**

30 Prioridad:

28.07.2006 US 833856 P

28.07.2006 US 833861 P

16.02.2007 US 890352 P

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

08.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WEINER, DAVID B. y
YAN, JIAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 589 013 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacunas mejoradas para abordar la telomerasa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas mejoradas contra el cáncer, y el uso de dichas vacunas en métodos mejorados para inducir respuestas inmunitarias, y para inmunizar de forma profiláctica y/o terapéutica individuos contra hTERT.

10

Antecedentes de la invención

hTERT es una transcriptasa inversa telomerasa humana que sintetiza una marca TTAGGG sobre el extremo de los telómeros para evitar la muerte celular debido a acortamiento cromosómico. Las células embrionarias y algunas células de la línea germinal normalmente expresan hTERT para regular la homeostasis de poblaciones celulares. Las células cancerosas, sin embargo, explotan este mecanismo de regulación para alterar la homeostasis de las poblaciones celulares. Por ejemplo, sucede sobreexpresión de hTERT en más del 85 % de las células cancerosas humanas. Por lo tanto, hTERT es una diana inmunoterapéutica ideal.

15

20

hTERT también puede potenciar la inmunoterapéutica contra células hiperproliferativas que expresan hTERT debido a infección por HCV o HPV. La oncoproteína E6 de los tipos de HPV de alto riesgo activa la transcripción de la transcriptasa inversa telomerasa humana (hTERT) en queratinocitos humanos. Legiones displásicas y legiones neoplásicas prematuras dentro del hígado también expresan hTERT a niveles anormalmente elevados. Por tanto, la inmunoterapia contra HPV y HCV puede potenciarse abordando células que expresan hTERT a niveles anormales. La inmunoterapia de combinación usando tanto hTERT como proteínas o ácidos nucleicos de HPV o HCV que codifican dichas proteínas es una inmunoterapia atractiva.

25

30

El documento GB 2317 891 describe hTERT (o variantes o fragmentos de la misma que tienen al menos una propiedad biológica de hTERT), anticuerpos (o fragmentos de los mismos) que se unen específicamente a la misma, y secuencias de ácido nucleico que codifican hTERT.

Sumario de la invención

35

La presente invención proporciona una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 35 y fragmentos de SEQ ID NO: 35 que comprenden 1140 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde dichos fragmentos son inmunógenos que potencian las respuestas inmunitarias celulares contra hTERT.

40

Se proporcionan proteínas que comprenden secuencias de aminoácidos consenso de hTERT y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica dichas proteínas.

45

La presente invención se refiere adicionalmente a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste: SEQ ID NO: 34; fragmentos de la misma que comprenden 3420 o más nucleótidos de la SEQ ID NO: 34; secuencias de nucleótidos que tienen al menos un 95% de similitud con la SEQ ID NO: 34.

50

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dichas moléculas de ácido nucleico y al uso de la composición farmacéutica en el método de inducción de una respuesta inmunitaria en un individuo contra células hiperproliferativas que expresan hTERT.

55

La presente invención se refiere adicionalmente a vacunas recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico.

La presente invención se refiere adicionalmente a patógenos atenuados vivos que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico.

60

La presente invención también se refiere a moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 35; fragmentos que comprenden 1140 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, donde dichos fragmentos son inmunógenos que potencian la respuesta inmunitaria celular contra hTERT.

65

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas y al uso de la composición farmacéutica en un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un individuo contra células hiperproliferativas que expresan hTERT. La presente invención también se refiere a vacunas recombinantes que comprenden dichas proteínas. La presente invención también se refiere a patógenos atenuados vivos que

comprenden dichas proteínas.

Breve descripción de las figuras

- 5 La Figura 1 muestra una comparación de las secuencias de aminoácidos de EY2E1-B y EK2P-B. La secuencia líder de IgE está subrayada. Las regiones en recuadro muestran regiones variables. El * indica seis restos importantes implicados en la utilización de CCR5. El sitio de escisión está indicado por una flecha. El dominio transmembrana se muestra por la línea punteada.
- 10 La Figura 2 muestra relaciones filogenéticas de dos secuencias de envuelta de VIH-1 subtipo B. Se incluyeron cuarenta y dos secuencias de envuelta de VIH-1 subtipo B, EY2E1-B, EK2P-B, dos secuencias de subtipo D y dos de subtipo C (grupo externo) en el análisis filogenético. Las secuencias de envuelta de subtipo B que representan una amplia muestra de diversidad fueron de los 11 siguientes países: Argentina (1); Australia (6); China (1); Francia (4); Alemania (1); Gran Bretaña (2); Italia (1); Japón (1); Países Bajos (4); España (1); Estados Unidos (20). Las secuencias EY2E1-B y EK2P-B se muestran en recuadros negros.
- 15 La Figura 3 muestra la expresión de inmunógenos de envuelta. El Panel A muestra los resultados de análisis de transferencia de Western de los genes EY2E1-B y EK2P-B. Se transfectaron células RD con diferentes plásmidos. 48 horas después, se recogieron los lisados celulares. Las muestras se analizaron por transferencia de Western y se sondearon con anticuerpo monoclonal contra gp120 de VIH-1 (2G12). En cuanto al control de carga, la transferencia se separó y se volvió a sondear con anticuerpo monoclonal antiactina. El Panel B muestra los resultados del ensayo de inmunofluorescencia de los genes EY2E1-B y EK2P-B. Las células RD transfectadas que expresan proteínas de envuelta mostraron fluorescencia roja típica. El anticuerpo monoclonal específico de envuelta de VIH-1 F105 sirvió como fuente de anticuerpo primario.
- 20 La Figura 4 muestra los títulos totales de anticuerpo IgG en los sueros de los ratones inmunizados. El Panel A muestra la medición de respuestas de anticuerpo específicas de envuelta de subtipo B. El Panel B muestra la medición de respuestas de anticuerpo específicas de envuelta de subtipo A/E. El Panel C muestra la medición de respuestas de anticuerpo específico de envuelta de subtipo C. Se detectaron respuestas inmunitarias humorales después de inmunización con construcciones de ADN pEY2E1-B y pEK2P-B por ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Cada ratón se inmunizó por vía intramuscular tres veces, cada una de 100 µg de ADN a intervalos bisemanales. Los ratones de cada grupo (n=3) se exanguinaron una vez a la semana después de la tercera inmunización y sueros combinados de igual forma se diluyeron en tampón de bloqueo y se analizaron como se describe en materiales y métodos. Los sueros combinados recogidos de ratones inmunizados con pVAX se usaron como control. Se midió la absorbancia (DO) a 450 nm. Cada dato puntual representa el promedio de tres valores de DO de tres sueros de ratones por grupo y los valores representan la media de ELISA obtenida en tres ensayos diferentes.
- 25 La Figura 5 muestra la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células por pEY2E1-B tanto en ratones BalB/C como ratones transgénicos HLA-A2. Se determinaron las frecuencias de células formadoras de manchas (SFC) de IFN-γ específicas de envuelta consenso de subtipo B por millón de esplenocitos después de vacunación de ADN con pEY2E1-B y pEK2P-B por ensayo ELISpot tanto en ratones BalB/C (Panel A) como en ratones transgénicos (Panel C). También se determinaron las frecuencias de células formadoras de manchas de IFN-γ específicas de envuelta consenso de subtipo B, CD8 reducidas por millón de esplenocitos después de vacunación de ADN con pEY2E1-B y pEK2P-B tanto en ratones BalB/C (Panel B) como en ratones transgénicos (Panel D). Los esplenocitos se aislaron de ratones inmunizados individuales (tres ratones por grupo) y se estimularon *in vitro* con combinaciones de péptidos solapantes de envuelta de subtipo B consenso. Se incluyeron ratones inmunizados con pVAX estructural como control negativo. Los valores son las medias + desviaciones típicas de la media de IFN-γ SCF. (Panel E) Caracterización de epítomos dominantes específicos de envuelta consenso de subtipo B. Los esplenocitos recogidos de ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B y pEK2P-B respectivamente, se cultivaron con 29 combinaciones de péptido de envuelta consenso de subtipo B de VIH-1 durante 24 horas. Se determinaron células secretoras de IFN-γ por ensayo ELISpot como se ha descrito anteriormente.
- 30 La Figura 6 muestra reactividad cruzada inducida por pEY2E1-B tanto en ratones BalB/C como en ratones transgénicos HLA-A2. Las respuestas inmunitarias de células T aditivas en ratones BalB/C inducidas por vacunación con pEY2E1-B y pEK2P-B contra cuatro combinaciones de péptidos individuales de péptidos de envuelta MN de VIH-1 (Panel A), grupo M de VIH-1 (Panel B), péptidos de envuelta consenso de subtipo C (Panel C) y dos péptidos de envuelta de aislado de subtipo C (Paneles D y E) se midieron por ensayo ELISpot de IFN-γ. También se midieron las respuestas inmunitarias de células T aditivas en ratones transgénicos HLA-A2 inducidas por vacunación con pEY2E1-B y pEK2P-B contra cuatro combinaciones de péptidos individuales de péptidos de envuelta MN de VIH-1 (Panel F), grupo M de VIH-1 (Panel G), péptidos de envuelta consenso subtipo C (Panel H) y dos péptidos de envuelta de aislado de subtipo C (Paneles I y J). Se incluyeron ratones inmunizados con pVAX estructural como control negativo.
- 35 La Figura 7 muestra la caracterización de epítomos dominantes específicos de envuelta MN de subtipo B tanto en ratones BalB/C (Panel A) como ratones transgénicos HLA-A2 (Panel B) inmunizados con pEY2E1-B y pEK2P-B. Los esplenocitos recogidos de ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B y pEK2P-B y ratones transgénicos, respectivamente, se cultivaron con 29 combinaciones de péptidos de envuelta MN de subtipo B de VIH-1 durante 24 horas. Se determinaron las células secretoras de IFN-γ por ensayo ELISpot como se ha descrito anteriormente.
- 40 La Figura 8 muestra una representación esquemática de dominios funcionales de E72E1-B (aproximadamente

700+ aminoácidos).

La Figura 9 muestra un mapa de la construcción E72E1-B.

La Figura 10, Paneles A y B muestra que se induce una fuerte respuesta inmunitaria celular por E72E1-B.

La Figura 11, Paneles A y B muestra que se inducen respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada fuertes y amplias por E72E1-B.

La Figura 12 Paneles A-D, muestra que se inducen fuertes respuestas inmunitarias celulares de clado cruzado por E72E1-B.

La Figura 13 representa el inmunógeno diseñado para el estudio en el Ejemplo 2.

La Figura 14 muestra relaciones filogenéticas: Se incluyeron treinta y seis secuencias de envuelta de subtipo C de VIH-1, EY3E1-C, EK3P-C, dos secuencias de subtipo B, una de subtipo A y una de subtipo D (grupo externo) en el análisis filogenético. Las secuencias de envuelta de subtipo C que representan una amplia muestra de diversidad eran de 12 países.

La Figura 15, Paneles A y B, muestra datos de estudios de respuesta celular provocada por pEY3E1-C.

La Figura 16 muestra datos de estudios de respuestas celulares provocadas por pEY3E1-C.

La Figura 17, Paneles A-D, muestra datos de estudios de respuestas celulares de reactividad cruzada provocadas por pEY3E1-C dentro del mismo clado.

La Figura 18, Paneles A y B, muestra datos de estudios de respuestas celulares de reactividad cruzada provocadas por pEY3E1-C. El Panel A muestra datos de ELISpot de IFN- γ específica de env de subtipo C (Uruguay). El Panel B muestra datos de ELISpot de IFN- γ específica de env de subtipo C (Sudáfrica).

La Figura 19, Paneles A-F, muestra datos de estudios de respuestas celulares de reactividad cruzada provocadas por pEY3E1-C entre clados.

La Figura 20, paneles A-X, muestra datos de estudios de respuestas inmunitarias provocadas por construcciones consenso de gag de VIH-1.

La Figura 21 ilustra el ciclo vital de HPV en el epitelio del tracto genital.

La Figura 22 muestra un mapa de la organización del genoma de HPV-16.

La Figura 23 ilustra el diseño de inmunógeno: * se refiere a delecciones o mutaciones importantes para la unión y degradación de p53; Δ se refiere a mutaciones en el sitio de unión de Rb.

La Figura 24 incluye una ilustración de la construcción genética p1667 que incluye secuencias codificantes para las proteínas E6 y E7 de HPV, y pVAX, el plásmido estructural que carece del inserto de HPV y se usa como control negativo.

La Figura 25, Paneles A-D, muestran respuestas inmunitarias celulares inducidas por el inmunógeno de ADN p1667.

La Figura 26 muestra resultados del mapeo de epítomos inmunodominantes.

La Figura 27 muestra los resultados de experimentos profilácticos usando vacuna de ADN de E6/E7 para estudiar la protección en ratones C57/BL6.

La Figura 28 muestra resultados de los experimentos de regresión tumoral usando vacuna de ADN de E6/E7 para estudiar la protección en ratones C57/BL6.

La Figura 29 muestra los datos de experimentos que detectan linfocitos positivos a tetrámero E7 en bazos.

La Figura 30 muestra los datos de experimentos que detectan linfocitos positivos a tetrámero E7 en tumores.

La Figura 31 muestra datos de un estudio de protección con vacuna de ADN en ratones transgénicos.

La Figura 32 muestra respuestas inmunitarias celulares potenciadas contra inmunógenos consenso de VIH-1 con coinyección IM de IL-12 codificada por el plásmido seguida por electroporación (EP). Se realizaron ELISpot de IFN- γ dos semanas después de (a) la primera inmunización, (b) la segunda inmunización y (c) la tercera inmunización (como se observa en comparación con las otras tres). Las respuestas contra env se representan como barras negras y gag se representan como barras blancas con los datos mostrados como respuestas medias de grupo apiladas \pm ETM.

La Figura 33 muestra respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada potenciadas con electroporación intramuscular. Después de tres inmunizaciones, se determinó la respuesta inmunitaria de células T total en macacos inmunizados con pEY2E1-B contra cuatro combinaciones de péptidos de los péptidos de grupo M de VIH-1 por ELISpot de IFN- γ . Los datos se muestran como medias de grupo apiladas \pm ETM.

La Figura 34 muestra las respuestas de memoria potenciadas contra inmunógenos de VIH-1 con electroporación IM e IL-12 de plásmido. Cinco meses después de la última inmunización, se realizaron ensayos ELISpot para determinar las respuestas de memoria específicas de antígeno contra gag y env en los grupos inmunizados IM y EP con y sin coinmunización con el plásmido de IL-12. Los datos se muestran como respuestas medias de grupo \pm ETM.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Definiciones

Como se usa en este documento, la expresión "condiciones rigurosas de hibridación" o "condiciones rigurosas" se refiere a condiciones en las que una molécula de ácido nucleico hibridará con otra molécula de ácido nucleico, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. En líneas generales, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean 5 °C inferiores al punto de fusión térmica (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH

y concentración de ácido nucleico definidos) a la que el 50 % de las sondas complementarias a la secuencia diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio. Como las secuencias diana están presentes generalmente en exceso, a T_m , el 50 % de las sondas están ocupadas en equilibrio. Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en que la concentración salina es menor de aproximadamente 1,0 M de iones sodio, normalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de iones sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas, cebadores u oligonucleótidos cortos (por ejemplo, 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas, cebadores u oligonucleótidos más largos. Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida.

La homología de secuencia para nucleótidos y aminoácidos puede determinarse usando el software FASTA, BLAST y Gapped BLAST (Altschul *et al.*, Nuc. Acids Res., 1997, 25, 3389) y 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 promedio de la secuencia consenso se calcula en comparación con todas las secuencias en el árbol filogenético (véanse las Figuras 2 y 14).

En resumen, el algoritmo BLAST, que significa Basic Local Alignment Search Tool, es adecuado para determinar la similitud de secuencia (Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410). El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo implica identificar primero un par de secuencias de alta valoración (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta que equivalga o satisfaga algún valor T umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se menciona como el umbral de valor de palabra adyacente (Altschul *et al.*, supra). Estos aciertos de palabra adyacente iniciales actúan como semillas para iniciar búsqueda para encontrar HSP que los contengan. Los aciertos de palabras se prolongan en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia lo más posible que pueda aumentarse el valor de alineación acumulativo. La prolongación para los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: 1) el valor de alineación acumulativo disminuye en una cantidad X de su valor máximo conseguido; 2) el valor acumulativo llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos de valoración negativa; o 3) se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de valoración BLOSUM62 (véase Henikoff *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1992, 89, 10915-10919), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=4$, y una comparación de ambas hebras. El algoritmo BLAST (Karlin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 5873-5787) y Gapped BLAST realizan un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual sucedería un acoplamiento entre dos secuencias de nucleótidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a otro si la probabilidad de suma más pequeña en comparación del ácido nucleico de ensayo con el otro ácido nucleico es menor de aproximadamente 1, preferiblemente menor de aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y mucho más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

Como se usa en este documento, la expresión "construcción genética" se refiere a las moléculas de ADN o ARN que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína. La secuencia codificante incluye señales de inicio y terminación unidas de forma funcional a elementos reguladores que incluyen un promotor y una señal de poliadenilación capaz de dirigir la expresión en las células del individuo al cual se administra la molécula de ácido nucleico.

Como se usa en este documento, la expresión "forma expresable" se refiere a construcciones génicas que contienen los elementos reguladores necesarios unidos de forma funcional a una secuencia codificante que codifica una proteína de modo que cuando están presentes en la célula del individuo, se expresará la secuencia codificante.

Visión global

En el sentido más general, la invención se refiere a secuencias consenso de hTERT como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona vacunas mejoradas utilizando una estrategia multifase para potenciar las respuestas inmunitarias celulares inducidas por inmunógenos. Se generaron secuencias consenso modificadas para inmunógenos. También se describen modificaciones genéticas incluyendo optimización de codones, optimización de ARN y la adición de una secuencia líder de inmunoglobina de alta eficacia para aumentar la inmunogenicidad de las construcciones. Los inmunógenos novedosos se han diseñado para provocar respuestas inmunitarias celulares más fuertes y más amplias que los correspondientes inmunógenos de codones optimizados.

La invención proporciona vacunas mejoradas contra el cáncer proporcionando proteínas y construcciones genéticas que codifican proteínas con epítomos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos contra las que pueden inducirse respuestas inmunitarias anti-hTERT. Por consiguiente, pueden proporcionarse vacunas para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica. En algunas realizaciones, el medio para suministrar el inmunógeno es una vacuna de ADN, una vacuna recombinante, una vacuna de subunidad de proteína, una

composición que comprende el inmunógeno, una vacuna atenuada o una vacuna inactivada. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una combinación seleccionada de los grupos que consisten en: una o más vacunas de ADN, una o más vacunas recombinantes, una o más vacunas de subunidad de proteína, una o más composiciones que comprenden el inmunógeno, una o más vacunas atenuadas y una o más vacunas inactivadas.

5 Una vacuna de acuerdo con la invención puede suministrarse a un individuo para modular la actividad del sistema inmunitario del individuo y de ese modo potenciar la respuesta inmunitaria contra hTERT. Cuando se capta una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína por las células del individuo, la secuencia de nucleótidos se expresa en las células y de ese modo la proteína se suministra al individuo.

10 De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones y métodos que inmunizan de forma profiláctica y/o terapéutica a un individuo contra hTERT.

15 La presente invención se refiere a composiciones para suministrar moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la invención unida de forma funcional a elementos reguladores. Aspectos de la presente invención se refieren a composiciones de una vacuna recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de la invención; un patógeno atenuado vivo que codifica una proteína de la invención y/o incluye una proteína de la invención; un patógeno inactivado que incluye una proteína de la invención; o una composición tal como un liposoma o vacuna de subunidad que comprende una proteína de la invención. La presente invención se refiere adicionalmente a composiciones farmacéuticas inyectables que comprenden composiciones.

hTERT

25 hTERT es una transcriptasa inversa telomerasa humana que sintetiza una marca TTAGGG sobre el extremo de los telómeros para prevenir la muerte celular debido a acortamiento de los cromosomas. Las células hiperproliferativas con expresión anormalmente alta de hTERT pueden abordarse por inmunoterapia. Estudios recientes también apoyan la expresión anormal de hTERT en células hiperproliferativas infectadas con HCV y HPV. Por tanto, la inmunoterapia tanto para HPV como HCV puede potenciarse abordando células que expresan hTERT a niveles anormales.

35 Estudios recientes demuestran que la expresión de hTERT en células dendríticas transfectadas con genes de hTERT puede inducir células T citotóxicas CD8+ y producir células T CD4+ de un modo específico de antígeno. Por lo tanto, el uso de la expresión de hTERT en células presentadoras de antígeno (APC) para retardar la senescencia y sostener su capacidad de presentar el antígeno de elección es atractivo en el desarrollo de nuevos métodos de inmunoterapia.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, los métodos de inducción de una respuesta inmunitaria en individuos contra un inmunógeno comprenden administrar al individuo la proteína hTERT y fragmentos funcionales de la misma o secuencias codificantes expresables de la misma en combinación con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de la invención y/o una vacuna recombinante que codifica la proteína de la invención y/o una vacuna de subunidad de la proteína de la invención y/o una vacuna atenuada viva y/o una vacuna inactivada.

45 También se describen en este documento vacunas que incluyen la SEQ ID NO: 30 y una secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de ácido nucleico de la misma seleccionadas del siguiente grupo: SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35 y cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones de la invención, las vacunas de la invención comprenden la SEQ ID NO: 34 o la SEQ ID NO: 35. La SEQ ID NO: 34 comprende la secuencia de ácido nucleico que codifica hTERT. La SEQ ID NO: 35 comprende la secuencia de aminoácidos para hTERT.

50 También se describen en este documento vacunas que comprenden la SEQ ID NO: 22 y la SEQ ID NO: 34 o la SEQ ID NO: 35. El uso de secuencias de ácido nucleico que codifican hTERT y/o la proteína de hTERT en combinación con los inmunógenos de HPV potencia la respuesta inmunitaria mediada por células contra células infectadas por HPV.

60 Los fragmentos de la SEQ ID NO: 34 puede comprender 3420 o más nucleótidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 34 pueden comprender 3480 o más nucleótidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 34 pueden comprender secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 34 no comprenden secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE.

65 Los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1140 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1170 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencia que codifican un epítipo

5 inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1200 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1230 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1260 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1290 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1320 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1350 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1380 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1410 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1440 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1470 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender 1500 o más aminoácidos, incluyendo preferiblemente secuencias que codifican un epítipo inmunodominante. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 pueden comprender secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE. En algunas realizaciones, los fragmentos de la SEQ ID NO: 35 no comprenden secuencias codificantes para las secuencias líder de IgE.

25 Vacunas que abordan hTERT

5 La invención proporciona vacunas mejoradas proporcionando proteínas y construcciones genéticas que codifican proteínas con epítipos que las hacen particularmente eficaces como inmunógenos contra las que pueden inducirse respuestas inmunitarias. Por consiguiente, pueden proporcionarse vacunas para inducir una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica. En algunas realizaciones, el medio para suministrar el inmunógeno es una vacuna de ADN, una vacuna recombinante, una vacuna de subunidad de proteína, una composición que comprende el inmunógeno, una vacuna atenuada o una vacuna inactivada. En algunas realizaciones, la vacuna comprende una combinación seleccionada de los grupos que consisten en: una o más vacunas de ADN, una o más vacunas recombinantes, una o más vacunas de subunidad de proteína, una o más composiciones que comprenden el inmunógeno, una o más vacunas atenuadas y una o más vacunas inactivadas.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, una composición de acuerdo con la invención es para su uso en la modulación de la actividad del sistema inmunitario del individuo y de ese modo en la potenciación de la respuesta inmunitaria. Cuando una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína se capta por las células del individuo, se expresa la secuencia de nucleótidos en las células y de ese modo se suministra la proteína al individuo. Aspectos de la invención proporcionan secuencias codificantes de la proteína sobre la molécula de ácido nucleico tales como plásmidos, como parte de vacunas recombinantes y como parte de vacunas atenuadas, como proteínas aisladas o proteínas como parte de un vector.

15 De acuerdo con algunos aspectos de la presente invención, se proporcionan composiciones que inmunizan de forma profiláctica y/o terapéutica a un individuo.

20 Las vacunas de ADN se describen en las patentes de Estados Unidos 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 de prioridad citadas en las mismas. Además de los protocolos de suministro descritos en estas solicitudes, se describen métodos alternativos de suministro de ADN en las patentes de Estados Unidos n.º 4.945.050 y 5.036.006.

25 La presente invención se refiere a vacunas vivas atenuadas mejoradas, vacunas inactivadas mejoradas y vacunas mejoras que usan vectores recombinantes para suministrar genes foráneos que codifican antígenos y también como vacunas de subunidad y glucoproteína. Ejemplos de vacunas vivas atenuadas, aquellas que usan vectores recombinantes para suministrar antígenos foráneos, vacunas de subunidad y vacunas de glucoproteínas se describen en las patentes de Estados Unidos n.º 4.510.245; 4.797.368; 4.722.848; 4.790.987; 4.920.209; 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; 5.474.935; 5.482.713; 5.591.439; 5.643.579; 5.650.309; 5.698.202; 5.955.088; 6.034.298; 6.042.836; 6.156.319 y 6.589.529.

30 Cuando se captan por una célula, la construcción o construcciones genéticas pueden permanecer presentes en las células como una molécula extracromosómica funcional y/o integrarse en el ADN cromosómico de la célula. El ADN puede introducirse en las células donde permanece como material genético separado en forma de un plásmido o plásmidos. Como alternativa, puede introducirse ADN lineal que puede integrarse en el cromosoma en la célula. Cuando se introduce ADN en la célula, pueden añadirse reactivos que promueven la integración del ADN en los cromosomas. Las secuencias de ADN que son útiles para promover la integración también pueden incluirse en la

molécula de ADN. Como alternativa, puede administrarse 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 permanecer como parte del material genético en microorganismos vivos atenuados o vectores microbianos recombinantes que viven en las células. Las construcciones génicas pueden ser parte de genomas de vacunas víricas recombinantes donde el material genético se integra en el cromosoma de la célula o permanece de forma extracromosómica. 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 inicio, un codón de parada y una señal de poliadenilación. Además, a menudo se requieren potenciadores para expresión génica de la secuencia que codifica la proteína diana o la proteína inmunomoduladora. Es necesario que estos elementos estén unidos de forma funcional a la secuencia que codifica las proteínas deseadas y que los elementos reguladores sean funcionales en el individuo al cual se administran.

Los codones de inicio y los codones de parada se consideran en líneas generales como parte de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína deseada. Sin embargo, es necesario que estos elementos sean funcionales en el individuo al cual se administra la construcción génica. Los codones de inicio y terminación deben estar en fase con la secuencia codificante.

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

Ejemplos de promotores útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, aunque sin limitación, promotores del virus de simio 40 (SV40), promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) tal como el promotor de la repetición terminal larga (LTR) de BIV, virus de Moloney, ALV, citomegalovirus (CMV) tal como el promotor temprano inmediato de 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 muscular humana y metalotioneína humana.

Ejemplos de señales de poliadenilación útiles para poner en práctica la presente invención, especialmente la producción de una vacuna genética para seres humanos, incluyen, aunque sin limitación, señales de poliadenilación de SV40 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 CA), mencionado como la señal de poliadenilación de SV40.

Además de los elementos reguladores necesarios para la expresión de ADN, también pueden incluirse otros elementos en la molécula de ADN. Dichos elementos adicionales incluyen potenciadores. El potenciador puede seleccionarse del grupo que incluye, aunque sin limitación: potenciadores de actina humana, miosina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y víricos tales como los de CMV, RSV y EBV.

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

En algunas realizaciones preferidas relacionadas con aplicaciones de inmunización, se suministra una o más moléculas de ácido nucleico que incluyen secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de la invención y, adicionalmente, genes para proteínas que potencian adicionalmente la respuesta inmunitaria contra dichas proteínas diana. Ejemplos de dichos genes son aquellos que codifican otras citoquinas y linfoquinas tales como interferón-alfa, interferón-gamma, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TNF α , TNF β , GM-CSF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, MHC, CD80, CD86 e IL-15 incluyendo IL-15 que tiene la secuencia señal deletionada e incluyendo opcionalmente el péptido señal de IgE. Otros genes que pueden ser útiles incluyen aquellos que codifican: MCP-1, MIP-1 α , MIP-1p, IL-8, RANTES, L-selectina, P-selectina, E-selectina, CD34, GlyCAM-1, MadCAM-1, LFA-1, VLA-1, Mac-1, p150.95, PECAM, ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, CD2, LFA-3, M-CSF, G-CSF, IL-4, formas mutantes de IL-18, CD40, CD40L, factor de crecimiento vascular, IL-7, factor de crecimiento de nervios, factor de crecimiento del endotelio vascular, Fas, receptor de TNF, Flt, Apo-1, p55, WSL-1, DR3, TRAMP, Apo-3, AIR, LARD, NGRF, DR4, DR5, KILLER, TRAIL-R2, TRICK2, DR6, Caspasa ICE, Fos, c-jun, Sp-1, Ap-1, Ap-2, p38, p65Rel, MyD88, IRAK, TRAF6, I κ B, NIK inactiva, SAP K, SAP-1, JNK, genes de respuesta a interferón, NF κ B, Bax, TRAIL, TRAILrec, TRAILrecDRC5, TRAILR3, TRAIL-R4, RANK, ligando de RANK, Ox40, ligando de Ox40, NKG2D, MICA, MICB, NKG2A, NKG2B, NKG2C, NKG2E, NKG2F, TAP1, TAP2 y fragmentos funcionales de los mismos.

Puede añadirse un elemento adicional que sirve como diana para de destrucción celular si es deseable eliminar células que reciben la construcción genética por cualquier razón. Puede incluirse un gen de la timidina quinasa (tk) de herpes en una forma expresable en la construcción genética. El fármaco gangcyclovir puede administrarse al individuo y ese fármaco causará la eliminación selectiva de cualquier célula que produzca tk, por tanto, proporcionando el medio para la destrucción selectiva de células con la construcción genética.

Para maximizar la producción de proteína, pueden seleccionarse secuencias reguladoras que serán muy adecuadas para la expresión génica en las células a las que se administra la construcción. Además, pueden seleccionarse codones que se transcriben de forma más eficaz en la célula. Un experto en la materia puede producir construcciones de ADN que son funcionales en las células.

5 En algunas realizaciones, pueden proporcionarse construcciones génicas en que las secuencias codificantes para las proteínas descritas en este documento están ligadas al péptido señal de IgE. En algunas realizaciones, las proteínas descritas en este documento se ligan al péptido señal de IgE.

10 En algunas realizaciones para las cuales se usa la proteína como por ejemplo, un experto en la materia puede, usando técnicas bien conocidas, producir y aislar proteínas de la invención usando técnicas bien conocidas. En algunas realizaciones para las cuales se usa la proteína, por ejemplo, un experto en la materia puede, usando técnicas bien conocidas, insertar moléculas de ADN que codifican una proteína de la invención en un vector de expresión disponible en el mercado para su uso en sistema expresión bien conocidos. Por ejemplo, el plásmido disponible en el mercado pSE420 (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede usarse para la producción de proteínas en *E. coli*. El plásmido disponible en el mercado pYES2 (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede usarse, por ejemplo, para la producción en cepas de levadura de *S. cerevisiae*. El sistema de expresión de baculovirus completo MAXBAC™ disponible en el mercado (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede usarse, por ejemplo, para la producción en células de insecto. El plásmido disponible en el mercado pcDNA1 o pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, Calif.) puede usarse, por ejemplo, para la producción en células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino. Un experto en la materia puede usar estos vectores y sistemas de expresión comerciales u otros para producir proteínas por técnicas rutinarias y materiales de partida fácilmente disponibles. (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Segunda Ed. Cold Spring Harbor Press (1989).) Por tanto, las proteínas deseadas pueden prepararse tanto en sistemas procariontes como eucariotes, produciendo un espectro de formas procesadas de la proteína.

Un experto en la materia puede usar otros vectores y sistemas de expresión disponibles en el mercado o producir vectores usando métodos bien conocidos y materiales de partida fácilmente disponibles. Los sistemas de expresión que contienen las secuencias de control necesarias, tales como promotores y señales de poliadenilación, y preferiblemente potenciadores, están fácilmente disponibles y son conocidos en la técnica para una diversidad de hospedadores. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning a Laboratory Manual, Segunda Ed. Cold Spring Harbor Press (1989). Las construcciones genéticas incluyen la secuencia codificante de la proteína unida de forma funcional a un promotor que es funcional en la línea celular a la que se transfectan las construcciones. Ejemplos de promotores constitutivos incluyen promotores de citomegalovirus o SV40. Ejemplos de promotores inducibles incluyen promotores del virus de la leucemia mamaria de ratón o de la metalotioneína. Los expertos en la materia pueden producir fácilmente construcciones genéticas útiles para su transfección con células con ADN que codifica la proteína de la invención a partir de materiales de partida fácilmente disponibles. El vector de expresión que incluye el ADN que codifica la proteína se usa para transformar el hospedador compatible que después se cultiva y mantiene en condiciones donde tiene lugar la expresión del ADN foráneo.

La proteína producida se recupera del cultivo, lisando las células o a partir del medio de cultivo según lo apropiado y lo conocido por los expertos en la materia. Un experto en la materia puede aislar, usando técnicas bien conocidas, la proteína que se produce usando dichos sistemas de expresión. Los métodos de purificación de la proteína a partir de fuentes naturales usando anticuerpos que se unen específicamente a una proteína específica como se ha descrito anteriormente pueden aplicarse igualmente para purificar la proteína producida por metodología de ADN recombinante.

Además de producir proteínas por técnicas recombinantes, también pueden emplearse sintetizadores automatizados de péptidos para producir la proteína aislada, esencialmente pura. Dichas técnicas son bien conocidas para los expertos en la materia y son útiles si son derivados que tienen sustituciones no proporcionados en la producción de proteína codificada por ADN.

Las moléculas de ácido nucleico pueden suministrarse usando cualquiera de las varias tecnologías bien conocidas incluyendo inyección de ADN (también mencionada como vacunación de ADN), vectores recombinantes tales como adenovirus recombinantes, virus asociados a adenovirus recombinante y vaccinia recombinante.

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

En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se suministra a las células junto con la administración de un potenciador de función polinucleotídica o un agente facilitador de vacuna genética. Los potenciadores de función polinucleotídica se describen en los documentos de Estados Unidos con número de serie 5.593.972, 5.962.428 y la

solicitud internacional con número de serie PCT/US94/00899 presentada el 26 de enero de 1994. Los agentes facilitadores de vacuna genética se describen en el documento de Estados Unidos con número de serie 021.579 presentado el 1 de abril de 1994. Los coagentes que se administran junto con las 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 pueden usarse otros agentes que pueden funcionar como agentes de transfección y/o agentes de replicación y/o agentes inflamatorios y que pueden coadministrarse con un GVF, incluyendo factores de crecimiento, citoquinas y linfoquinas tales como interferón- α , interferón-gamma, 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 inmunoestimuladores (ISCOM), adyuvante incompleto de Freund, análogos de LPS incluyendo monofosforil lípido A (WL), muramil péptidos, análogos de quinona y vesículas tales como escualeno y escualano, y ácido hialurónico, administrados junto con la construcción genética. En algunas realizaciones, puede usarse una proteína inmunomoduladora como GVF. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico se proporciona en asociación con PLG para potenciar el suministro/captación.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden aproximadamente 1 nanogramo a aproximadamente 2000 microgramos de ADN. En algunas realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden de aproximadamente 5 nanogramos a aproximadamente 1000 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 a usarse. En casos donde las composiciones farmacéuticas son composiciones farmacéuticas inyectables, son estériles, libres de pirógenos y libres de particulados. Se usa preferiblemente una formulación isotónica. En líneas generales, los aditivos para isotonicidad pueden incluir cloruro sódico, 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 composiciones de la invención para su uso en métodos de inducción de respuestas inmunitarias. La vacuna puede ser una vacuna atenuada viva, basada en proteína, una vacuna celular, una vacuna recombinante o una vacuna de ácido nucleico o ADN. En algunas realizaciones, los métodos de inducción de una respuesta inmunitaria en individuos contra un inmunógeno, incluyendo métodos de inducción de respuestas inmunitarias en la mucosa, comprenden administrar al individuo una o más de la proteína CTACK, la proteína TECK, la proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas o secuencias codificantes expresables de las mismas en combinación con una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la proteína de la invención y/o una vacuna recombinante que codifica la proteína de la invención y/o una vacuna de subunidad de la proteína de la invención y/o una vacuna atenuada viva y/o una vacuna inactivada. La una o más de la proteína CTACK, la proteína TECK, la proteína MEC y fragmentos funcionales de las mismas pueden administrarse antes de, de forma simultáneamente con, o después de la administración de la molécula de ácido nucleico aislada que codifica un inmunógeno; y/o una vacuna recombinante que codifica un inmunógeno y/o una vacuna de subunidad que comprende un inmunógeno y/o una vacuna atenuada viva y/o vacuna inactivada. En algunas realizaciones, se administra una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una o más proteínas seleccionadas del grupo que consiste en: CTACK, TECK, MEC y fragmentos funcionales de las mismas al individuo.

Ejemplos

Ejemplo comparativo 1

Materiales y métodos

Secuencias de envuelta de subtipo B de VIH-1. Para generar la secuencia de envuelta consenso de subtipo B de VIH-1, se seleccionaron cuarenta y dos secuencias génicas de envuelta de subtipo B recogidas de once países de GenBank para evitar la desviación de muestreo. Cada secuencia presenta un paciente diferente. Todas las secuencias usadas son no recombinantes.

Alineación múltiple. El procedimiento de alineación aplicado en el estudio filogenético incluía la aplicación de Clustal X (versión 1.81) (Thompson, J. D., *et al.* 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882). Los parámetros de

alineación por pares se ajustaron a la programación dinámica "lenta-precisa", usando 10 como la penalización por abertura de hueco y 0,1 como la penalización por extensión de hueco. Los parámetros de alineación múltiple incluían una penalización por extensión de hueco igual a 0,2.

5 Construcción de secuencia consenso de envuelta subtipo B de VIH-1. La secuencia de nucleótidos consenso de envuelta de subtipo B de VIH-1 se obtuvo después de realizar alineación múltiple y ajuste manual final minoritario. Se usaron secuencias deducidas de aminoácidos para guiar la introducción de los huecos de alineación de modo que se insertaran entre codones. La secuencia consenso de aminoácidos se obtuvo traduciendo la secuencia consenso de nucleótidos.

10 Árbol filogenético. Se empleó el método de unión adyacente (NJ) para la construcción de árboles filogenéticos de aminoácidos usando el programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, D. L. 1999. PAUP* 4.0: phylogenetic analysis using parsimony (* y otros métodos), versión 4.0b2a. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.). Se usaron dos secuencias adicionales de subtipo D (K03454 y AAA44873) y dos secuencias de subtipo C (AAD12103 y AAD12112) como un grupo externo para arraigamiento (Kuiken, C., B. T. Korber, y R. W. Shafer. 2003. HIV sequence databases. AIDS Rev. 5:52-61).

20 Modificaciones de la secuencia consenso de envuelta de subtipo B de VIH-1. Se realizaron varias modificaciones después de obtener la secuencia de envuelta consenso de subtipo B de VIH-1: se acortaron las regiones V1 y V2 altamente variables, se designó el bucle V3 para utilización de CCR5, se retiró la región de cola citoplasmática del extremo C-terminal, se añadió una secuencia líder y una secuencia Kozak cadena arriba al extremo N-terminal, se realizó optimización de codones y optimización de ARN usando GeneOptimizer™ (GENEART, Alemania).

25 Inmunógenos de envuelta. El gen que codifica la glucoproteína de envuelta consenso de transmisión prematura de subtipo B de VIH-1 modificada (EY2E1-B) se sintetizó y se verificó la secuencia por GENEART. La EY2E1-B sintetizada se digirió con BamHI y NotI, se clonó en el vector de expresión pVAX (Invitrogen) bajo el control del promotor inmediato temprano de citomegalovirus y esta construcción se llamó pEY2E1-B.

30 Se generó el inmunógeno de subtipo B primario (EK2P-B) a partir de un gen de envuelta gp140 de aislado 6101 de subtipo B primario, con sesgo de codones humanos que fue una donación de M. Sidhm (Wyeth). Básicamente, el gen de envuelta 6101 optimizado se mutó retirando la secuencia líder nativa y la cola citoplasmática. Entonces, se introdujo la secuencia líder de IgE y la secuencia Kozak diseñando cebadores específicos directos e inversos: Env-F: 5'-GTGCGCTCCGCTAGCTTGTTGGGTCACAGTCTATTATGGGGTACC-3' (SEQ ID NO: 13) Env-R: 5'-GGTCCGATCCTTACTCCACCACTCTCCTTTTTGCC-3' (SEQ ID NO: 14). El producto de PCR purificado se clonó en el vector plasmídico pVAX que también se linealizó con EcoR1 y XbaI. Esta construcción se llamó pEK2P-B.

35 Expresión *in vivo* y reactividad de EY2E1-B con anticuerpos monoclonales. Se transfectaron células de rhabdomyosarcoma humano (RD) (2×10^6) en placas de 60 mm con 3 μ g de los plásmidos pEY2E1-B y pEK2P-B usando el reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche, Alemania), respectivamente. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lavaron tres veces con 1 x PBS y se lisaron en 150 μ l de tampón de lisis (Cell Signaling Technology). Los lisados proteicos totales (50 μ g) se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham). Se realizaron análisis de inmunotransferencia, con un anticuerpo monoclonal específico de envuelta 2G12 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, EE.UU.) y un anticuerpo monoclonal antiactina (Sigma-Aldrich) y se visualizaron con anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con HRP (Sigma-Aldrich) usando un sistema de análisis de transferencia de Western ECL™ (Amersham). Se usó actina como control de carga para transferencia de Western.

40 Para detectar la reactividad de EY2E1-B con anticuerpos monoclonales, se inmunoprecipitaron los lisados proteicos totales procedente de la transfección (100 μ g) con 5 μ g de anticuerpos monoclonales específicos de envuelta incluyendo 2G12, 4G10 y ID6 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, EE.UU.). Se usó la misma cantidad de lisados proteicos totales procedentes de células transfectadas con vector vacío pVAX como control negativo. Las proteínas inmunoprecipitadas se fraccionaron en un gel de SDS-PAGE y se detectaron por transferencia de Western descrito como anteriormente.

55 Ensayo inmunofluorescente indirecto. Se realizó un ensayo inmunofluorescente indirecto para confirmar la expresión de los genes EY2E1-B y EK2P-B. Se sembraron células de rhabdomyosarcoma humano (RD) en portaobjetos de cámara de cultivo tisular (BD Biosciences), a una densidad para obtener una confluencia del 60-70 % el siguiente día en medio DMEM completo con FBS al 10 % (GIBCO) y se permitió que se adhirieran durante una noche. El siguiente día las células se transfectaron con pEY2E1-B, pEK2P-B y el plásmido de control pVAX (1 μ g/pocillo) usando reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con 1 x PBS frío y se fijaron en portaobjetos usando metanol durante 15 min. Después de la retirada de los disolventes residuales de los portaobjetos, las células se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-env de VIH-1 de ratón F105 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, EE.UU.) durante 90 min. Los portaobjetos después se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con TRITC (Sigma-Aldrich) durante 45 min. Se añadió clorhidrato de 4',6-diamido-2-fenilindol (Sigma-Aldrich) a la solución de anticuerpo secundario para teñir con contraste los núcleos para mostrar los núcleos

de la cantidad total de células disponibles en el campo dado. Los portaobjetos se montaron con medio de montaje que contenía reactivo antiempañoamiento (Molecular Probes). Las imágenes se analizaron usando el programa Phase 3 Pro para microscopia fluorescente (Media Cybernetics).

5 Determinación de anticuerpo específico de envuelta. La medición de anticuerpos IgG específicos para envuelta se realizó por ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) en ratones tanto inmunizados como de control. Se recubrieron placas Nunc-Immuno™ (Nalge Nunc International, Rochester, NY) con 1 µg/ml de glucoproteína IIIB de VIH-1 recombinante de clado B soluble gp160 (Immuno Diagnostics, MA), proteína de envuelta primaria de clado A/E de VIG-1 93TH975 gp120 y proteína de envuelta primario de clado C de VIH-1 96ZM651 gp120 (NIH AIDS
10 Research and Reference Reagent Program, Rockville, MD, EE.UU.), respectivamente, y se incubaron durante una noche a temperatura ambiente. Después de lavarlas, las placas se bloquearon con BSA al 3 % en PBST (1 x PBS + Tween-20 al 0,05 %) durante 1 h a 37 °C. Después, las placas se lavaron de nuevo y se incubaron con el suero de ratón específico, se diluyeron con BSA al 3 % en PBST durante una noche a 4 °C, después por incubación con una dilución de 1/10.000 de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP (Jackson ImmunoResearch, West
15 Grove, PA) durante 1 h a 37 °C. La reacción se reveló con el sustrato TMB (3, 3', 5, 5' - tetrametilbencidina) (Sigma-Aldrich). La reacción se detuvo con 100 µl de ácido sulfúrico 2,5 M por pocillo y las placas se leyeron en el lector de placa EL808 (Biotec Instrument Inc.) a DO de 450 nm.

20 Inmunización de ratones. Se adquirieron ratones Balb/C hembra de 4-6 semanas de edad del Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. Las parejas reproductoras de ratones transgénicos B6.Cg-Tg (HLA-A/H2-D)2Enge/J se adquirieron del Jackson Laboratory y se cruzaron por la Dra. Michelle Kutzler en nuestro laboratorio. Estos ratones transgénicos expresan un gen MHC de clase I híbrido entre especies, AAD, que contiene los dominios alfa-1 y alfa-2 del gen HLA-A2.1 humano y los dominios transmembrana y citoplasmático alfa-3 del gen H-2Dd de ratón, bajo la dirección del promotor humano de HLA-A2.1. La expresión del dominio alfa-3 de ratón potencia la respuesta inmunitaria en este sistema. En comparación con HLA-A2.1 no modificado, la molécula MHC de Clase I quimérica HLA-A2.1/H2-Dd
25 mediaba una selección positiva eficaz de células T de ratón para proporcionar un repertorio más completo de células T capaz de reconocer péptidos presentados por moléculas de Clase I HLA-A2.1. Los epítomos peptídicos presentados y reconocidos por células T de ratón en el contexto de la molécula de Clase I HLA-A2.1 son los mismos que los presentados en seres humanos HLA-A2.1+. Los ratones transgénicos hembra de 4-6 semanas de edad se usaron para un estudio adicional descrito a continuación. Su cuidado fue de acuerdo con las directrices del National Institutes of Health y el University of Pennsylvania Institutional Care and Use Committee (IACUC). Cada ratón se inmunizó por vía intramuscular tres veces, cada una de 100 µg de ADN a intervalos bisemanales. Hay tres ratones en cada grupo y el grupo de control se vacunó con ADN de pVAX. Los ratones se sacrificaron una semana después de la tercera inmunización y se retiraron los bazo de forma aséptica. Las células esplénicas se recogieron y resuspendieron en tampón de lisis de RBC para retirar los eritrocitos. Después de la lisis, los esplenocitos del mismo grupo se combinaron y resuspendieron en medio RPMI 1640 con FBS al 10 %. Las células se contaron y prepararon para el análisis.

40 Ensayo ELISpot de IFN-γ. Se usaron placas Multiscreen™ de 96 pocillos IP de alta unión a proteínas (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Las placas se recubrieron con mAAb contra IFN-γ de ratón (R&D Systems, Minneapolis, MN) diluido en 1XPBS, durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron tres veces con PBS y después de bloquearon durante 2 h a temperatura ambiente con 1XPBS suplementado con BSA al 1% y sacarosa al 5 %. Se añadieron esplenocitos de ratones por triplicado en una cantidad de entrada de células de 2×10^5 células por pocillo resuspendidas en medio de cultivo completo (RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 % y antibióticos). Se obtuvieron seis conjuntos de péptidos que contenía cada uno 15 restos de aminoácidos solapantes por 11 aminoácidos que representan las secuencias consenso proteicas completas de subtipo B, subtipo C, grupo M de VIH-1 y la secuencias proteicas completas de MN de VIH-1 (un aislado de subtipo B), C.UY.01.TRA3011 y C.ZA.01.J54Ma de VIH-1 (dos aislados de subtipo C) de envuelta del NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. Cada conjunto de péptidos env se combinó a una concentración de 2 µg/ml/péptido en 4 combinaciones como antígenos para estimulación específica de la liberación de IFN-γ. Se usó Conavalina A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), a 5 g/ml, y medio de cultivo completo como control positivo y negativo, respectivamente. Las placas se lavaron cuatro veces después de una incubación de 24 h a 37 °C, en una incubadora con atmósfera de CO₂ al 5 %. Después, se añadió un anticuerpo de detección biotinilado anti-IFN-γ de ratón, y las placas se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavaron, y se hizo un seguimiento del desarrollo de color de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ELISPOT Blue Color Module, R&D Systems, Minneapolis, MN). Las placas se secaron al aire y se contaron las manchas usando un sistema lector automatizado ELISPOT (CTL Analyzers, Cleveland, OH) con el software ImmunoSpot®. La cantidad promedio de células formadoras de manchas (SFC) se ajustó a 1×10^6 esplenocitos para la presentación de datos. El ensayo ELISpot se repitió tres veces en tres experimentos diferentes.

60 Estudio de reducción de células T CD8+. Se redujeron los linfocitos CD8 de los esplenocitos usando perlas inmunomagnéticas recubiertas con anticuerpo contra CD8 (Dynal Biotech Inc., Lake Success, NY) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de la reducción de las células T CD8+, se realizó el ensayo ELISpot de IFN-γ como se ha descrito anteriormente.

65 Estudio de mapeo de epítomos. Para mapear los epítomos reactivos, se combinaron dos conjuntos de péptidos que contenían 15 restos de aminoácidos solapantes por 11 aminoácidos que representan las proteínas completas de

envuelta del subtipo B consenso de VIH-1 y MN de VIH-1 en 29 combinaciones de 14-15 péptidos por combinación, respectivamente, y se realizó el ensayo ELISpot de IFN- γ como se ha descrito anteriormente. Estos diferentes conjuntos de 29 estimuladores combinados se usaron en un ensayo de matriz que facilita el mapeo de epítomos.

- 5 Análisis estadístico. Se usó el ensayo t de Student para muestras relacionadas para la comparación de la respuesta inmunitaria celular entre ratones inmunizados con pEY2E1-B y pEK2P-B. En este estudio, $p < 0,05$ se ha considerado estadísticamente significativo.

Resultados

10 Construcción y diseño de un novedoso gen de envuelta basado en consenso de transmisión prematura de subtipo B. La secuencia consenso de subtipo B de VIH-1 se generó a partir de 42 secuencias de subtipo B recuperadas de GenBank. Como se resume en la Fig. 1, se realizaron varias modificaciones después de generar la secuencia consenso. En resumen, para producir una versión CCR5 trópica de envuelta de VIH-1 que imitara los virus transmitidos por vía mucosa, se diseñaron seis aminoácidos importantes en el bucle V3 de acuerdo con las
 15 secuencias de aislados de transmisión prematura. Además, también se detectaron diez aminoácidos en el bucle V1 y un aminoácido en el bucle V2 a partir de la secuencia consenso. Se fusionó una secuencia líder altamente eficaz en fase cadena arriba del codón de inicio para facilitar la expresión. El dominio transmembrana se mantuvo intacto para facilitar la expresión superficial y el sitio de escisión se mantuvo intacto para obtener un plegamiento apropiado y la escisión por proteinasa del hospedador de la proteína de envuelta. La cola citoplasmática se retiró para evitar el reciclado de la envuelta y para promover una expresión más estable y altamente superficial (Berlioz-Torrent, C., *et al.* 1999. Interactions of the cytoplasmic domains of human and simian retroviral transmembrane proteins with components of the clathrin adaptor complexes modulate intracellular and cell surface expression of envelope glycoproteins. *J. Virol.* 73:1350-1359; Bultmann, A., *et al.*, 2001. Identification of two sequences in the cytoplasmic tail of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein that inhibit cell surface expression. *J. Virol.* 75:5263-5276). Además, para obtener un mayor nivel de expresión, se adaptó el uso de codones de este gen a la desviación de codones de los genes de *Homo sapiens* (Andre, S., *et al.* B. 1998. Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J. Virol* 72:1497-503; Deml, L., *et al.* 2001. Multiple effects of codon usage optimization on expression and immunogenicity of DNA candidate vaccines encoding the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *J. Virol.* 75:10991-11001). Además, también se realizó optimización del ARN (Schneider, R., *et al.*, 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J. Virol.* 71:4892-4903): se evitaban regiones de un contenido muy alto (>80 %) o muy bajo (<30 %) de GC y los motivos de secuencia de acción en cis tales como cajas TATA internas, sitios chi y sitios de entrada al ribosoma. El gen EY2E1-B sintético modificado por ingeniería se construyó y era de 2734 pb de longitud. El gen EY2E1-B se subclonó en pVAX en las sitios BamHI y NotI para estudio adicional.

40 Análisis filogenético. Para evaluar la distribución de la distancia desde una secuencia de subtipo B de envuelta muestreada de forma aleatoria con la secuencia EY2E1-B, se realizó un análisis filogenético. Como se muestra en la Fig. 2, hubo una cercanía relativa observada de la secuencia EY2E1-B a todas las secuencias muestreadas. La secuencia EY2E1-B, en comparación con la secuencia EK2P-B del aislado primario, tiene distribuciones comparables de valores de similitud (Tabla 1). El valor del porcentaje de similitud promedio para EY2E1-B fue del 85,7 %, mientras que fue del 79,4 % para EK2P-B.

45

Tabla 1

	Valores de porcentaje de similitud promedio	Intervalo de valores de porcentaje de similitud
EY2E1-B	85,7	92,1-79,6
EK2P-B	79,4	86,3-73,9

Tabla 1. El promedio y el intervalo de valores de porcentaje de similitud entre los candidatos potenciales de vacuna de envuelta y una alineación de las secuencias de envuelta de subtipo B.

50 Expresión *in vivo* y determinación antigénica de EY2E1-B. Para ensayar la expresión *in vivo* de pEY2E1-B y pEK2P-B, se transfectaron células RD con estos plásmidos como se describe en la sección de materiales y métodos. Se extrajeron las proteínas totales de los lisados celulares después de la transfección y se inmunotransfirieron con el anticuerpo monoclonal específico de envuelta 2G12 mencionado en la sección de materiales y métodos para detectar la expresión de pEY2E1-B. Los resultados de transferencia de Western indicaron que estas dos
 55 construcciones expresaban la proteína de envuelta (Fig. 3A). La proteína de envuelta detectada era de aproximadamente 120 kDa. La Tabla 2 muestra una comparación de pEY2E1-B y pEK2P-B.

Tabla 2

	Consenso/Primaria	Transmisión prematura	Codones-optimizados	ARN-optimizado	IgELS	Cola citoplasmática
EY2E1-B	Consenso	Sí	Sí	Sí	Sí	No
EK2P-B	Primaria	No	Sí	Sí	Sí	No

Para determinar los epítomos antigénicos, las proteínas de envuelta expresadas a partir de los lisados celulares RD se inmunoprecipitaron con tres anticuerpos diferentes específicos de gp120 2G12, 4G10 e ID6. Después de la inmunoprecipitación, se realizó transferencia de Western para detectar las proteínas inmunoprecipitadas. Nuestros resultados mostraron que el inmunógeno sintético podía unirse a los anticuerpos 2G12 e ID6, pero no a 4G10. Como el anticuerpo 2G12 neutraliza una amplia diversidad de aislados primarios y reacciona con un epítomo conformacional y dependiente de carbohidratos gp120, y el anticuerpo ID6 se une a gp120 y gp160 y está dirigido contra los primeros 204 aa de gp120, nuestros resultados sugerían que el inmunógeno sintético modificado por ingeniería EY2E1-B podría ser capaz de plegarse en una conformación relativamente nativa y conservar algunos epítomos antigénicos nativos. Además, como el anticuerpo 4G10 es un anticuerpo monoclonal contra LAI/BRU V3 de VIH-1 que reconoce LAI gp160, una cepa adaptada a la línea de células T, nuestros datos también sugerían que esta envuelta sintética no utilizaría el correceptor CXCR4.

Para confirmar adicionalmente la expresión y determinar los epítomos antigénicos, se realizó un ensayo inmunofluorescente indirecto usando células RD transfectadas. Se observó alta expresión específica al microscopio fluorescente en las células transfectadas con pEY2E1-B y pEK2P-B. El anticuerpo monoclonal contra env de VIH-1 F105 que reacciona con un epítomo discontinuo o conformacional de gp120 se usó en este ensayo. Como se indica en la Fig. 3B, las células transfectadas que expresaban proteínas Env mostraban la fluorescencia típica de rodamina, sugiriendo de nuevo que la proteína sintética expresaba y tenía una conformación relativamente nativa. Como control, no se detectó la expresión en células RD transfectadas con pVAX.

Inducción de respuesta humoral. Para determinar si el inmunógeno sintético podría provocar una respuesta de anticuerpo específica de envuelta de mayor título, se recogieron sueros de ratones BalB/C inmunizados con pVAX, pEY2E1-B y pEK2P-B y se realizó ELISA. Como se muestra en la Fig. 4A, se observó un nivel relativamente mayor de respuestas de anticuerpos específicos de envuelta de clado B con sueros recogidos de ratones inmunizados con pEY2E1-B en comparación con los de ratones inmunizados con pEK2P-B. En contraste, los ratones con vector en solitario no desarrollaban respuestas de anticuerpos específicas. Sin embargo, no hubo ninguna respuesta detectable de anticuerpos contra proteínas de clado A/E y clado C tanto en ratones a los que se han inyectado pEY2E1-B como pEK2P-B (Fig. 4B y 4C), lo que indica que, aunque el inmunógeno basado en consenso sintético tiene una conformación relativamente nativa y conserva epítomos antigénicos nativos, puede no ser capaz de inducir amplias respuestas inmunitarias de anticuerpos de clado cruzado.

Respuestas inmunitarias celulares fuertes y amplias medidas por ELISpot. Los ratones BalB/C se inmunizaron con pEY2E1-B y pEK2P-B y se realizó análisis ELISpot para determinar la cantidad de células secretoras de IFN- γ específicas de antígeno en respuesta a cuatro combinaciones de péptidos de proteína de subtipo B consenso de VIH-1 (Fig. 5A). La magnitud de la respuesta medida por la cantidad de unidades formadoras de manchas (SFU) por millón de células varió de 27,5 a 520 en ratones vacunados con pEY2E1-B. En comparación, esplenocitos de ratones vacunados con pEK2P-B solamente mostraron el intervalo de manchas de 2 a 237,5 ($p < 0,05$). La frecuencia aditiva de SFU/por millón de esplenocitos para las cuatro combinaciones en ratones inmunizados con pEY2E1-B fue de $1976,25 + 260$, aunque la cantidad de SFU/por millón de células en ratones inmunizados con pEK2P-B fue de $519 + 45$. Las células de ratones inmunizados con vector pVAX se usaron como control negativo, que muestra solamente $60 + 5$ SFU/por millón de esplenocitos para combinaciones de péptidos de envuelta B consenso ($p < 0,05$). Se observaron resultados similares en tres estudios diferentes. Por lo tanto, la construcción pEY2E1-B es hasta cuatro veces más potente en dirigir respuestas inmunitarias mediadas por células. También se determinó si los linfocitos CD8+ eran responsables de la secreción de IFN- γ detectada en ratones BalB/C inmunizados con pEY2E1-B. Como se muestra en la Fig. 5B, la cantidad de SFU/por millón de células se redujo hasta $127,5 + 11$ después de la reducción CD8+, lo que indica que hubo aproximadamente un 90 % de disminución en las frecuencias de células productoras de IFN- γ observadas por ELISpot reducido en células T CD8+. La producción de IFN- γ inducida por pEY2E1-B está mediada principalmente por células T CD8+.

Además, para modelar las respuestas inmunitarias de células T humanas contra antígenos presentados por HLA-A2 e identificar esos antígenos, se realizó el mismo ensayo ELISpot mencionado anteriormente usando ratones transgénicos HLA-A2.1/H2-Dd. Como se muestra en la Fig. 5C, la frecuencia aditiva de SFU/por millón de esplenocitos para las cuatro combinaciones de ratones transgénicos inmunizados con pEY2E1-B fue de $2362 + 257$, aunque la cantidad de SFU/por millón de células en ratones transgénicos inmunizados con pEK2P-B fue solamente de $493 + 57$. Estos resultados indicaron que la construcción pEY2E1-B es hasta cuatro veces más potente en dirigir las respuestas inmunitarias mediadas por células en los ratones transgénicos. Los datos de ELISpot después de la reducción de CD8 sugirieron que la producción de IFN- γ inducida por pEY2E1-B está principalmente mediada por células CD8+ (Fig. 5D).

Además, se puso interés en detallar adicionalmente las respuestas inmunitarias celulares que se observaron en el ensayo ELISpot. Por consiguiente, se realizó un conjunto adicional de ensayo ELISpot contra bibliotecas de péptidos que abarcaban la proteína de envuelta de subtipo B consenso. Se usó un conjunto completo de péptidos de 15 monómeros solapados por 11 aminoácidos, que comprendían la proteína de envuelta consenso de subtipo B, para realizar este estudio de mapeo. El estudio ilustró que no había un epítomo dominante claro inducido por la envuelta sintética. Sin embargo, el análisis ELISpot de IFN- γ de esplenocitos derivados de los ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B reveló que había 18 combinaciones de las 29 combinaciones que mostraban más de 50 manchas,

aunque hubo solamente seis combinaciones en ratones BalB/C vacunados con pEK2P-B (Fig. 5E). Estos resultados ilustraron que hay un aumento significativo en la amplitud y magnitud de respuestas inmunitarias celulares inducidas por el inmunógeno EY2E1-B.

5 Respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada fuertes inducidas por pEY2E1-B. Para determinar si el
 inmunógeno EY2E1-B podía inducir respuestas inmunitarias celulares amplias y de reactividad cruzada, se realizó
 ELISpot de IFN- γ tanto en ratones BalB/C como en ratones transgénicos HLA-A2 usando péptidos de envuelta de
 grupo M de VIH-1, subtipo C consenso, MN de VIH-1 (aislado de subtipo B), C.UY.01.TRA3011 y C.ZA.01.J54Ma de
 10 Fig. 5A, C y E en solitario están relacionados con las dianas peptídicas o se deben realmente al aumento en la
 amplitud inmunitaria. Como se muestra en la Fig. 6A, la cantidad aditiva de SFU/por millón de esplenocitos contra
 cuatro combinaciones de péptidos de envuelta MN de VIH-1 en ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B fue de
 1855 + 215,8, que era aproximadamente dos veces mayor que la de ratones BalB/C inmunizados con pEK2P-B
 15 (SFU/por millón de esplenocitos era de 700 + 168,2), lo que indica que pEY2E1-B tenía reactividad cruzada más
 fuerte que pEK2P-B dentro del subtipo B. Las cantidades de manchas de IFN- γ en respuesta a estimulación con
 cuatro combinaciones de péptidos de envuelta consenso de grupo M (Fig. 6B) y subtipo C (Fig. 6C) de VIH en
 ratones BalB/C inmunizados con pEY2E1-B fueron de 1150 + 191,3 y 715 + 116,1, respectivamente. En
 comparación con las cantidades de manchas contra péptidos del grupo M y subtipo C que fueron de 635 + 152,3 y
 20 345 + 82,3 en ratones BalB/C vacunados con pEK2P-B, estos datos ilustran que las respuestas inmunitarias del
 clado cruzado provocadas por pEY2E1-B son aproximadamente un 45 % más fuertes que las inducidas por pEK2P-
 B en ratones BalB/C.

De forma importante, se observaron respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada mucho más fuertes
 25 inducidas por pEY2E1-B en ratones transgénicos (Fig. 6F-J). La cantidad aditiva de SFU/por millón de esplenocitos
 contra cuatro combinaciones de péptidos de envuelta MN de VIH-1 en ratones transgénicos vacunados con
 pEY2E1-B fue de 1087 + 153, que era aproximadamente tres veces mayor que la de ratones HLA-A2 inmunizados
 con pEK2P-B (SFU/por millón de esplenocitos fue de 316 + 63) (Fig. 6F), lo que indica que pEY2E1-B también podía
 provocar reactividad cruzada más fuerte que pEK2P-B dentro del subtipo B en ratones transgénicos. Las cantidades
 30 de manchas de IFN- γ en respuesta a estimulación con cuatro combinaciones de péptidos de envuelta consenso de
 grupo M (Fig. 6G) y subtipo C (Fig. 6H) de VIH en ratones transgénicos inmunizados con pEY2E1-B fueron de 2116
 + 216 y 893 + 154, respectivamente. En comparación con las cantidades de manchas contra péptidos del grupo M y
 el subtipo C que fueron de 473 + 50 y 266 + 55 en ratones transgénicos vacunados con pEK2P-B, estos datos
 indicaron que las respuestas inmunitarias de clado cruzado provocadas por pEY2E1-B son aproximadamente tres a
 35 cuatro veces más fuertes que las inducidas por pEK2P-B en ratones transgénicos. Además, se usaron dos conjuntos
 de péptidos de aislado de subtipo C que deben servir como control riguroso para evaluar la amplitud y reactividad
 cruzada conseguida por otro péptido, para determinar adicionalmente las respuestas inmunitarias de clado C
 cruzado. Aunque no hubo demasiadas diferencias en la reactividad cruzada contra estos dos conjuntos de aislados
 de subtipo C provocada por pEY2E1-B y pEK2P-B en ratones BalB/C (Fig. 6D y E), la reactividad de clado cruzado
 40 contra estos dos conjuntos de aislados de subtipo C inducida por pEY2E1-B es aproximadamente tres veces más
 fuerte que la inducida por pEK2P-B (Fig. 6I y J). Las cantidades de manchas contra los péptidos C.ZA.01.J54Ma y
 C.UY.01.TRA3011 fueron de 1080 + 206 y 890 + 150 en ratones transgénicos vacunados con pEY2E1-B, mientras
 que las cantidades fueron solamente de 305 + 38 y 310 + 62 en ratones transgénicos vacunados con pEK2P-B.

Finalmente, se determinó si también había un aumento en la amplitud de las respuestas inmunitarias celulares de
 45 reactividad cruzada contra dianas específicas de subtipo inducidas por el inmunógeno EY2E1-B detallando las
 respuestas inmunitarias celulares contra MN de VIH-1 observadas anteriormente tanto en ratones BalB/C como en
 ratones transgénicos HLA-A2. Se realizó un ensayo de mapeo de epítomos contra la biblioteca de péptidos que
 abarcan la proteína de envuelta MN de subtipo B. Los resultados sugirieron que no había un epítomo dominante
 claro inducido por la envuelta sintética en ambas cepas de ratones. Sin embargo, el análisis ELISpot de IFN- γ de
 50 esplenocitos derivados de los ratones BalB/C vacunados con pEY2E1-B reveló que había 14 combinaciones de las
 29 combinaciones que mostraban más de 50 manchas, mientras que había solamente 9 combinaciones en ratones
 BalB/C vacunados con pEK2P-B (Fig. 7A). Asimismo, en ratones transgénicos, hubo 18 combinaciones de 29
 combinaciones que mostraban más de 50 manchas en ratones transgénicos inmunizados con pEY2E1-B, mientras
 que había solamente 6 combinaciones en ratones transgénicos vacunados con pEK2P-B (Fig. 7B). Estos datos
 55 indicaron que hay un aumento significativo en la amplitud y magnitud de las respuestas inmunitarias celulares de
 reactividad cruzada inducidas por el inmunógeno EY2E1-B tanto en ratones BalB/C como en ratones transgénicos
 HLA-A2.

60 Análisis

Los esfuerzos mundiales por vacunas de ADN de VIH-1 se han guiado por el principio de que respuestas de células
 T específicas de VIH pueden proporcionar alguna contribución a la protección contra la infección o control de la
 replicación posinfección. Las vacunas de ADN pueden impactar sobre la replicación vírica, aunque en general no
 son tan potentes en la inducción inmunitaria como los vectores víricos vivos atenuados (Almond, N., *et al.*. 1995.
 65 Protection by attenuated simian immunodeficiency virus in macaques against challenge with virus-infected cells.
 Lancet 345:1342-1344; Berman, P. W., *et al.* 1996. Protection of MN-rgp120-immunized chimpanzees from

heterologous infection with a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 173:52-9; Boyer, J., *et al.* 1997. Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat Med* 3:526-532; Daniel, M. C., *et al.* 1992. Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the nef gene. *Science* 258:1938-1941). Las estrategias dirigidas a mejorar la amplitud y magnitud de las respuestas inmunitarias celulares por lo tanto son importantes. La presente invención proporciona un novedoso antígeno usando varias características de inmunógenos que se han presentado en la bibliografía como enfoques separados, pero no se han ensamblado juntos previamente en una modalidad de vacuna. Como demostración conceptual, se desarrolló un inmunógeno de envuelta sintético basado en consenso modificado por ingeniería y se comparó con un inmunógeno de secuencia primaria optimizado para la inducción de respuestas inmunitarias mediadas por células. Los datos de expresión mostraron que este nuevo gen de envuelta modificado por ingeniería podía expresarse de forma eficaz en líneas celulares de mamífero, aunque los niveles de expresión de estos dos inmunógenos eran muy similares (Fig. 3A). Se observó en los estudios de inmunogenicidad que las respuestas inmunitarias celulares inducidas por este inmunógeno funcional mostraban diversidad y magnitud aumentadas en comparación con la vacuna de envuelta primaria. Los datos de mapeo de epítomos obtenidos tanto en ratones BalB/C como en ratones transgénicos HLA-A2 demostraron que esta mejora de diversidad y magnitud se mantenía a través de estos haplotipos. Para confirmar adicionalmente este hallazgo, también se desarrolló un inmunógeno de envuelta de subtipo C basado en consenso y se comparó con un inmunógeno de subtipo C primario, de nuevo el inmunógeno de envuelta de subtipo C basado en consenso sintético mostraba diversidad y magnitud potenciadas de respuestas inmunitarias celulares en comparación con el inmunógeno C primario (datos no publicados).

Desde el punto de vista de la estrategia de diseño de vacunas, la homología de secuencia entre el candidato de vacuna y el virus infeccioso o desafiante puede ser una consideración importante. Un enfoque eficaz para minimizar el grado de falta de similitud de secuencia entre una cepa de vacuna y virus en circulación contemporáneos es crear secuencias artificiales que sean "centrales" a estos virus. Una estrategia para diseñar dicha secuencia es usar una secuencia consenso derivada del aminoácido más común en cada posición en una alineación. Es este estudio se desarrolló una vacuna de envuelta de subtipo B basada en consenso y se creyó que este inmunógeno sintético tendría mayor reactividad cruzada. Nuestros resultados mostraron que había una diversidad de respuestas inmunitarias celulares inducidas por la vacuna pEY2E1-B. Los resultados de mapeo de péptidos tanto en ratones BalB/C como en ratones transgénicos también indicaron que el inmunógeno EY2E1-B ampliaba las respuestas inmunitarias. Además, los resultados del estudio de respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada indicaron que pEY2E1-B podía provocar respuestas inmunitarias celulares de reactividad cruzada significativamente más fuertes y más amplias. Por lo tanto, los inmunógenos de envuelta consenso artificiales contienen más epítomos conservados que los encontrados en cualquier aislado natural individual e inducen respuestas CTL de clado cruzado más amplias.

Una secuencia consenso teóricamente tiene ventajas y desventajas. Como una secuencia consenso se genera basándose en aislados contemporáneos, puede estar genéticamente más cerca de las cepas víricas en circulación actual que cualquier aislado de virus natural dado. Sin embargo, como la secuenciación global generalmente se realiza con virus muestreados durante infecciones crónicas en lugar de virus muestreados durante una infección aguda, el desarrollo de una respuesta de vacuna consenso sobre epítomos para los que la mayor parte ha escapado puede ser una desventaja. Para minimizar esta desventaja, una estrategia útil para el diseño de vacunas sería tomar en cuenta secuencias de transmisión prematura. Las proteínas de envuelta están entre las proteínas de VIH más difíciles de construir de forma artificial porque las regiones hipervariables en el gen de envuelta de VIH-1 evolucionan por inserción rápida y delección y no por mutación puntual. La diferencia de las regiones hipervariables en la longitud hace difícil generar las secuencias consenso de estas regiones. Recientemente Gao *et al.* (Gao, F., *et al.* 2005. Antigenicity and immunogenicity of a synthetic human immunodeficiency virus type 1 group m consensus envelope glycoprotein. *J Virol* 79:1154-63) generaron una secuencia de envuelta consenso de grupo M, sin embargo, las secuencias no consenso de las correspondientes regiones de una cepa recombinante CRF08 BC se usaron en estas regiones variables. Los estudios han indicado que virus del subtipo C que codifican glucoproteínas de envuelta con regiones V1, V2 y V4 más cortas se transmiten en los receptores con una frecuencia significativamente mayor que lo que se esperaría por probabilidad. Las secuencias de envuelta de subtipo A de infección prematura también tienen secuencias de bucle V1 y V2 más cortas significativas y menos sitios de glucosilación potencial ligada a N (Chohan, B., D. *et al.* 2005. Selection for Human Immunodeficiency Virus Type 1 envelope glycosylation variants with shorter VI-V2 loop sequences occurs during transmission of certain genetic subtypes and may impact viral RNA levels. *J. Virol.* 79:6528-6531). En contraste, las variantes de subtipo B recién transmitidas no tenían bucles V1 y V2 más cortos. Sin embargo, puede ser importante observar que los casos de infección de subtipo B eran principalmente el resultado de transmisión homosexual o hábito de inyección de drogas. Además, los estudios han sugerido que una posible consecuencia funcional de tener una región V1, V2 compacta es aumentar la exposición del dominio de unión a CD4, y entonces potenciar la susceptibilidad a neutralización (Edwards, T. G., *et al.* 2001. Relationships between CD4 independence, neutralization sensitivity, and exposure of a CD4-induced epitope in a Human Immunodeficiency Virus type 1 envelope protein. *J. Virol.* 75:5230-5239; Kolchinsky, P., *et al.* 2001. Increased neutralization sensitivity of CD4-independent Human Immunodeficiency Virus variants. *J. Virol.* 75:2041-2050; Pickora, C., *et al.* 2005. Identification of two N-linked glycosylation sites within the core of the Simian Immunodeficiency virus glycoprotein whose removal enhances sensitivity to soluble CD4. *J. Virol.* 79:12575-12583; Puffer, B. A., *et al.*, 2002. CD4 independent of Simian Immunodeficiency Virus Envs is associated with macrophage tropism, neutralization sensitivity, and attenuated pathogenicity. *J. Virol.* 76:2595-2605). Se

acortaron las regiones V1 y V2 cuando se generó la secuencia consenso de subtipo B.

La fase prematura de infección de VIH-1 está dominada por virus no inductores de sincitios (NSI), que se replican lentamente y usan CCR5 como su correceptor principal. Los virus inductores de sincitios (SI), que surgen en aproximadamente el 50 % de los individuos infectados que preceden a una disminución acelerada de células CD4 y un curso clínico progresivo de infección, usan CXCR4 como correceptor principal. Se ha demostrado un uso diferencial de correceptores de las variantes de VIH para todos los subtipos. Los virus del subtipo C parecen ser diferentes de la mayoría de otros subtipos porque se ha presentado frecuentemente una subrepresentación de CXCR4 usando variantes de VIH en el subtipo C. Por lo tanto, la utilización de CCR5 debe ser una consideración crucial para un diseño de vacuna. Los informes previos mostraron que la región V3 de gp120 desempeña un papel importante en la utilización de correceptor. Seis restos en el bucle V3 se han identificado como críticos para la interacción con CCR5: arginina307, lisina314, isoleucina316, arginina322, fenilalanina324 y alanina337. Sin embargo, basándose en las secuencias de los transmisores prematuros de subtipo C, el resto en la posición 322 debe ser glutamina en lugar de arginina. En resumen, basándose en los estudios previos que muestran restos importantes para la utilización de CCR5 y las secuencias de transmisores prematuros, se diseñó el inmunógeno de envuelta consenso de subtipo B que podría dirigir respuestas inmunitarias que en teoría pueden abordar la utilización del correceptor CCR5.

Para maximizar la reactividad cruzada potencial, se ha creado una secuencia de envuelta consenso de grupo M de VIH-1. Sin embargo, es posible que las vacunas consenso de envuelta específicas de subtipo puedan representar un compromiso para la similitud de secuencia global del antígeno de la vacuna respecto a los virus en circulación al menos a nivel de respuestas inmunitarias celulares. Los estudios han demostrado que había altas tasas de selección identificadas en regiones diferentes de proteínas de envuelta de subtipo B y C. Esto puede estar causado por una diferente presión inmunitaria en diferentes regiones de la proteína de envuelta en el subtipo B y C. Por lo tanto, puede haber ventajas en el uso de una vacuna de envuelta específica de subtipo, ya que las respuestas inmunitarias contra la vacuna y el virus en circulación compartirían dominios antigénicos. Se necesitan más experimentos que comparen las vacunas de envuelta de grupo M y específicas de subtipo para aclarar adicionalmente esta cuestión.

Otra cuestión importante acerca del uso de una secuencia consenso es que su secuencia puede asociar polimorfismos en combinaciones no encontradas en cualquier virus natural, provocando por tanto potencialmente conformaciones proteicas inapropiadas. Los estudios previos han indicado que un inmunógeno consenso de grupo M podría plegarse en conformación nativa, conservar los epítopos antigénicos de envuelta y provocar una respuesta débil de anticuerpos neutralizantes. Basándose en los hechos de que la proteína sintética podría unirse a los anticuerpos 2G12, ID6 y F105, creemos que el pEY2E1-B puede tener conformaciones estructurales algo nativas. De forma importante, nuestros datos también demostraron que el inmunógeno EY2E1-B podría inducir un anticuerpo específico de envuelta de subtipo B de mayor título, lo que indica que este inmunógeno sintético puede conservar también más epítopos de Clase II. Serán importantes más estudios en esta área.

Con la generación de nuevas estrategias de vacuna contra VIH-1 también existe una demanda creciente para predecir la eficacia de esas vacunas en seres humanos usando modelos preclínicos. En nuestro estudio, se usaron ratones transgénicos HLA-A2 para estudiar las respuestas inmunitarias celulares provocadas por el inmunógeno sintético. Los estudios han demostrado que esta cepa transgénica es un modelo preclínico importante para el diseño y ensayo de vacunas para enfermedades infecciosas que implican estimulación óptima de células T citolíticas CD8+ humanas. En este modelo los resultados indicaron que EY2E1-B podía provocar respuestas inmunitarias celulares más amplias y más fuertes en comparación con EK2P-B, lo que sugiere que esta nueva vacuna puede tener mayor potencial para inducir respuestas celulares restringidas a EK2P-B. Se están planeando estudios adicionales de este inmunógeno en primates no humanos.

Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que EY2E1-B podría servir como inmunógeno que aumenta tanto la magnitud como la amplitud de las respuestas CTL como casete de vacuna de ADN. En términos más generales esta construcción puede ser útil en otras plataformas para la inducción de respuestas inmunitarias celulares más fuertes y más amplias contra cepas de VIH en enfoques de vector no de ADN.

Ejemplo comparativo 2 desarrollo de una novedosa vacuna de ADN de envuelta de clado C de VIH-1 modificada por ingeniería que potencia la diversidad y amplitud de la respuesta inmunitaria celular provocada

Las respuestas CTL específicas de VIH-1 fuertes tienen un papel importante en el tratamiento de la carga vírica durante infección aguda y asintomática. Sin embargo, los recientes estudios sobre inmunógenos consenso no han sido capaces de demostrar, de forma notable, respuestas inmunitarias celulares mejoradas. Aquí se ensaya un novedoso inmunógeno de envuelta basado en consenso de clado C modificado por ingeniería para una respuesta inmunitaria celular mejorada. La novedosa vacuna (pEY3E1-C) se creó a partir de la secuencia de envuelta consenso de Clado C de VIH-1. Se realizaron varias modificaciones incluyendo el acortamiento de las regiones V1 y V2 altamente variables basándose en la secuencia de transmisión prematura, la retención del bucle V3 para la utilización de CCR5 la retirada de la región de cola citoplasmática desde el extremo C-terminal para evitar el reciclado de la envuelta y la retención del sitio de escisión y TMD para el apropiado plegamiento. Además, se añadió

una secuencia líder IgE al extremo N-terminal. Esta vacuna de ADN consenso también tiene ARN optimizado y codones optimizados. Se estudió la respuesta inmunitaria celular en ratones BalB/C mediante ELISpot y ensayos de mapeo de epítomos. Cuando se estudió como vacuna de ADN, en comparación con pEK3P-C (derivada de un aislado primario de env de Clado C), nuestra construcción (pEY3E1-C) será más eficaz en dirigir una respuesta inmunitaria celular. pEY3E1-C provocó una respuesta inmunitaria celular mayor en magnitud que pEK3P-C cuando se estimulaba por péptidos de Clado C consenso. Adicionalmente, el inmunógeno consenso provocaba un aumento en la magnitud de la respuesta inmunitaria celular cuando se estimulaba por otros dos conjuntos de péptidos de aislado primario también de Clado C. Además de la magnitud aumentada, la amplitud potenciada de la respuesta CTL se soportaba por la capacidad de pEY3E1-C de inducir al menos 15 de 29 combinaciones de péptidos fuertemente reactivos (que tienen más de 50 manchas/por millón de esplenocitos), mientras que pEK3P-C solamente inducía 3 de 29 combinaciones y 9 de 29 combinaciones con fuerte reactividad en respuesta a dos conjuntos de péptidos de aislado primario, que se seleccionaron por su singularidad y capacidad de servir como control riguroso para evaluar la amplitud. Además, pEY3E1-C provocaba una respuesta inmunitaria celular de Clado Cruzado más fuerte cuando se estimulaba con péptidos de Clado B. El inmunógeno consenso pEY3E1-C potencia tanto la magnitud como la amplitud de las respuestas CTL como un casete de vacuna de ADN, lo que sugiere que el potencial para inmunógenos consenso para servir como antígeno componente en un cóctel de vacuna contra VIH merece examen adicional.

Con amplia diversidad genética, mutación rápida y recombinación de las cepas existentes, la dificultad de generar una vacuna eficaz es tremenda. Una vacuna de ADN candidata derivada de un aislado individual puede no ser capaz de provocar la reactividad cruzada necesaria para la protección contra las diversas cepas en circulación de VIH-1.

Adicionalmente, se ha informado de que las vacunas de ADN que expresan la glucoproteína de envuelta de VIH-1 no son muy inmunogénicas.

Hemos usado una estrategia multifase para aumentar la potencia de la respuesta CTL provocada por la vacuna de ADN para proporcionar posiblemente protección contra cepas en circulación del virus.

Los estudios recientes han demostrado que un inmunógeno consenso puede superar el obstáculo de diversidad creado por el virus VIH-1 de rápida evolución.

Derdeyn *et al.*, descubrieron que una región V1-V4 más corta es característica de virus de subtipo C de transmisión prematura y nuestra construcción se ha diseñado para aportar esta característica que podría ser útil en producir una respuesta inmunitaria resultante de virus transmitidos de forma prematura.

Además, los niveles de expresión de nuestra vacuna de ADN se han potenciado por optimización de codones, optimización de ARN y la adición de una secuencia líder de inmunoglobulina.

Las respuestas CTL específicas de VIH-1 han demostrado ser importantes en el control de la carga vírica durante infección aguda y asintomática y el desarrollo de SIDA, por tanto, los siguientes datos se centran en las respuestas CTL provocadas por nuestro novedoso inmunógeno.

La Figura 13 representa el diseño de inmunógeno para el desarrollo de una novedosa Vacuna de ADN de Envuelta de clado C de VIH-1 modificada por ingeniería que potencia la diversidad y amplitud de las respuestas inmunitarias celulares provocadas.

La Figura 14 muestra relaciones filogenéticas: Se incluyeron treinta y seis secuencias de envuelta de subtipo C de VIH-1, EY3E1-C, EK3P-C, dos secuencias de subtipo B, una de subtipo A y una de subtipo D (grupo externo) en el análisis filogenético. Las secuencias de envuelta de subtipo C que representan una amplia muestra de diversidad eran de 12 países.

La Tabla 3 muestra el promedio e intervalo de valores de porcentaje de similitud entre vacunas de envuelta potenciales candidatas y una alineación de secuencias de envuelta de subtipo C.

Tabla 3

	Promedio de Valores de % de Similitud	Intervalo de % de Valores de Similitud
pEY3E1-C	85,3	82,7-93,1
pEK3P-C	87,4	83,6-90,2

Se inmunizaron tres grupos de tres ratones BalB/C con 100 µg de ADN 3 veces con dos semanas entre las inmunizaciones. En la séptima semana, se recogieron los bazos para estudios celulares.

Como se muestra en la Figura 15, Paneles A y B, se provocó una respuesta celular fuerte por pEY3E1-C.

La Figura 16 muestra respuestas celulares fuertes y amplias provocadas por pEY3E1-C. Cuando se estimulaban con 29 combinaciones de péptidos env C Consenso: los ratones vacunados con pEY3E1-C provocaban más de 50 manchas/millón de esplenocitos de las 23 combinaciones; los ratones vacunados con pEK3P-C provocaban más de 50 manchas /millón de esplenocitos de 2 combinaciones.

5 La Figura 17, Paneles A-D, muestra fuertes respuestas celulares de reactividad cruzada provocadas por pEY3E1-C dentro del mismo clado.

10 La Figura 18, Paneles A y B, muestra respuestas celulares de reactividad cruzada fuertes y amplias provocadas por pEY3E1-C. El Panel A muestra datos de ELISpot de IFN- γ específico de env de subtipo C (Uruguay). Cuando se estimulaban con 28 combinaciones de péptidos env de Clado C (Uruguay): los ratones vacunados con pEY3E1-C provocaban más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 12 combinaciones; los ratones vacunados con pEK3P-C provocaban más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 3 combinaciones. El Panel B muestra datos de ELISpot de IFN- γ específico de env de subtipo C (Sudáfrica), cuando se estimulaban con 29 combinaciones de péptidos env de Clado C (Sudáfrica): los ratones vacunados con pEY3E1-C provocaban más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 13 combinaciones; los ratones vacunados con pEK3P-C provocaban más de 50 manchas/millón de esplenocitos de 5 combinaciones.

20 La Figura 19 Paneles A-F, muestra fuertes respuestas celulares de reactividad cruzada provocadas por pEY3E1-C entre clados.

25 Existe un aumento significativo en la amplitud y magnitud de las respuestas inmunitarias celulares inducidas por el inmunógeno EOC. La reactividad de clado cruzado más amplia aparece como un beneficio adicional de este inmunógeno.

Ejemplo comparativo 3: Eficacia de una novedosa vacuna de ADN de HPV-16 modificada por ingeniería que codifica una proteína de fusión E6/E7

30 El inmunógeno se ha diseñado para expresarse como una poliproteína mediante la cual las secuencias E6 y E7 están separadas por un sitio de escisión proteolítica. La poliproteína también se expresa con una secuencia líder de IgE. El diseño de poliproteína incluye delecciones o mutaciones en la secuencia E6 que son importantes para la unión de p53 y la degradación y mutaciones en el sitio de unión de Rb en la proteína E7. La Figura 23 proporciona una ilustración del diseño de inmunógeno.

35 Se insertaron secuencias codificantes que codifican la poliproteína en el vector pVAX para producir el plásmido p1667. La Figura 24 muestra mapas de pVAX y p1667.

40 Se inmortalizaron células de tumor TC1 con E7 de HPV-16 y se transformaron con el oncogén c-Ha-ras. Estas células expresan bajos niveles de E7 y son muy tumorigénicas.

45 En el estudio de inmunogenicidad en ratones, se administró a 3 ratones por grupo de ratones C57BL6 100 μ g de ADN/por ratón. Los grupos incluían 1) control al que se administró vector de control pVAX y 2) ensayo al que se administró p1667. Los ratones se vacunaron en los días 0, 14 y 28. En el día 35, se sacrificó a los ratones y se realizó ELISpot (centrado en CMI).

50 Los datos para las respuestas inmunitarias celulares inducidas por el inmunógeno de ADN p1667 se muestran en la Figura 25. Los péptidos E6 y E7 consenso de HPV-16 (37, 15 monómeros solapantes por 9 aa) se usaron en dos combinaciones - combinación 1: 18 péptidos; combinación 2: 19 péptidos. Los Paneles A y C muestran datos de esplenocitos totales. Los Paneles B y D muestran datos de muestras con reducción de CD8.

La Figura 26 muestra resultados de mapeo de epítomos inmunodominantes. Se indica dos secuencias.

55 En experimentos profilácticos en ratones, se administró a 5 ratones por grupo de ratones C57BL6 100 μ g de ADN/por ratón. Los grupos incluían 1) virgen (inyectado con PBS), 2) control a los que se administró vector de control pVAX y 3) ensayo a los que se administró p1667. Los ratones se vacunaron en los días 0, 14 y 28. En el día 35, los ratones se expusieron con células TC1 y después de ello se hicieron mediciones del tamaño del tumor. Los resultados se muestran en la Figura 27. También se muestran los datos de un grupo en que se coadministró la construcción de IL-15.

60 En los experimentos de regresión tumoral en ratones, se administró a 5 ratones/por grupo de ratones C57BL6 100 μ g de ADN/por ratón. Los grupos incluían 1) virgen (inyectado con PBS), 2) control a los que se administró vector de control pVAX y 3) ensayo a los que se administró p1667. Los ratones se expusieron con 5×10^4 células TC1 en el día 0. A los ratones se les administró vacunas de ADN en los días 3, 10 y 17. Los tumores se midieron empezando en el día 8. Los resultados se muestran en la Figura 28. También se muestran los datos de un grupo en que se coadministró la construcción de IL-15.

65

Se determinó el nivel de linfocitos positivos a Tetrámero E7 en los bazos. La Figura 29 muestra los datos como el porcentaje de linfocitos positivos a Tetrámero E7. La vacuna de ADN p1667 induce la activación de células T CD8+ específicas de E7 que son CD62L^{lo} dentro de los bazos.

5 Se determinó el nivel de linfocitos positivos a Tetrámero E7 en los tumores. La Figura 30 muestra los datos como el porcentaje de linfocitos positivos a Tetrámero E7. La vacuna de ADN p1667 induce la activación de células T CD8+ específicas de E7 que son CD62L^{lo} dentro de los tumores.

10 Se emprendió un estudio de protección por vacuna de ADN E6/E7 en ratones transgénicos. Se hizo una comparación entre vírgenes, pVAX, p1667, p1667 + IL-15 y E7/HisB. Los datos se muestran en la Figura 31. p1667 y p1667 + IL-15 protegieron completamente.

15 Los datos presentados en este documento apoyan las siguientes conclusiones. La construcción p1667 induce una fuerte respuesta inmunitaria celular capaz de inducir linfocitos CD8+ específicos de E7 que median las elevadas respuestas de IFN- γ . Se han identificado epítomos de HPV-16 tanto dominantes como subdominantes novedosos contra los que se generan CTL específicos de antígeno después de la administración de la construcción de ADN. La construcción p1667 es capaz de prevenir el crecimiento del tumor y causar la regresión de tumores tanto en ratones C57/BL6 como transgénicos. La vacuna de ADN p1667 muestra gran potencial para una novedosa estrategia terapéutica para abordar cáncer asociado a HPV microscópico.

20 Ejemplo comparativo 4

25 Pueden administrarse secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias consenso de Env de VIH como vacunas de ADN en combinación con secuencias de ácido nucleico que codifican otras diversas proteínas de VIH tales como Gag, Pol, Gag/Pol, Nef, Vif, y Vpr usando, por ejemplo, tecnología de electroporación para suministro intramuscular o intradérmico. Construcciones de vacuna contra VIH multivalentes/polivalentes pueden proporcionar respuestas inmunitarias potenciadas y ser particularmente útiles. En algunas realizaciones, se proporcionan adicionalmente secuencias codificantes de IL-12. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20070106062, que se incorpora en este documento por referencia, describe una vacuna de ADN de Vif de VIH. La publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 20040106100, que se incorpora en este documento por referencia, describe vacunas contra VIH que comprenden proteínas accesorias de VIH, así como las secuencias de dichas proteínas que pueden usarse para preparar construcciones adicionales de vacuna. Las patentes de Estados Unidos 6.468.982, 5.817.637, y 5.593.972, que se incorporan en este documento como referencia describen vacunas de ADN que incluyen construcciones de gag de VIH, pol de VIH y gag/pol de VIH. La electroporación se describe en la patente de Estados Unidos n. 7.245.963, que se incorpora por referencia. La solicitud PCT/US97/19502, que se incorpora en este documento por referencia, describe construcciones de IL-12. La publicación de solicitud de Estados Unidos n.º 20070041941 que se incorpora en este documento por referencia, describe construcciones que codifican IL-15.

40 Ejemplo comparativo 5

45 Se inmunizaron IM por vía intramuscular dos grupos de macacos tres veces con construcciones plasmídicas optimizadas de gag y env con o sin plásmido de IL-12. Se usó la misma estrategia de inmunización para dos grupos adicionales pero los plásmidos se suministraron con o sin electroporación *in vivo*.

50 Se determinaron las respuestas celulares por ELISpot de IFN- γ después de cada inmunización y cinco meses después para las respuestas de memoria. Durante todo el estudio, se evaluaron las respuestas humorales por ELISA de p24 recombinante y gp160. Se determinó la capacidad proliferativa de células T específicas de antígeno por tinción con CFSE. Se hizo tinción de citoquinas intracelulares para caracterizar adicionalmente las características funcionales de la respuesta de células T inducida.

55 El plásmido de IL-12 potenció las respuestas celulares contra nuestras construcciones optimizadas. Sin embargo, el uso de electroporación para potenciar el suministro de plásmidos fue capaz de mejorar tanto la respuesta celular como la humoral en comparación con inmunización IM con el plásmido de IL-12. La combinación de plásmido de IL-12 y electroporación provocó las mejores respuestas inmunitarias, tanto primarias como de memoria, medidas por una diversidad de parámetros.

60 Se compararon las construcciones de ADN optimizadas que codifican *gag* y *env* de VIH en macacos rhesus en presencia o ausencia de plásmido de IL-12 como adyuvante de ADN. IL-12 podía aumentar sustancialmente las respuestas de células T 5 veces en un formato de ELISpot cuantitativo que provocaba respuestas de células T de memoria sustancialmente mejores. Sin embargo, el ADN suministrado EP fue más eficaz en generar respuestas de células T y de memoria que eran 2 veces mayores en comparación con la vacuna de ADN con adyuvante IL-12 IM. Las mejores respuestas se observaron en el brazo de combinación de EP + adyuvante de IL-12. Las respuestas de memoria en este brazo fueron 10 veces mayores que el ADN IM en solitario y casi 2 veces mayores que EP solo. También se observó expansión inmunitaria 4 veces mejor por CFSE en el bazo EP + IL-12 en comparación con EP solo. La presencia de células T polifuncionales también sugirió que el bazo de ADN + citoquina + EP es el más

eficaz.

Materiales y métodos

5 Animales:

Se alojaron macacos rhesus (*Macaca mulatta*) en BIOQUAL, Inc. (Rockville, MD), de acuerdo con las normas de la American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care. Se permitió que los animales se aclimataran durante al menos 30 días en cuarentena antes de cualquier experimentación.

10

Inmunización:

Se inmunizaron cinco macacos rhesus en las semanas, 0, 4 y 11 con 1,0 mg de pGag4Y y pEY2E1-B. El ADN en cada punto temporal de inmunización se suministró en dos sitios de inyección, uno en cada músculo cuádriceps. Tres de los macacos se sometieron a electroporación después de inyección IM. Otro grupo de cinco macacos se inmunizó en las semanas 0, 4 y 8 con 1,0 mg de pGag4Y, pEY2E1-B, y WLV104. De los cinco animales, dos animales recibieron la inmunización por inyección IM y tres animales se sometieron a electroporación después de inyección IM. Todos los procedimientos de electroporación se realizaron usando el dispositivo de corriente constante Collectra™ (VGX Immune Therapeutics Division of VGX Pharmaceuticals, The Woodlands, TX). Las condiciones de electroporación fueron 0,5 Amperios, 3 pulsos, 52 ms de longitud de pulso con 1 s entre pulsos. Este dispositivo controlado por software se diseñó para medir la resistencia tisular inmediatamente antes del suministro del plásmido y la generación de pulsos de onda cuadrada de corriente constante, eliminando el riesgo de suministro fuera del tejido muscular y la potencial pérdida de plásmido.

15

20

25 *Recogida de sangre:*

Los animales se exanguinaron cada dos semanas mientras duró el estudio. Se recogieron 10 ml de sangre en tubos EDTA. Se aislaron las PBMC por centrifugación convencional en Ficoll-hypaque y después se resuspendieron en medio de cultivo completo (RPMI 1640 con 2 mM/L L-glutamina suplementada con suero bovino fetal inactivado por calor al 10%, 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, y 55 µM/l de β-mercaptoetanol.) Las RBC se lisaron con tampón de lisis ACK (Cambrex Bio Science, East Rutherford, NJ).

30

Plásmidos y productos plasmídicos:

Gag4Y contiene un casete de expresión que codifica una secuencia consenso de la proteína gag de VIH de clados A, B, C, y D con varias modificaciones que incluyen: la adición de una secuencia kozak, una secuencia líder de IgE sustituida, optimización de codones y ARN para la expresión en células de mamífero (la SEQ ID NO: 11 describe la secuencia consenso de Gag de VIH.). El gen Gag4Y se subclonó en el vector de expresión, pVax, para estudio adicional. pEY-2E1-B contiene un casete de expresión que codifica una secuencia consenso de la envuelta de VIH de clado B. (La SEQ ID NO: 3 describe la secuencia consenso de Env de VIH.) WLV104M es un plásmido que codifica un gen de IL-12 de rhesus. Los plásmidos se produjeron en Aldevron (Fargo, ND), y se reformularon en VGX Immune Therapeutics (The Woodlands, TX), en agua estéril para inyección con sal sódica de poli-L-glutamato 0,1% de bajo peso molecular.

35

40

45 CFSE de PBMC crioconservadas

Las PBMC crioconservadas se descongelaron rápidamente en un baño de agua a 37 °C y se lavaron con medio completo. Las células se incubaron durante una noche en una incubadora a 37 °C y se obtuvieron los recuentos celulares el siguiente día. Las células se sedimentaron y se resuspendieron en un 1 ml de CFDA SE (Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS (dilución 1:2000). Las células se incubaron a 37 °C durante 10 min. Las células se lavaron con medio completo y se resuspendieron hasta una concentración de 1×10^6 células/100 ul y se sembraron en placas de fondo redondo de 96 pocillos con 100 ul de 2 µg/ml de p24 o gp120 de VIH-1 recombinante (ImmunoDiagnostics, Woburn, MA) más combinaciones de péptidos. Se usaron 5 µg/ml de Concanavalina A (positivo) y medio completo (negativo) como controles. Los cultivos se incubaron durante 5 días. Las células primero se tiñeron con colorante violeta Vivid, un marcador celular de vida/muerte, durante 15 min en hielo. Las células se lavaron una vez con PBS. Las células después se tiñeron usando anticuerpo anti-CD3 humano-PE (clone SP34-2) (BD Pharmingen) y anticuerpo anti-CD4 humano-PerCP (clone L200), anticuerpo anti-CD8 humano-APC (SKI) durante 1 hora a 4 °C. Las células después se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1 %. Los datos se recogieron usando un citómetro de flujo LSR II (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ). Los datos de citometría de flujo se analizaron usando el software FlowJo (Tree Star, Ashland, OR), sincronizado sobre linfocitos CD3+. Se recogieron de treinta a cincuenta mil linfocitos CD3+ por muestra.

50

55

60

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA):

Se recubrieron placas de 96 pocillos durante una noche con 100 ng/pocillo de p24 o gp120 de VIH-1 IIB recombinante (ImmunoDiagnostics) para determinar las respuestas contra gag y env de VIH respectivamente. Las

65

placas recubiertas con 100 ng/pocillo de albúmina sérica bovina sirvieron como control negativo. Las placas se bloquearon con BSA al 3 %-PBST durante 1 hora a 37 °C. Las placas después se incubaron con diluciones de suero en serie de factor cuatro durante 1 hora a 37 °C. Después se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG de mono conjugado con peroxidasa de rábano rusticano a una dilución 1:10.000 (MP Biomedicals, Aurora, OH) a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Se usó tetrametilbenzidina (R&D systems, Minneapolis, MN) para revelar las placas y las reacciones se detuvieron con H₂SO₄ 2N. Después se midieron las densidades ópticas (DO).

Se definieron los títulos de punto final de IgG como el recíproco de la dilución de suero que provocaba valores de DO que eran mayores de dos veces el valor promedio de DO de los pocillos de BSA.

Ensayo de inmunotransferencia ligado a enzimas (ELISpot)

Se determinaron las respuestas específicas de antígeno restando la cantidad de manchas en los pocillos de control negativo de los pocillos que contenían péptidos. Los resultados se muestran como el valor medio (manchas por millón de esplenocitos) obtenidos para pocillos triplicados.

1. Tinción de citoquinas intracelulares

Reactivos de anticuerpo

Se obtuvieron anticuerpos conjugados directamente de los siguientes: BD Biosciences (San Jose, CA): IL-2 (PE), CD3 (Pacific Blue), IFN- γ (PE-Cy7), y TNF- α (Alexa Fluor 700), CD8 (APC) y CD4 (PerCP).

Estimulación celular y tinción

Se re-suspendieron PBMC hasta 1×10^6 células/100 μ l en RPMI completo y se sembraron en placas de 96 pocillos con péptidos estimulantes, 100 μ l de diluciones 1:200. Se incluyó un control no estimulado y positivo (enterotoxina B de *Staphylococcus*, 1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) en cada ensayo. Las células se incubaron durante 5 horas a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron (PBS) y se tiñeron con anticuerpos superficiales. Las células se lavaron y se fijaron usando el kit Cytofix/Cytoperm (BD PharMingen, San Diego, CA) de acuerdo con las instrucciones. Después de la fijación, las células se lavaron dos veces en el tampón perm y se tiñeron con anticuerpos contra marcadores intracelulares. Después de la tinción, las células se lavaron, se fijaron (PBS que contenía paraformaldehído al 1 %) y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis.

Citometría de flujo

Las células se analizaron en un citómetro de flujo LSR II modificado (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Se recogieron cincuenta mil eventos CD3+ por muestra. El análisis de datos se realizó usando FlowJo versión 8.4.1 (TreeStar, San Carlos, CA). La sincronización inicial usó un diagrama de área de dispersión directa (FSC-A) frente a la altura (FSC-H) para eliminar los dobletes. Los eventos se sometieron a una sincronización de linfocitos por un diagrama de FSC-A frente a SSC. Después de esto, los eventos se sincronizaron secuencialmente sobre eventos CD3+, CD8+ y CD4- frente a IFN- γ para justificar la regulación negativa. Después de la identificación de células T CD8+, se hizo una sincronización para cada función respectiva usando combinaciones que proporcionaban separación óptima. Después de crearse las sincronizaciones para cada función, se usó una plataforma de sincronización Boolean para crear la serie completa de posibles combinaciones, equiparando a 8 patrones de respuesta cuando se ensayaban 3 funciones. Los datos se presentan después de la corrección de fondo. Los umbrales para respuestas positivas fueron 10 eventos o 0,05 %.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron usando el software Prism Graphpad, y se expresan como medias \pm ETM.

Resultados

Análisis ELISpot

La inducción de respuesta inmunitaria celular se evaluó después de cada inmunización por ELISpot de IFN γ . Después de una única inmunización (Figura 1), el grupo que recibió ADN plasmídico por inyección IM en solitario presentaba respuestas celulares débiles (74 ± 29 SFU/ 10^6 PBMC). La co-inmunización con plásmido de IL-12 rhesus provocó una respuesta mayor ($136 \pm 51,4$ SFU/ 10^6 PBMC). El grupo sometido a electroporación (EP) obtuvo una respuesta promedio que era seis veces mayor que la del grupo IM (482 ± 181 SFU/ 10^6 PBMC). La combinación de co-inmunización de IL-12 con EP duplicó adicionalmente la cantidad de células productoras de IFN γ (1030 ± 494 SFU/ 10^6 PBMC).

Después de dos inmunizaciones (Figura 1), los grupos IM e IM + IL-12 obtuvieron un aumento moderado en los recuentos ELISpot ($104 \pm 67,9$ SFU/ 10^6 PBMC y $223 \pm 76,6$ SFU/ 10^6 PBMC, respectivamente). El grupo EP obtuvo

respuestas que eran casi cuatro veces mayores (1924 ± 417 SFU/ 10^6 PBMC) que la inmunización previa y el grupo EP + IL-12 había duplicado de nuevo la cantidad de células productoras de IFN γ (2819 ± 872 SFU/ 10^6 PBMC) en comparación con el brazo EP en solitario.

5 Después de la tercera inmunización (Figura 1), la cantidad de células específicas de antígeno en el grupo EP era más de un log mayor que la del grupo IM (5300 ± 3781 y 370 ± 110 SFU/ 10^6 PBMC, respectivamente). El grupo IM + IL-12 también obtuvo un drástico aumento en las respuestas celulares con los recuentos ELISpot que eran casi un log mayor que la inmunización previa (2042 ± 311 SFU/ 10^6 PBMC). Como con las otras dos inmunizaciones, el grupo EP + IL-12 fue el más potente de todos los grupos de vacunación (7228 ± 2227 SFU/ 10^6 PBMC).

10

Inducción de respuestas contra envuelta de reactividad cruzada

Una vacuna satisfactoria contra VIH requerirá la inducción de respuestas inmunitarias de reactividad cruzada. A este respecto, fue interesante observar si EP + IL-12 podía mejorar la mejorar la magnitud de reactividad cruzada para bibliotecas de péptidos divergentes. Se compararon las respuestas CTL de reactividad cruzada inducidas por el antígeno *env* usando una biblioteca de péptidos a partir de un grupo M consenso. Se observó reactividad cruzada en todos los grupos. Sin embargo, los resultados presentaron las mismas diferencias de magnitud observadas en el análisis ELISpot de subtipo B (Figura 2). Después de las 3 inmunizaciones, el grupo IM obtuvo la respuesta más baja contra los péptidos de envuelta de grupo M ($222 \pm$ ETM SFU/ 10^6 PBMC). La adición de IL-12 duplicó la respuesta ($540 \pm$ ETM SFU/ 10^6 PBMC). Se indujeron mayores respuestas de envuelta de grupo M con EP ($830 \pm$ ETM SFU/ 10^6 PBMC), que se potenció adicionalmente con co-inyección con IL-12 ($1238 \pm$ ETM SFU/ 10^6 PBMC).

15

20

1. Respuestas de células T de memoria

25 Una cuestión importante es ser capaces de mejorar la generación de respuestas de memoria con la plataforma de ADN. Se realizó análisis ELISpot 5 meses después de la última vacunación de ADN (Figura 3). En los grupos IM, la adición del plásmido de IL-12 provocó un aumento casi 10 veces en las células de memoria ($751 \pm 11,1$ y $78,6 \pm 16,9$ SFU/ 10^6 PBMC). Está claro que IL-12 puede impactar positivamente sobre este importante fenotipo de células T. La cantidad de células productoras de IFN γ específicas de antígeno fue sustancial en el grupo EP también, sin embargo, el adyuvante IL-12 + EP provocó la respuesta de memoria más robusta ($1231 \pm 523,5$ y 3795 ± 1336 SFU/ 10^6 PBMC respectivamente), una respuesta que muestra que la tecnología combinada dirige respuestas de memoria de células T muy fuertes.

25

30

Respuestas inmunitarias humorales contra vacunas de ADN

35 Una debilidad de la tecnología de vacuna de ADN IM recae en su incapacidad de inducir claras respuestas de anticuerpos en primates no humanos y en estudios clínicos en seres humanos. Se evaluó la capacidad de cada grupo de inducir títulos de anticuerpos específicos para gag y env de VIH-1 contra antígenos p24 y gp160 recombinantes en un formato ELISA. Para ambos antígenos, los grupos IM e IM + IL-12 no mostraron títulos significativos de anticuerpos (título de punto final $<1:50$). Los grupos sometidos a electroporación mostraron títulos drásticamente mayores de anticuerpos contra gag que eran capaces de unirse a p24 recombinante. Aunque tanto los grupos EP como EP + IL-12 obtuvieron títulos similares de punto final en la semana 12 (22.400 y 12.800 respectivamente), el grupo EP + IL-12 generó una respuesta de anticuerpos más eficaz. Esa respuesta apareció de forma más prematura en el esquema de inmunización y se elevó hasta el nivel máximo lo más rápidamente. Las respuestas de anticuerpos contra env también reflejaron los resultados observados con el antígeno gag, aunque con títulos de punto final inferiores.

35

40

45

Proliferación de células T CD4+ y CD8+

50 Habiendo observado respuestas ELISpot sustanciales, a continuación se examinaron parámetros adicionales de inmunidad celular. Se examinó la capacidad de células T CD4+ y CD8+ específicas de gag de proliferar *in vitro* después de estimulación con péptido entre los diferentes brazos de inmunización. Las muestras criopreservadas, recogidas dos semanas después de la inmunización final, se estimularon y analizaron por ensayo CFSE. La respuesta CD4+ promedio aumentó de forma similar a lo observado en el ensayo ELISpot. Por comparación, la inducción de proliferación CD8 fue mucho más drástica en magnitud. Se observó que IL-12 aumentaba la proliferación de células T CD8+ sobre IM en solitario y EP fue sustancialmente mayor. El grupo EP + IL-12 obtuvo el mayor porcentaje de células CD8+ que eran capaces de proliferar después de estimulación *in vitro* ($2,51 \pm$ ETM % y $4,88 \pm$ ETM %, respectivamente). Se observaron obvias de proliferación de células T CD8 en el brazo EP + IL-12, lo que demuestra el potente potencial proliferativo de esta inmunización combinada.

50

55

60

Respuestas de células T CD8+ polifuncionales

Aunque se ha observado claramente la inducción de una robusta respuesta efectora de IFN γ después de co-inmunización con EP e IL-12, se quiso caracterizar adicionalmente las funciones de las respuestas de células T CD8+ específicas de antígeno en los diversos brazos. Las muestras recogidas tres meses después de la inmunización final se estimularon con péptidos gag y se tiñeron para producción de citoquinas intracelulares de

65

5 IFN γ , TNF α e IL-2. De todos los grupos, solamente un animal en IM + IL-12 y un animal en el grupo de solamente EP obtuvo una respuesta detectable de IFN γ . Sin embargo, dos de los tres animales en el grupo inmunizado con EP + IL-12 obtuvo células T CD8+ productoras de IFN γ específicas de gag. El respondedor IM + IL-12 obtuvo un pequeño porcentaje de células polifuncionales que se teñían para las tres citoquinas así como una población que
 10 había perdido su capacidad de producir IL-2. El respondedor EP obtuvo respuestas polifuncionales ligeramente mayores que estaban comprendidas de cuatro poblaciones diferentes. La respuesta más drástica se observó en el segundo animal EP + IL-12. Más del 2 % de estas células T CD8+ eran capaces de producir las tres citoquinas y el 2 % era capaz de producir tanto IFN γ como TNF α . Claramente, la cantidad de animales en cada grupo es baja y requiere estudios adicionales en primates para confirmar estos resultados, sin embargo, colectivamente las tendencias observadas parecen claras y prometedoras.

Análisis

15 IL-12 como adyuvante de vacuna de ADN mejoró las respuestas ELISpot varias veces sobre el plásmido en solitario. Además, la proliferación se potenció claramente. El grupo EP mostró una respuesta promedio mayor que cualquier grupo IM en solitario o el brazo IM + IL-12 que mostró una respuesta ELISpot combinada que era 3 veces mayor que el grupo IM + IL-12. Las mejores respuestas ELISpot se observaron en el brazo EP + IL-12, que estaba 4 veces sobre el brazo IM + IL-12 y 19 veces sobre IM en solitario.

20 Después de cada inmunización, se determinó la magnitud de la respuesta específica de antígeno por ELISpot de IFN γ . Después de una única inmunización, todos los animales en los grupos EP y EP + IL-12 no solamente obtenían respuestas detectables, tenían promedios que eran mayores que los observados en el grupo IM después de tres inmunizaciones. Después de dos inmunizaciones, las respuestas de IFN γ en los grupos EP y EP + IL-12 eran comparables con las respuestas que se habían presentado en estudios usando vectores víricos. Se observaron
 25 respuestas de memoria sustanciales en los grupos IM + IL-12 y EP cinco meses después de la última inmunización.

La inmunización IM, con o sin IL-12, no provoca una cantidad significativa de anticuerpos. La electroporación era capaz de potenciar las respuestas inmunitarias humorales como se había informado previamente. Todos los animales en los grupos sometidos a electroporación se seroconvirtieron. Aunque los grupos EP y EP + IL-12
 30 obtuvieron títulos similares de punto final después de tres inmunizaciones, la cinética de la inducción de anticuerpos fue ligeramente más rápida en el grupo EP + IL-12.

La capacidad proliferativa de células T CD8 parece potenciarse con EP y plásmido de IL-12. Estos datos apoyan la expansión de memoria observada en el ensayo ELISpot donde la expansión de células T específicas de antígeno es probablemente un resultado del potencial proliferativo potenciado del brazo EP + IL-12.
 35

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
- <120> VACUNAS MEJORADAS Y MÉTODOS PARA USARLAS
- <130> P46844EP2/SJL
- 45 <150> EP12197840.7
- <151> 30-07-2007
- <150> US60/833.861
- <151> 28-07-2006
- 50 <150> US60/833.856
- <151> 28-07-2006
- <150> US60/890.352
- 55 <151> 16-02-2007
- <160> 43
- <170> PatentIn versión 3.4
- 60 <210> 1
- <211> 2142
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 65 <220>

ES 2 589 013 T3

<223> Construcción de secuencia de ADN de envoltura consenso de subtipo A

<400> 1

```

ggatccatgg actggacctg gattctgttc ctggtggccg cggccaccag agtgcacagc      60
agagtgatgg gcatccagcg gaattgccag cacctgtgga gatggggcac catgatcctg     120
ggcatgatca tcatctgctc tgccgccgag aacctgtggg tgaccgtgta ctacggcgtg     180
cctgtgtgga aggacccga gaccaccctg ttctgogcca gcgacgcaa ggcctacgat     240
accgaagtgc acaatgtgtg ggccaccac goctgogtgc ctaccgatcc caacccccag     300
gagatcaacc tggagaacgt gaccgaggag ttcaacatgt ggaagaacaa catggtggag     360
cagatgcaca ccgacatcat cagcctgtgg gaccagagcc tgaagccttg cgtgaagctg     420
accctctgt gcgtgacct gaactgcagc aacgtgaacg tgaccaccaa catcatgaag     480
ggcgagatca agaactgcag cttcaacatg accacogagc tgcgggacaa gaagcagaaa     540
gtgtacagcc tgttctacaa gctggacgtg gtgcagatca acaagagcaa cagcagcagc     600
cagtaccggc tgatcaactg caacaccagc gccatcacc aggcctgcc caaagtgagc     660
ttcgagccca tccccatcca ctactcgcc cctgccggt tcgccatcct gaagtgcaag     720
gacaaggagt ttaacggcac cggcccctgc aagaatgtga gcaccgtgca gtgcaccac     780
ggcatcaagc ccgtggtgtc caccagctg ctgctgaacg gcagcctggc cgaggaggaa     840
gtgatgatcc ggagcgagaa catcaccaac aacgccaaga acatcatcgt gcagctgacc     900

```

5

ES 2 589 013 T3

aagcccgtga agatcaattg cccccgccc aacaacaaca cccggaagag catcagaatc 960
 ggccctggcc aggcotttcta cgccaccggc gacatcatcg gcgatatcag gcaggcccac 1020
 tgcaatgtga gccggaccga gtggaacgag accctgcaga aagtggccaa gcagctgcgg 1080
 aagtacttca acaacaagac catcatcttc accaacagca gcggcggcag actgagaatc 1140
 accaccaca gcttcaattg tggcggcgag ttcttctact gcaatacctc cggcctgttc 1200
 aacagcacct ggaacggcaa cggcaccaag aagaagaaca gcaccgagag caacgacacc 1260
 atcacctgc cctgccggat caagcagatc atcaatatgt ggcagagggt gggccaggcc 1320
 atgtacgccc ctcccatcca gggcgtgatc agatgcgaga gcaacatcac cggcctgctg 1380
 ctgaccagag atggcggcga caacaacagc aagaacgaga ccttcagacc tggcggcgga 1440
 gacatgaggg acaactggcg gagcagctg tacaagtaca aagtggtgaa gatcgagccc 1500
 ctgggcgtgg cccccaccaa ggccaagaga agagtgggtg agcgggagaa gagagctgtg 1560
 ggcacgaggc ccgtgttctt cggcttctct ggagccgccc gaagcaacct gggagccgcc 1620
 agcatcacc tgaccgtgca ggccagacag ctgctgagcg gcattgtgca gcagcagagc 1680
 aacctgctga gagccatcga gggccagcag cacctgctga agctgacagt gtggggcatc 1740
 aaacagctgc aggcccgct gctggccgtg gagagatacc tgaaggacca gcagctgctg 1800
 ggcacctggg gctgcagcgg caagctgatc tgcaccacca acgtgcctct gaatagcagc 1860
 tggagcaaca agagccagag cgagatctgg gacaacatga cctggctgca gtgggacaag 1920
 gagatcagca actacaccga tatcatctac aacctgatcg aggagagcca gaaccagcag 1980
 gagaagaacg agcaggatct gctggccctg gacaagtggg ccaacctgtg gaactggttc 2040
 gacatcagca actggctgtg gtacatcaag atcttcatca tgattgtggg cggcctgatc 2100
 ggcctgagaa tcgtgttcgc cgtgctgtct gtgtgactcg ag 2142

<210> 2
 <211> 709
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción de secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo A

10

<400> 2

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

His Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg
 20 25 30

Trp Gly Thr Met Ile Leu Gly Met Ile Ile Ile Cys Ser Ala Ala Glu
 35 40 45

ES 2 589 013 T3

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Asp Ala
 50 55 60

Glu Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 65 70 75 80

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 85 90 95

Pro Gln Glu Ile Asn Leu Glu Asn Val Thr Glu Glu Phe Asn Met Trp
 100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Thr Asp Ile Ile Ser Leu Trp
 115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
 130 135 140

Leu Asn Cys Ser Asn Val Asn Val Thr Thr Asn Ile Met Lys Gly Glu
 145 150 155 160

Ile Lys Asn Cys Ser Phe Asn Met Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys
 165 170 175

Gln Lys Val Tyr Ser Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val Val Gln Ile Asn
 180 185 190

Lys Ser Asn Ser Ser Ser Gln Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser
 195 200 205

Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Glu Pro Ile Pro Ile
 210 215 220

His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys
 225 230 235 240

Glu Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val Ser Thr Val Gln Cys
 245 250 255

Thr His Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly
 260 265 270

Ser Leu Ala Glu Glu Glu Val Met Ile Arg Ser Glu Asn Ile Thr Asn
 275 280 285

Asn Ala Lys Asn Ile Ile Val Gln Leu Thr Lys Pro Val Lys Ile Asn

ES 2 589 013 T3

290																			
Cys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Pro				
305					310					315					320				
Gly	Gln	Ala	Phe	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln				
				325					330					335					
Ala	His	Cys	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Trp	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Lys				
			340					345					350						
Val	Ala	Lys	Gln	Leu	Arg	Lys	Tyr	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe				
		355					360					365							
Thr	Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Arg	Ile	Thr	Thr	His	Ser	Phe	Asn				
	370					375						380							
Cys	Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Phe	Asn	Ser				
385					390					395					400				
Thr	Trp	Asn	Gly	Asn	Gly	Thr	Lys	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr	Glu	Ser	Asn				
				405					410					415					
Asp	Thr	Ile	Thr	Leu	Pro	Cys	Arg	Ile	Lys	Gln	Ile	Ile	Asn	Met	Trp				
			420					425					430						
Gln	Arg	Val	Gly	Gln	Ala	Met	Tyr	Ala	Pro	Pro	Ile	Gln	Gly	Val	Ile				
		435					440					445							
Arg	Cys	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Arg	Asp	Gly	Gly				
	450					455					460								
Asp	Asn	Asn	Ser	Lys	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly	Gly	Asp	Met				
465					470					475					480				
Arg	Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val	Val	Lys	Ile				
				485					490						495				
Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Lys	Ala	Lys	Arg	Arg	Val	Val	Glu				
			500					505					510						
Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Val	Gly	Ile	Gly	Ala	Val	Phe	Leu	Gly	Phe	Leu				
		515					520					525							
Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Ile	Thr	Leu	Thr	Val				
	530					535					540								

ES 2 589 013 T3

Gln Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu
545 550 555 560

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

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

Lys Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile
595 600 605

Cys Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln
610 615 620

Ser Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile
625 630 635 640

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

Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala
660 665 670

Asn Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys
675 680 685

Ile Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe
690 695 700

Ala Val Leu Ser Val
705

<210> 3
<211> 2734
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción de secuencia de ADN de envoltura consenso de subtipo B

<400> 3

5

10

ES 2 589 013 T3

ggatccgcc	ccatggactg	gacctggatt	ctgttcctgg	tggccgccgc	caccagagtg	60
cacagcagag	tgaagggcat	ccggaagaac	taccagcacc	tgtggagatg	gggcaccatg	120
ctgctgggca	tgtgatgat	ctgttctgcc	gccgagaagc	tgtgggtgac	cgtgtactac	180
ggcgtgcctg	tgtggaagga	ggccaccacc	accctgttct	gcgccagcga	cgccaaggcc	240
tacgataccg	aagtgcacaa	tgtgtgggcc	accacgcct	gcgtgcctac	cgatcccaac	300

ES 2 589 013 T3

cctcaggaag tgggtgctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacaacatg 360
gtggagcaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gccttgcggtg 420
aagctgaccc ctctgtgCGT gaccctgaac tgcacogacc tgagcggcga gaagatggag 480
aagggcgaga tcaagaactg cagcttcaac atcaccacct ccatccggga caaagtgcag 540
aaggagtacg ccctgttcta caagctggac gtggtgccca tcgacaacga caacaccagc 600
taccggctga tcagctgcaa caccagcgtg atcaccagc cctgccccaa agtgagcttc 660
gagcccatcc ccatcacta ctgcgcccct gccggcttgc ccatcctgaa gtgcaacgac 720
aagaagttca acggcaccgg cccttgacc aatgtgagca ccgtgcagtg caccacoggc 780
atcagacccg tgggtgtccac ccagctgctg ctgaacggca gcctggccga ggaagaagtg 840
gtgatccgga gcgagaattt caccaacaac gccaaagacca tcatcgtgca gctgaacgag 900
agcgtggaga tcaactgcac ccggcccaac aacaataccc ggaagagcat ccacatcggc 960
cctggccagg ccttctacac caccggcgag atcatcggcg atatcaggca ggcccactgc 1020
aatatcagcc gggccaagtg gaacaacacc ctgaagcaga tcgtgaagaa gctgcgggag 1080
cagttcggca acaagacat cgtgttcaac cagagcagcg gcggcagacc tagaatcgtg 1140
atgcacagct tcaactgtgg cggcgagttc ttctactgca acacaaccca gctgttcaac 1200
agcacctgga acgtgaacgg gacctggaac aacaacaccg agggcaacga caccatcacc 1260
ctgccctgcc ggatcaagca gatcatcaat atgtggcagg aggtgggcaa ggccatgtac 1320
gccctccca tcagaggcca gatccggtgc agcagcaata tcaccggcct gctgctgacc 1380
agagatggcg gcaacaataa caccaacgag accgagatct ttagacctg cggcgagagac 1440
atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat cgagccoctg 1500
ggcgtggccc ccaccaaggc caagagaaga gtggtgacgc gggagaagag agctgtgggc 1560
atcggcgcca tgtttctggg ctttctggga gccgcccga gacccatggg agccgcccagc 1620
atgacctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tcgtgcagca gcagaacaac 1680
ctgctgagag ccatcgaggc ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg gggcatcaag 1740
cagctgcagg cccgcgtgct ggccgtggag agatacctga aggaccagca gctgctggga 1800
atctggggct gcagcggcaa gctgatctgc accaccaccg tgccctggaa cggcagctgg 1860
agcaacaaga gcctggacga gatctgggac aacatgacct ggatggagtg ggagcgggag 1920
atcgacaact acaccagcct gatctacacc ctgatcgagg agagccagaa ccagcaggag 1980
aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa ctggttcgac 2040
atcaccaact ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtgggcgg cctgatcggc 2100
ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcatc taccctacg acgtgcccga ttacgcctga 2160
gaattcgtaa gtaagtgtca tatgggagag ctgcactaga ctggacagcc aatgacgggt 2220

ES 2 589 013 T3

aagagagtga catttctcac taacctaaaga caggagggcc gtcaaagcta ctgcctaatac 2280
 caatgacggg taatagtgac aagaaatgta tcaactccaac ctaagacagg cgcagcctcc 2340
 gagggatgtg tcttttgttt tttataatta aaaaggggtga catgtccgga gccgtgctgc 2400
 ccggatgatg tcttggcctc tgtttgctac cggtatcgat gttaacgtcg accccgggct 2460
 cgaggttaagt aagtgtcata tgggagagct cgactagact ggacagccaa tgacgggtaa 2520
 gagagtgaca tttctcacta acctaagaca ggagggccgt caaagctact gcctaatacca 2580
 atgacgggta atagtgacaa gaaatgtatc actccaacct aagacaggcg cagcctccga 2640
 gggatgtgtc ttttgttttt tataattaa aagggtgaca tgtccggagc cgtgctgccc 2700
 ggatgatgtc ttggcctctg tttgctgagg ccgc 2734

<210> 4

<211> 715

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción de secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo B

<400> 4

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

His Ser Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg
 20 25 30

Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Ile Cys Ser Ala Ala Glu
 35 40 45

Lys Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
 50 55 60

Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ala Tyr Asp Thr Glu
 65 70 75 80

Val His Asn Val Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
 85 90 95

Pro Gln Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
 100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
 115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr

5

10

ES 2 589 013 T3

130		135		140											
Leu 145	Asn	Cys	Thr	Asp	Leu 150	Ser	Gly	Glu	Lys	Met 155	Glu	Lys	Gly	Glu	Ile 160
Lys	Asn	Cys	Ser	Phe 165	Asn	Ile	Thr	Thr	Ser 170	Ile	Arg	Asp	Lys	Val 175	Gln
Lys	Glu	Tyr	Ala 180	Leu	Phe	Tyr	Lys	Leu 185	Asp	Val	Val	Pro	Ile	Asp 190	Asn
Asp	Asn	Thr 195	Ser	Tyr	Arg	Leu	Ile 200	Ser	Cys	Asn	Thr	Ser	Val 205	Ile	Thr
Gln 210	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser 215	Phe	Glu	Pro	Ile 220	Pro	Ile	His	Tyr	Cys
Ala 225	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala 230	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn 235	Asp	Lys	Lys	Phe	Asn 240
Gly	Thr	Gly	Pro	Cys 245	Thr	Asn	Val	Ser	Thr 250	Val	Gln	Cys	Thr	His 255	Gly
Ile	Arg	Pro	Val 260	Val	Ser	Thr	Gln	Leu 265	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser 270	Leu	Ala
Glu	Glu	Glu	Val 275	Val	Ile	Arg	Ser 280	Glu	Asn	Phe	Thr	Asn 285	Asn	Ala	Lys
Thr 290	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Asn 295	Glu	Ser	Val	Glu	Ile 300	Asn	Cys	Thr	Arg
Pro 305	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg 310	Lys	Ser	Ile	His	Ile 315	Gly	Pro	Gly	Gln	Ala 320
Phe	Tyr	Thr	Thr	Gly 325	Glu	Ile	Ile	Gly	Asp 330	Ile	Arg	Gln	Ala	His 335	Cys
Asn	Ile	Ser	Arg 340	Ala	Lys	Trp	Asn	Asn 345	Thr	Leu	Lys	Gln	Ile 350	Val	Lys
Lys	Leu	Arg 355	Glu	Gln	Phe	Gly	Asn 360	Lys	Thr	Ile	Val	Phe 365	Asn	Gln	Ser
Ser 370	Gly	Gly	Arg	Pro	Arg	Ile 375	Val	Met	His	Ser	Phe 380	Asn	Cys	Gly	Gly

ES 2 589 013 T3

Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Thr Gln Leu Phe Asn Ser Thr Trp Asn
 385 390 395 400
 Val Asn Gly Thr Trp Asn Asn Asn Thr Glu Gly Asn Asp Thr Ile Thr
 405 410 415
 Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly
 420 425 430
 Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Arg Gly Gln Ile Arg Cys Ser Ser
 435 440 445
 Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asn Asn Asn Thr
 450 455 460
 Asn Glu Thr Glu Ile Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn
 465 470 475 480
 Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu Pro Leu
 485 490 495
 Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Gln Arg Glu Lys
 500 505 510
 Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Met Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala
 515 520 525
 Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Met Thr Leu Thr Val Gln Ala Arg
 530 535 540
 Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Asn Asn Leu Leu Arg Ala
 545 550 555 560
 Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Gln Leu Thr Val Trp Gly Ile Lys
 565 570 575
 Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys Asp Gln
 580 585 590
 Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys Thr Thr
 595 600 605
 Thr Val Pro Trp Asn Ala Ser Trp Ser Asn Lys Ser Leu Asp Glu Ile
 610 615 620
 Trp Asp Asn Met Thr Trp Met Glu Trp Glu Arg Glu Ile Asp Asn Tyr
 625 630 635 640

ES 2 589 013 T3

Thr Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln Gln Glu
645 650 655

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

Asn Trp Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile
675 680 685

Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu
690 695 700

Ser Ile Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
705 710 715

<210> 5
<211> 2140
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción de secuencia de ADN de envoltura consenso de subtipo C

<400> 5

ggatccgcca ccatggattg gacctggatt ctgttctctgg tggccgccc cacaagagtg 60
cacagcagag tgcggggcat cctgagaaat tgccagcagt ggtggatctg gggcattctg 120
gggttctgga tgctgatgat ctgcaacgtg atgggcaacc tgtgggtgac cgtgtactac 180
ggcgtgcctg tgtggaagga ggccaagacc accctgttct gtgccagcga tgccaaggcc 240
tacgagaccg aggtgcacaa tgtgtgggcc acccacgcct gtgtgcccac cgatcccaac 300
cctcaggaga tgggtctgga gaacgtgacc gagaacttca acatgtggaa gaacgacatg 360
gtggaccaga tgcacgagga catcatcagc ctgtgggacc agagcctgaa gcottgctg 420
aagctgacc ctctgtgctg gaccctgaac tgccggaaca acgtgaaca caacaacacc 480
atgaaggagg agatcaagaa ctgcagcttc aacatcacca ccgagctgcg ggacaagaag 540
cagaaggtgt acgccctgtt ctaccggctg gacatcgtgc ccctgaacga gaagaacaac 600
agcaacgact accggctgat caactgcaac accagcgcga tcaccagge ctgtcccaag 660
gtgtccttcg accccatccc catccactat tgtgcccctg cgggctacgc catcctgaag 720
tgcaacaaca agaccttcaa cggcacoggc coctgcaata atgtgagcac cgtgcagtgt 780
accacggca tcaagcctgt ggtgtccacc cagotgctgc tgaatggcag cctggccgag 840
gaggagatta tcatccggag cgagaacctg accaacaacg ccaagaccat cattgtgcac 900
ctgaatgaga gcgtggagat cgtgtgtacc cggcccaca acaataccg gaagagcatc 960
agaatcggcc ctggccagac cttttacgcc accggcgaca tcatcggcga tatcaggcag 1020

ES 2 589 013 T3

gccactgca atatcagcga ggagaagtgg aacaagacc tgcagcgggt gtccgagaag 1080
 ctgaaggagc acttcccocaa taagaccatc aagttcgccc ctagcagcgg cggcagactg 1140
 gagatcacca cccacagctt caactgcagg ggcgagttct tctactgcaa taccagcaag 1200
 ctgttcaaca gcacctacat gcccaacagc accaacaata ccaacaccac catcacctg 1260
 ccctgccgga tcaagcagat catcaatatg tggcaggaag tgggcagagc catgtacgcc 1320
 cctcccatcg agggaacat cacctgcaag tccaacatca cgggctgct gctgacaaga 1380
 gatggcggca agaacgacac caatgacacc gagaccttca gacctggcgg cggagacatg 1440
 agggacaact ggcggagcga gctgtacaag tacaaggtgg tggagatcaa gcctctgggc 1500
 gtggccccta ccaaggccaa gaggagagtg gtggagaggg agaagagagc cgtgggcatc 1560
 ggcgcctgtt ttctgggctt tctgggagcc gccggatcta caatgggagc cgccagcatc 1620
 aactgaccg tgcaggccag acagctgctg agcggcatcg tgcagcagca gagcaatctg 1680
 ctgagagcca tcgaggccca gcagcacatg ctgcagctga cagtgtgggg catcaagcag 1740
 ctgcagacca gagtgtctggc catcgagcgc tacctgaagg atcagcagct gctgggcatc 1800
 tggggctgta gcggcaagct gatctgtacc accgccgtgc cttggaatag cagctggagc 1860
 aacaagagcc aggaggacat ctgggacaac atgacctgga tgcagtggga ccgggagatc 1920
 agcaactaca ccgacacat ctacaggctg ctggaggaca gccagaacca gcaggagaag 1980
 aacgagaagg acctgctggc cctggacagc tggaagaacc tgtggaactg gttcgacatc 2040
 accaactggc tgtggtacat caagatcttc atcatgattg tgggcggcct gatcggcctg 2100
 agaatcatct tcgccgtgct gagcatctga tagcggccgc 2140

<210> 6
 <211> 705
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Construcción de secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo C

10

<400> 6

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

His Ser Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile
 20 25 30

Trp Gly Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly
 35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala

ES 2 589 013 T3

50						55										60
Lys	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Ala	Ser	Asp	Ala	Lys	Ala	Tyr	Glu	Thr	Glu	
65					70					75					80	
Val	His	Asn	Val	Trp	Ala	Thr	His	Ala	Cys	Val	Pro	Thr	Asp	Pro	Asn	
				85					90					95		
Pro	Gln	Glu	Met	Val	Leu	Glu	Asn	Val	Thr	Glu	Asn	Phe	Asn	Met	Trp	
			100					105					110			
Lys	Asn	Asp	Met	Val	Asp	Gln	Met	His	Glu	Asp	Ile	Ile	Ser	Leu	Trp	
		115					120					125				
Asp	Gln	Ser	Leu	Lys	Pro	Cys	Val	Lys	Leu	Thr	Pro	Leu	Cys	Val	Thr	
	130					135					140					
Leu	Asn	Cys	Arg	Asn	Asn	Val	Asn	Asn	Asn	Asn	Thr	Met	Lys	Glu	Glu	
145					150					155					160	
Ile	Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Asn	Ile	Thr	Thr	Glu	Leu	Arg	Asp	Lys	Lys	
				165					170					175		
Gln	Lys	Val	Tyr	Ala	Leu	Phe	Tyr	Arg	Leu	Asp	Ile	Val	Pro	Leu	Asn	
			180					185					190			
Glu	Lys	Asn	Asn	Ser	Asn	Asp	Tyr	Arg	Leu	Ile	Asn	Cys	Asn	Thr	Ser	
		195					200					205				
Ala	Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Asp	Pro	Ile	Pro	Ile	
	210					215					220					
His	Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Tyr	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Asn	Asn	Lys	
225					230					235					240	
Thr	Phe	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Asn	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	
				245					250					255		
Thr	His	Gly	Ile	Lys	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	
			260					265						270		
Ser	Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Ile	Ile	Ile	Arg	Ser	Glu	Asn	Leu	Thr	Asn	
		275					280					285				
Asn	Ala	Lys	Thr	Ile	Ile	Val	His	Leu	Asn	Glu	Ser	Val	Glu	Ile	Val	
	290					295					300					

ES 2 589 013 T3

Cys Thr Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro
 305 310 315 320

Gly Gln Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln
 325 330 335

Ala His Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg
 340 345 350

Val Ser Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe
 355 360 365

Ala Pro Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn
 370 375 380

Cys Arg Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser
 385 390 395 400

Thr Tyr Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu
 405 410 415

Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg
 420 425 430

Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu Gly Asn Ile Thr Cys Lys Ser Asn
 435 440 445

Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Lys Asn Asp Thr Asn
 450 455 460

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

Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Glu Ile Lys Pro Leu Gly
 485 490 495

Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Glu Lys Arg
 500 505 510

Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly Ala Ala Gly
 515 520 525

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

Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Ile
 545 550 555 560

ES 2 589 013 T3

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

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

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

Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Glu Asp Ile Trp
 610 615 620

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

Asp Thr Ile Tyr Arg Leu Leu Glu Asp Ser Gln Asn Gln Gln Glu Lys
 645 650 655

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

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

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

Ile
 705

<210>7
 <211> 2089
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción de secuencia de ADN de envoltura consenso de subtipo D

<400> 7

gggcatcaag cggaattacc agcacctgtg gaagtggggc accatgctgc tgggcatgct 60
 gatgacctgc agcgtggccg agaacctgtg ggtgacctg tactacggcg tgcctgtgtg 120
 gaaggaagcc accaccaccc tgttctgctc cagcgtatgcc aagagctaca agaccgaggc 180
 ccacaatatc tgggccaccc acgcctgcgt gctaccgat cccaaccctc aggagatcga 240
 gctggagaac gtgaccgaga acttcaacat gtggaagaac aacatggtgg agcagatgca 300
 cgaggacatc atcagcctgt gggaccagag cctgaagcct tgcgtgaagc tgaccctct 360
 gtgcgtgacc ctgaactgca cgcacggcat gaggaacgac accaacgata ccaacgtgac 420

ES 2 589 013 T3

catggaggag ggcgagatga agaactgcag cttcaacatc accaccgaag tgcgggacaa 480
 gaagaagcag gtgcacgccc tgttctacaa gctggacgtg gtgcccacg acgacaacaa 540
 caccaacaac agcaactacc ggctgatcaa ctgcaacacc agcgccatca cccaggcctg 600
 ccccaaagtg accttcgagc ccatccccat ccactactgc gccctgccc gcttcgccat 660
 cctgaagtgc aaggataaga agttcaacgg caccggcccc tgcaagaatg tgagcacctg 720
 gcagtgcacc cagggcatca gacccgtggt gtccaccacg ctgctgctga acggcagcct 780
 ggccgaggag gagatcatca tccggagcga gaacctgacc aacaacgcca agatcatcat 840
 tgtgcagctg aacgagagcg tgaccatcaa ttgcacccgg ccctacaaca atacccggaa 900
 ggcgatcccc atcggcctgg gccaggcctt ctacaccacc agaggcatca tccggacat 960
 cagacaggcc cactgcaata tcagcggagc cgagtggaat aagaccctgc agcaggtggc 1020
 caagaagctg ggcgacctgc tgaacaagac caccatcatc ttcaagccta gcagcggcgg 1080
 cagacctaga atcaccacc acagcttcaa ttgtggcggc gagttcttct actgcaatac 1140
 cagccggctg ttcaacagca cctggagcaa gaacagcacc agcaactoca ccaaggagaa 1200
 caacaccatc accctgccct gccggatcaa gcagatcatc aatagtggc agggagtggg 1260
 caaggccatg tacgcccctc ccatcgaggg cctgatcaag tgcagcagca acatcaccgg 1320
 cctgctgctg accagagatg gcggagccaa caactcccac aacgagacct tcagacctgg 1380
 cggcggagac atgagggaca actggcggag cgagctgtac aagtacaaag tggatgaagat 1440
 cgagcccctg ggcgtggccc ccaccagagc caagagaaga gtggtggagc gggagaagag 1500
 agccatcgga ctgggcgcca tgttctctggg cttcctggga gccgcccggaa gcaccatggg 1560
 agccgccagc ctgaccctga ccgtgcaggc cagacagctg ctgagcggca tccgtgcagca 1620
 gcagaacaac ctgctgagag ccattgaggg ccagcagcac ctgctgcagc tgacagtgtg 1680
 gggcattaag cagctgcagg ccaggattct ggccgtggag cgctacctga aggatcagca 1740
 gctgctggga atctggggct gcagcggcaa gcacatctgc accaccaccg tgccttggaa 1800
 tagcagctgg agcaacaaga gcctggacga gatctggaac aacatgacct ggatggagtg 1860
 ggagagggag atcgacaact acaccggcct gatctacagc ctgatcgagg agagccagac 1920
 ccagcaggag aagaacgagc aggagctgct ggagctggac aagtgggcca gcctgtggaa 1980
 ctggttcagc atcaccagc ggctgtggta catcaagatc ttcatcatga ttgtggcggg 2040
 cctgatcggc ctgagaatcg tgttcgccgt gctgagcctg tgactcgag 2089

<210> 8
 <211> 714
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Construcción de secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo D

<400> 8

ES 2 589 013 T3

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

His Ser Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys
20 25 30

Trp Gly Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu
35 40 45

Asn Leu Trp Val Thr Val Tyr Tyr Gly Val Pro Val Trp Lys Glu Ala
50 55 60

Thr Thr Thr Leu Phe Cys Ala Ser Asp Ala Lys Ser Tyr Lys Thr Glu
65 70 75 80

Ala His Asn Ile Trp Ala Thr His Ala Cys Val Pro Thr Asp Pro Asn
85 90 95

Pro Gln Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp
100 105 110

Lys Asn Asn Met Val Glu Gln Met His Glu Asp Ile Ile Ser Leu Trp
115 120 125

Asp Gln Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr
130 135 140

Leu Asn Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val
145 150 155 160

Thr Met Glu Glu Gly Glu Met Lys Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr
165 170 175

Glu Val Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu
180 185 190

Asp Val Val Pro Ile Asp Asp Asn Asn Thr Asn Asn Ser Asn Tyr Arg
195 200 205

Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val
210 215 220

Thr Phe Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala
225 230 235 240

ES 2 589 013 T3

Ile Leu Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys
 245 250 255

Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser
 260 265 270

Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile
 275 280 285

Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu
 290 295 300

Asn Glu Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg
 305 310 315 320

Lys Arg Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly
 325 330 335

Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu
 340 345 350

Trp Asn Lys Thr Leu Gln Gln Val Ala Lys Lys Leu Gly Asp Leu Leu
 355 360 365

Asn Lys Thr Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Ser Gly Gly Arg Pro Arg
 370 375 380

Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn
 385 390 395 400

Thr Ser Arg Leu Phe Asn Ser Thr Trp Ser Lys Asn Ser Thr Ser Asn
 405 410 415

Ser Thr Lys Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln
 420 425 430

Ile Ile Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro
 435 440 445

Ile Glu Gly Leu Ile Lys Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu
 450 455 460

Thr Arg Asp Gly Gly Ala Asn Asn Ser His Asn Glu Thr Phe Arg Pro
 465 470 475 480

Gly Gly Gly Asp Met Arg Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr

ES 2 589 013 T3

				485						490					495
Lys	Val	Val	Lys	Ile	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala	Lys
			500					505					510		
Arg	Arg	Val	Val	Glu	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	Gly	Ala	Met
		515					520					525			
Phe	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser
	530					535					540				
Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln
545					550					555					560
Gln	Gln	Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu
				565					570					575	
Gln	Leu	Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala
			580					585					590		
Val	Glu	Arg	Tyr	Leu	Lys	Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys
		595					600					605			
Ser	Gly	Lys	His	Ile	Cys	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	Trp	Asn	Ser	Ser	Trp
	610					615					620				
Ser	Asn	Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Trp	Asn	Asn	Met	Thr	Trp	Met	Glu
625					630					635					640
Trp	Glu	Arg	Glu	Ile	Asp	Asn	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Ser	Leu	Ile
				645					650					655	
Glu	Glu	Ser	Gln	Thr	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu
			660					665					670		
Leu	Asp	Lys	Trp	Ala	Ser	Leu	Trp	Asn	Trp	Phe	Ser	Ile	Thr	Gln	Trp
		675					680					685			
Leu	Trp	Tyr	Ile	Lys	Ile	Phe	Ile	Met	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly
	690					695					700				
Leu	Arg	Ile	Val	Phe	Ala	Val	Leu	Ser	Leu						
705					710										

<210> 9
 <211> 1049
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 589 013 T3

<220>
 <223> Construcción de secuencia de ADN de Nef-Rev consenso de subtipo B

5 <400> 9

```

ggatccgcca ccatggactg gacctggatt ctgttcctgg tggccgctgc caccagagtg      60
cacagcagca agagaagcgt ggtgggttgg cctacagtgc gggagaggat gagaagagcc      120
gagcctgccc ccgatggagt gggcgccgtg tctagagatc tggagaagca cggcgccatc      180
accagcagca ataccgccgc caacaatgcc gactgcccct ggctggaggc ccaggaggag      240
gaggaagtgg gcttcctgtg gagagcccag gtggccctga gagccatgac ctacaaggcc      300
gccgtggatc tgagccactt cctgaaggag aagggcggcc tggagggcct gatctacagc      360
cagaagcggc aggacatcct ggatctgtgg gtgtaccaca cccagggcta cttccccgac      420
tggcagaatt acacccttgg ccctggcatc agatacctc tgaccttcgg ctggtgcttc      480
aagctggtgc ctgtggagcc tgagaaagtg gaggaggcca acgagggcga gaacaattct      540
gccgcccacc ctatgagcct gcacggcatg gacgatcccg agaggggaagt gctggtgtgg      600
aagttcgaca gcaggctggc cttccaccac atggccagag agctgcaccc cgagtactac      660
aaggactgcc ggggcaggaa gagaagaagc gccggcagaa gcggcgacag cgacgaggag      720
ctgctgaaaa cagtgcggct gatcaagttc ctgtaccaga gcaaccctcc tcccagcccc      780
gagggcacca gacaggcccc gagaaaccgg aggagggcgt ggagagagag gcagcggcag      840
atcagaagca tcagcgagtg gattctgagc acctacctgg gcagaccgcg cgagcccgtg      900
cccctgcagc tgccccccct ggagagactg accctggact gcaacgagga ctgcggcacc      960
agcggcaccc agggagtggg cagccccag atcctggtgg agagccctgc cgtgctggag     1020
agcggcacca aggagtgatg agcggcccgc                                     1049
    
```

10 <210> 10
 <211> 341
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Construcción de secuencia de proteína de Nef-Rev consenso de subtipo B

<400> 10

```

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

His Ser Ser Lys Arg Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg
           20           25           30

Met Arg Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg
           35           40           45
    
```

20

ES 2 589 013 T3

Asp Leu Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn
 50 55 60

Asn Ala Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Val Gly
 65 70 75 80

Phe Pro Val Arg Ala Gln Val Ala Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Ala
 85 90 95

Ala Val Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly
 100 105 110

Leu Ile Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr
 115 120 125

His Thr Gln Gly Tyr Phe Pro Asp Trp Gln Asn Tyr Thr Pro Gly Pro
 130 135 140

Gly Ile Arg Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Trp Cys Phe Lys Leu Val Pro
 145 150 155 160

Val Glu Pro Glu Lys Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu Asn Asn Ser
 165 170 175

Ala Ala His Pro Met Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu
 180 185 190

Val Leu Val Trp Lys Phe Asp Ser Arg Leu Ala Phe His His Met Ala
 195 200 205

Arg Glu Leu His Pro Glu Tyr Tyr Lys Asp Cys Arg Gly Arg Lys Arg
 210 215 220

Arg Ser Ala Gly Arg Ser Gly Asp Ser Asp Glu Glu Leu Leu Lys Thr
 225 230 235 240

Val Arg Leu Ile Lys Phe Leu Tyr Gln Ser Asn Pro Pro Pro Ser Pro
 245 250 255

Glu Gly Thr Arg Gln Ala Arg Arg Asn Arg Arg Arg Arg Trp Arg Glu
 260 265 270

Arg Gln Arg Gln Ile Arg Ser Ile Ser Glu Trp Ile Leu Ser Thr Tyr
 275 280 285

Leu Gly Arg Pro Ala Glu Pro Val Pro Leu Gln Leu Pro Pro Leu Glu
 290 295 300

ES 2 589 013 T3

Arg Leu Thr Leu Asp Cys Asn Glu Asp Cys Gly Thr Ser Gly Thr Gln
305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Pro Gln Ile Leu Val Glu Ser Pro Ala Val Leu Glu
325 330 335

Ser Gly Thr Lys Glu
340

<210> 11
<211> 1863
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN consenso Gag de construcción de subtipo A, B, C y D

<400> 11

ggatccgccca ccatggactg gacctggatt ctgtttctgg tgcgccccgc cacaagagtg 60
cacagcggcg ccagagccag cgtgctgtcc ggcggcaagc tggacgcctg ggagaagatc 120
agactgaggc ctggcggcaa gaagaagtac cggctgaagc accttgtgtg ggccagcaga 180
gagctggaga gattcgcctt gaatcctggc ctgctggaga ccagcgaggg ctgtaagcag 240
atcatcggcc agctgcagcc cgcctcagc accggcagcg aggagctgag aagcctgtac 300
aacaccgtgg ccaccctgta ctgcgtgcac gagaagatcg aggtgaagga caccaaggag 360
gccctggaca agatcgagga ggagcagaac aagagcaagc agaaggcca gcaggccgcc 420
gccgacaccg gcaacagcag ccaggtgtcc cagaactacc ccatcgtgca gaatctgcag 480
ggccagatgg tgcaccaggc catcagcccc agaaccctga atgcctgggt gaaggtgatc 540
gaggagaagg ccttcagccc tgaggtgatc cctatgttca gcgccctgag cgagggcgcc 600
acaacctcagg acctgaacac catgctgaac acagtggggg gccaccaggc cgccatgcag 660
atgctgaagg ataccatcaa cgaggaggcc gccgagtggg acagactgca ccccgtgcac 720
gccggacctc tgcgccctgg ccagatgaga gagcccagag gcagcgacat cgccggcacc 780
acctccaccc tgcaagagca gatcggctgg atgaccagca acccccccat ccctgtgggc 840
gacatctaca agcgggtgat catcctgggc ctgaacaaga ttgtgaggat gtacagcccc 900
gtgtccatcc tggatatcag gcagggcccc aaggagccct tcagagacta cgtggaccgg 960
ttcttcaaga ccctgagagc cgagcaggcc agccaggagc tgaagaactg gatgaccgag 1020
accctgctgg tgcagaacgc caaccocgac tgtaagacca tctgagagc octgggcccct 1080
ggcgccaccc tggaggagat gatgaccgcc tgccaggagc tgggcggacc cggccacaag 1140
gccagagtgc tggccgaggc catgagccag gccaccaaca gcaacatcat gatgcagcgg 1200

ES 2 589 013 T3

```

ggcaacttca gaggccccag gaggatcgtg aagtgttca actgtggcaa ggagggccac 1260
atcgccagaa actgtagggc cccaggaag aagggctgct ggaagtgtgg caaagagggg 1320
caccagatga aggactgtac cgagcggcag gcccaatttc tggggaagat ctggcccagc 1380
cacaagggca gacccggcaa tttcctgcag agcagacctg agcccaccgc ccctcccgcc 1440
gagagcttgc gcttcggcga ggagatcacc cccagccccca agcaggagcc caaggacaga 1500
gagctgtacc ctctggccag cctgaagagc ctgttcggca acgatcccct gagccagtac 1560
ccctacgacg tgcccgatta cgctgagaa ttctgaagta agtgtcatat gggagagctc 1620
gactagactg gacagccaat gacgggtaag agagtgacat ttctactaa cctaagacag 1680
gagggccgtc aaagctactg cctaatacaa tgacgggtaa tagtgacaag aaatgtatca 1740
ctccaacctc agacaggcgc agcctccgag ggatgtgtct tttgtttttt ataattaa 1800
agggtgacat gtccggagcc gtgctgcccg gatgatgtct tggcctctgt ttgctgcggc 1860
cgc 1863

```

5
<210> 12
<211> 524
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10
<220>
<223> Secuencia de proteína consenso Gag de construcción de subtipo A, B, C y D

<400> 12

```

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

His Ser Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Lys Leu Asp Ala
20           25           30

Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Arg Leu
35           40           45

Lys His Leu Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Leu Asn
50           55           60

Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Lys Gln Ile Ile Gly Gln
65           70           75           80

Leu Gln Pro Ala Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr
85           90           95

Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Glu Lys Ile Glu Val Lys
100          105          110

```

ES 2 589 013 T3

Asp Thr Lys Glu Ala Leu Asp Lys Ile Glu Glu Glu Gln Asn Lys Ser
 115 120 125

Lys Gln Lys Ala Gln Gln Ala Ala Ala Asp Thr Gly Asn Ser Ser Gln
 130 135 140

Val Ser Gln Asn Tyr Pro Ile Val Gln Asn Leu Gln Gly Gln Met Val
 145 150 155 160

His Gln Ala Ile Ser Pro Arg Thr Leu Asn Ala Trp Val Lys Val Ile
 165 170 175

Glu Glu Lys Ala Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala Leu
 180 185 190

Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr Val
 195 200 205

Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Asp Thr Ile Asn Glu
 210 215 220

Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Leu His Pro Val His Ala Gly Pro Ile
 225 230 235 240

Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly Thr
 245 250 255

Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Ser Asn Pro Pro
 260 265 270

Ile Pro Val Gly Asp Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu Asn
 275 280 285

Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Val Ser Ile Leu Asp Ile Arg Gln
 290 295 300

Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Phe Lys Thr
 305 310 315 320

Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Asp Val Lys Asn Trp Met Thr Glu
 325 330 335

Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg
 340 345 350

Ala Leu Gly Pro Gly Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln
 355 360 365

ES 2 589 013 T3

Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met
 370 375 380

Ser Gln Ala Thr Asn Ser Asn Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg
 385 390 395 400

Gly Pro Arg Arg Ile Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His
 405 410 415

Ile Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys
 420 425 430

Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 435 440 445

Phe Leu Gly Lys Ile Trp Pro Ser His Lys Gly Arg Pro Gly Asn Phe
 450 455 460

Leu Gln Ser Arg Pro Glu Pro Thr Ala Pro Pro Ala Glu Ser Phe Gly
 465 470 475 480

Phe Gly Glu Glu Ile Thr Pro Ser Pro Lys Gln Glu Pro Lys Asp Arg
 485 490 495

Glu Leu Tyr Pro Leu Ala Ser Leu Lys Ser Leu Phe Gly Asn Asp Pro
 500 505 510

Leu Ser Gln Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 515 520

5 <210> 13
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de cebador de IgE 1

<400> 13
 gtcgctccgc tagctgtgg gtcacagtct attatgggg acc 43

15 <210> 14
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de cebador de IgE 2

<400> 14
 ggtcgatcc ttactccacc actctcctt ttgcc 35

25 <210> 15

ES 2 589 013 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de líder de IgE
 <400> 15

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

10 His

<210> 16
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo A

20 <400> 16

Ser Arg Val Met Gly Ile Gln Arg Asn Cys Gln His Leu Trp Arg Trp
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

Asn Cys Ser Asn Val Asn Val Thr Thr Asn Ile Met Lys Gly Glu Ile

ES 2 589 013 T3

130	135	140																	
Lys	Asn	Cys	Ser	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	Glu	Leu	Arg	Asp	Lys	Lys	Gln				
145					150					155					160				
Lys	Val	Tyr	Ser	Leu	Phe	Tyr	Lys	Leu	Asp	Val	Val	Gln	Ile	Asn	Lys				
				165					170					175					
Ser	Asn	Ser	Ser	Ser	Gln	Tyr	Arg	Leu	Ile	Asn	Cys	Asn	Thr	Ser	Ala				
			180					185					190						
Ile	Thr	Gln	Ala	Cys	Pro	Lys	Val	Ser	Phe	Glu	Pro	Ile	Pro	Ile	His				
		195					200					205							
Tyr	Cys	Ala	Pro	Ala	Gly	Phe	Ala	Ile	Leu	Lys	Cys	Lys	Asp	Lys	Glu				
	210					215					220								
Phe	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Cys	Lys	Asn	Val	Ser	Thr	Val	Gln	Cys	Thr				
225					230					235					240				
His	Gly	Ile	Lys	Pro	Val	Val	Ser	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Asn	Gly	Ser				
				245					250					255					
Leu	Ala	Glu	Glu	Glu	Val	Met	Ile	Arg	Ser	Glu	Asn	Ile	Thr	Asn	Asn				
			260					265					270						
Ala	Lys	Asn	Ile	Ile	Val	Gln	Leu	Thr	Lys	Pro	Val	Lys	Ile	Asn	Cys				
		275					280					285							
Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile	Arg	Ile	Gly	Pro	Gly				
	290					295					300								
Gln	Ala	Phe	Tyr	Ala	Thr	Gly	Asp	Ile	Ile	Gly	Asp	Ile	Arg	Gln	Ala				
305					310					315					320				
His	Cys	Asn	Val	Ser	Arg	Thr	Glu	Trp	Asn	Glu	Thr	Leu	Gln	Lys	Val				
				325					330					335					
Ala	Lys	Gln	Leu	Arg	Lys	Tyr	Phe	Asn	Asn	Lys	Thr	Ile	Ile	Phe	Thr				
			340					345					350						
Asn	Ser	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Arg	Ile	Thr	Thr	His	Ser	Phe	Asn	Cys				
		355					360					365							
Gly	Gly	Glu	Phe	Phe	Tyr	Cys	Asn	Thr	Ser	Gly	Leu	Phe	Asn	Ser	Thr				
	370					375					380								

ES 2 589 013 T3

Trp Asn Gly Asn Gly Thr Lys Lys Lys Asn Ser Thr Glu Ser Asn Asp
 385 390 395 400
 Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln
 405 410 415
 Arg Val Gly Gln Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Gln Gly Val Ile Arg
 420 425 430
 Cys Glu Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Asp Gly Gly Asp
 435 440 445
 Asn Asn Ser Lys Asn Glu Thr Phe Arg Pro Gly Gly Gly Asp Met Arg
 450 455 460
 Asp Asn Trp Arg Ser Glu Leu Tyr Lys Tyr Lys Val Val Lys Ile Glu
 465 470 475 480
 Pro Leu Gly Val Ala Pro Thr Lys Ala Lys Arg Arg Val Val Glu Arg
 485 490 495
 Glu Lys Arg Ala Val Gly Ile Gly Ala Val Phe Leu Gly Phe Leu Gly
 500 505 510
 Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly Ala Ala Ser Ile Thr Leu Thr Val Gln
 515 520 525
 Ala Arg Gln Leu Leu Ser Gly Ile Val Gln Gln Gln Ser Asn Leu Leu
 530 535 540
 Arg Ala Ile Glu Ala Gln Gln His Leu Leu Lys Leu Thr Val Trp Gly
 545 550 555 560
 Ile Lys Gln Leu Gln Ala Arg Val Leu Ala Val Glu Arg Tyr Leu Lys
 565 570 575
 Asp Gln Gln Leu Leu Gly Ile Trp Gly Cys Ser Gly Lys Leu Ile Cys
 580 585 590
 Thr Thr Asn Val Pro Trp Asn Ser Ser Trp Ser Asn Lys Ser Gln Ser
 595 600 605
 Glu Ile Trp Asp Asn Met Thr Trp Leu Gln Trp Asp Lys Glu Ile Ser
 610 615 620
 Asn Tyr Thr Asp Ile Ile Tyr Asn Leu Ile Glu Glu Ser Gln Asn Gln
 625 630 635 640

ES 2 589 013 T3

Gln Glu Lys Asn Glu Gln Asp Leu Leu Ala Leu Asp Lys Trp Ala Asn
645 650 655

Leu Trp Asn Trp Phe Asp Ile Ser Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile
660 665 670

Phe Ile Met Ile Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala
675 680 685

Val Leu Ser Val
690

<210> 17

<211> 697

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo B

<400> 17

Arg Val Lys Gly Ile Arg Lys Asn Tyr Gln His Leu Trp Arg Trp Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Val Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
85 90 95

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

Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
115 120 125

Cys Thr Asp Leu Ser Gly Glu Lys Met Glu Lys Gly Glu Ile Lys Asn
130 135 140

5

10

ES 2 589 013 T3

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

ES 2 589 013 T3

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

ES 2 589 013 T3

Phe Asp Ile Thr Asn Trp Leu Trp Tyr Ile Lys Ile Phe Ile Met Ile
 660 665 670

Val Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Ile
 675 680 685

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 690 695

<210> 18

<211> 687

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo B

<400> 18

Arg Val Arg Gly Ile Leu Arg Asn Cys Gln Gln Trp Trp Ile Trp Gly
 1 5 10 15

Ile Leu Gly Phe Trp Met Leu Met Ile Cys Asn Val Met Gly Asn Leu
 20 25 30

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

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

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

Glu Met Val Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
 85 90 95

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

Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
 115 120 125

Cys Arg Asn Asn Val Asn Asn Asn Asn Thr Met Lys Glu Glu Ile Lys
 130 135 140

Asn Cys Ser Phe Asn Ile Thr Thr Glu Leu Arg Asp Lys Lys Gln Lys
 145 150 155 160

5

10

ES 2 589 013 T3

Val Tyr Ala Leu Phe Tyr Arg Leu Asp Ile Val Pro Leu Asn Glu Lys
165 170 175

Asn Asn Ser Asn Asp Tyr Arg Leu Ile Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile
180 185 190

Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Ser Phe Asp Pro Ile Pro Ile His Tyr
195 200 205

Cys Ala Pro Ala Gly Tyr Ala Ile Leu Lys Cys Asn Asn Lys Thr Phe
210 215 220

Asn Gly Thr Gly Pro Cys Asn Asn Val Ser Thr Val Gln Cys Thr His
225 230 235 240

Gly Ile Lys Pro Val Val Ser Thr Gln Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu
245 250 255

Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala
260 265 270

Lys Thr Ile Ile Val His Leu Asn Glu Ser Val Glu Ile Val Cys Thr
275 280 285

Arg Pro Asn Asn Asn Thr Arg Lys Ser Ile Arg Ile Gly Pro Gly Gln
290 295 300

Thr Phe Tyr Ala Thr Gly Asp Ile Ile Gly Asp Ile Arg Gln Ala His
305 310 315 320

Cys Asn Ile Ser Glu Glu Lys Trp Asn Lys Thr Leu Gln Arg Val Ser
325 330 335

Glu Lys Leu Lys Glu His Phe Pro Asn Lys Thr Ile Lys Phe Ala Pro
340 345 350

Ser Ser Gly Gly Arg Leu Glu Ile Thr Thr His Ser Phe Asn Cys Arg
355 360 365

Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser Lys Leu Phe Asn Ser Thr Tyr
370 375 380

Met Pro Asn Ser Thr Asn Asn Thr Asn Thr Thr Ile Thr Leu Pro Cys
385 390 395 400

Arg Ile Lys Gln Ile Ile Asn Met Trp Gln Glu Val Gly Arg Ala Met
405 410 415

ES 2 589 013 T3

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

ES 2 589 013 T3

660

665

670

Gly Gly Leu Ile Gly Leu Arg Ile Ile Phe Ala Val Leu Ser Ile
675 680 685

5

<210> 19
<211> 696
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Secuencia de proteína de envoltura consenso de subtipo D
<400> 19

ES 2 589 013 T3

Arg Val Arg Gly Ile Lys Arg Asn Tyr Gln His Leu Trp Lys Trp Gly
 1 5 10 15

Thr Met Leu Leu Gly Met Leu Met Thr Cys Ser Val Ala Glu Asn Leu
 20 25 30

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

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

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

Glu Ile Glu Leu Glu Asn Val Thr Glu Asn Phe Asn Met Trp Lys Asn
 85 90 95

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

Ser Leu Lys Pro Cys Val Lys Leu Thr Pro Leu Cys Val Thr Leu Asn
 115 120 125

Cys Thr Asp Gly Met Arg Asn Asp Thr Asn Asp Thr Asn Val Thr Met
 130 135 140

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

Arg Asp Lys Lys Lys Gln Val His Ala Leu Phe Tyr Lys Leu Asp Val
 165 170 175

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

ES 2 589 013 T3

Asn Cys Asn Thr Ser Ala Ile Thr Gln Ala Cys Pro Lys Val Thr Phe
 195 200 205
 Glu Pro Ile Pro Ile His Tyr Cys Ala Pro Ala Gly Phe Ala Ile Leu
 210 215 220
 Lys Cys Lys Asp Lys Lys Phe Asn Gly Thr Gly Pro Cys Lys Asn Val
 225 230 235 240
 Ser Thr Val Gln Cys Thr His Gly Ile Arg Pro Val Val Ser Thr Gln
 245 250 255
 Leu Leu Leu Asn Gly Ser Leu Ala Glu Glu Glu Ile Ile Ile Arg Ser
 260 265 270
 Glu Asn Leu Thr Asn Asn Ala Lys Ile Ile Ile Val Gln Leu Asn Glu
 275 280 285
 Ser Val Thr Ile Asn Cys Thr Arg Pro Tyr Asn Asn Thr Arg Lys Arg
 290 295 300
 Ile Pro Ile Gly Leu Gly Gln Ala Phe Tyr Thr Thr Arg Gly Ile Ile
 305 310 315 320
 Gly Asp Ile Arg Gln Ala His Cys Asn Ile Ser Gly Ala Glu Trp Asn
 325 330 335
 Lys Thr Leu Gln Gln Val Ala Lys Lys Leu Gly Asp Leu Leu Asn Lys
 340 345 350
 Thr Thr Ile Ile Phe Lys Pro Ser Ser Gly Gly Arg Pro Arg Ile Thr
 355 360 365
 Thr His Ser Phe Asn Cys Gly Gly Glu Phe Phe Tyr Cys Asn Thr Ser
 370 375 380
 Arg Leu Phe Asn Ser Thr Trp Ser Lys Asn Ser Thr Ser Asn Ser Thr
 385 390 395 400
 Lys Glu Asn Asn Thr Ile Thr Leu Pro Cys Arg Ile Lys Gln Ile Ile
 405 410 415
 Asn Met Trp Gln Gly Val Gly Lys Ala Met Tyr Ala Pro Pro Ile Glu
 420 425 430
 Gly Leu Ile Lys Cys Ser Ser Asn Ile Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg

ES 2 589 013 T3

	435					440					445				
Asp	Gly	Gly	Ala	Asn	Asn	Ser	His	Asn	Glu	Thr	Phe	Arg	Pro	Gly	Gly
	450					455					460				
Gly	Asp	Met	Arg	Asp	Asn	Trp	Arg	Ser	Glu	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Val
465					470					475					480
Val	Lys	Ile	Glu	Pro	Leu	Gly	Val	Ala	Pro	Thr	Arg	Ala	Lys	Arg	Arg
				485					490						495
Val	Val	Glu	Arg	Glu	Lys	Arg	Ala	Ile	Gly	Leu	Gly	Ala	Met	Phe	Leu
			500					505					510		
Gly	Phe	Leu	Gly	Ala	Ala	Gly	Ser	Thr	Met	Gly	Ala	Ala	Ser	Leu	Thr
		515					520					525			
Leu	Thr	Val	Gln	Ala	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Ile	Val	Gln	Gln	Gln
	530					535					540				
Asn	Asn	Leu	Leu	Arg	Ala	Ile	Glu	Ala	Gln	Gln	His	Leu	Leu	Gln	Leu
545					550					555					560
Thr	Val	Trp	Gly	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Val	Glu
				565					570					575	
Arg	Tyr	Leu	Lys	Asp	Gln	Gln	Leu	Leu	Gly	Ile	Trp	Gly	Cys	Ser	Gly
			580					585					590		
Lys	His	Ile	Cys	Thr	Thr	Thr	Val	Pro	Trp	Asn	Ser	Ser	Trp	Ser	Asn
		595					600					605			
Lys	Ser	Leu	Asp	Glu	Ile	Trp	Asn	Asn	Met	Thr	Trp	Met	Glu	Trp	Glu
	610					615						620			
Arg	Glu	Ile	Asp	Asn	Tyr	Thr	Gly	Leu	Ile	Tyr	Ser	Leu	Ile	Glu	Glu
625					630					635					640
Ser	Gln	Thr	Gln	Gln	Glu	Lys	Asn	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Glu	Leu	Asp
				645					650						655
Lys	Trp	Ala	Ser	Leu	Trp	Asn	Trp	Phe	Ser	Ile	Thr	Gln	Trp	Leu	Trp
			660					665					670		
Tyr	Ile	Lys	Ile	Phe	Ile	Met	Ile	Val	Gly	Gly	Leu	Ile	Gly	Leu	Arg
		675					680					685			

ES 2 589 013 T3

Ile Val Phe Ala Val Leu Ser Leu
690 695

5 <210> 20
<211> 323
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia de proteína Nef-Rev consenso de subtipo B

<400> 20

ES 2 589 013 T3

Ser Lys Arg Ser Val Val Gly Trp Pro Thr Val Arg Glu Arg Met Arg
1 5 10 15

Arg Ala Glu Pro Ala Ala Asp Gly Val Gly Ala Val Ser Arg Asp Leu
20 25 30

Glu Lys His Gly Ala Ile Thr Ser Ser Asn Thr Ala Ala Asn Asn Ala
35 40 45

Asp Cys Ala Trp Leu Glu Ala Gln Glu Glu Glu Glu Val Gly Phe Pro
50 55 60

Val Arg Ala Gln Val Ala Leu Arg Ala Met Thr Tyr Lys Ala Ala Val
65 70 75 80

Asp Leu Ser His Phe Leu Lys Glu Lys Gly Gly Leu Glu Gly Leu Ile
85 90 95

Tyr Ser Gln Lys Arg Gln Asp Ile Leu Asp Leu Trp Val Tyr His Thr
100 105 110

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

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

Pro Glu Lys Val Glu Glu Ala Asn Glu Gly Glu Asn Asn Ser Ala Ala
145 150 155 160

His Pro Met Ser Leu His Gly Met Asp Asp Pro Glu Arg Glu Val Leu
165 170 175

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

Leu His Pro Glu Tyr Tyr Lys Asp Cys Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser

ES 2 589 013 T3

195	200	205																			
Ala	Gly	Arg	Ser	Gly	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Leu	Leu	Lys	Thr	Val	Arg						
210						215						220									
Leu	Ile	Lys	Phe	Leu	Tyr	Gln	Ser	Asn	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly						
225						230						235									
Thr	Arg	Gln	Ala	Arg	Arg	Asn	Arg	Arg	Arg	Arg	Trp	Arg	Glu	Arg	Gln						
			245						250						255						
Arg	Gln	Ile	Arg	Ser	Ile	Ser	Glu	Trp	Ile	Leu	Ser	Thr	Tyr	Leu	Gly						
			260						265						270						
Arg	Pro	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Leu	Gln	Leu	Pro	Pro	Leu	Glu	Arg	Leu						
			275						280						285						
Thr	Leu	Asp	Cys	Asn	Glu	Asp	Cys	Gly	Thr	Ser	Gly	Thr	Gln	Gly	Val						
290						295						300									
Gly	Ser	Pro	Gln	Ile	Leu	Val	Glu	Ser	Pro	Ala	Val	Leu	Glu	Ser	Gly						
305						310						315									
Thr Lys Glu																					

5 <210> 21
 <211> 506
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Secuencia de proteína consenso Gag de subtipo A, B, C y D

<400> 21

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

ES 2 589 013 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Arg Ala Leu

ES 2 589 013 T3

				325						330						335
Gly	Pro	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Met	Met	Thr	Ala	Cys	Gln	Gly	Val	
			340					345					350			
Gly	Gly	Pro	Gly	His	Lys	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Met	Ser	Gln	
		355					360					365				
Ala	Thr	Asn	Ser	Asn	Ile	Met	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Gly	Pro	
	370					375					380					
Arg	Arg	Ile	Val	Lys	Cys	Phe	Asn	Cys	Gly	Lys	Glu	Gly	His	Ile	Ala	
385					390					395					400	
Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Lys	Cys	Gly	Lys	
				405					410					415		
Glu	Gly	His	Gln	Met	Lys	Asp	Cys	Thr	Glu	Arg	Gln	Ala	Asn	Phe	Leu	
			420					425					430			
Gly	Lys	Ile	Trp	Pro	Ser	His	Lys	Gly	Arg	Pro	Gly	Asn	Phe	Leu	Gln	
		435					440					445				
Ser	Arg	Pro	Glu	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Ala	Glu	Ser	Phe	Gly	Phe	Gly	
	450					455					460					
Glu	Glu	Ile	Thr	Pro	Ser	Pro	Lys	Gln	Glu	Pro	Lys	Asp	Arg	Glu	Leu	
465					470					475					480	
Tyr	Pro	Leu	Ala	Ser	Leu	Lys	Ser	Leu	Phe	Gly	Asn	Asp	Pro	Leu	Ser	
				485					490					495		
Gln	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala							
			500					505								

<210> 22
 <211> 818
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de ADN de E6-E7 de genotipo 16 de HPV

10

<400> 22

ES 2 589 013 T3

```

gaattcgcca ccattggactg gacctggatc ctgttcctgg tggccgccc caccggtg      60
cacagcttcc aggacccccca ggagagcggc agaaagctgc ctacagctgtg taccgagctg    120
cagaccacca tccacgacat catcctggag tgtgtgtact gtaagcagca gctgctgagg    180
agagaggtgt acgaccggga cctgtgtatc gtgtacaggg acggcaatcc ctacgccgtg    240
tgtgacaagt gcctgaagtt ctacagcaag atcagcaggt accggcacta ctgctacagc    300
ctgtacggca ccaccctgga gcagcagtac aacaagcccc tgtgtgacct gctgatccgg    360
tgtatcaact gccagaagcc cctgcagaga cacctggaca agaagcagcg gttccacaac    420
atcaggggca gatggaccgg cagatgtatg agctgctgcc ggagcagcag aaccagaagg    480
gagaccacgc tgagaggccg gaagagaaga agccacggcg atacccccac cctgcacgag    540
tacatgctgg acctgcagcc tgagaccacc gatctgtacg gctacggcca gctgaatgac    600
agcagcgagg aggaggatga gatcgacggc cctgccggcc aggccgagcc cgacagagcc    660
cactacaaca tegtgacctt ttgctgtaag tgtgacagca ccctgagact gtgcgtgcag    720
agcaccacag tggacatcag aaccctggag gatctgctga tgggcaccct gggcatcgtg    780
tgtccatct gctcccagaa accctgatga gcggccgc                                818

```

<210> 23
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia de proteína de E6-E7 de genotipo 16 de HPV

10

<400> 23

ES 2 589 013 T3

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

His Ser Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu
 20 25 30

Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 35 40 45

Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu
 50 55 60

Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys
 65 70 75 80

Leu Lys Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser
 85 90 95

Leu Tyr Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp
 100 105 110

Leu Leu Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu
 115 120 125

ES 2 589 013 T3

Asp Lys Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg
 130 135 140

Cys Met Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 145 150 155 160

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
 165 170 175

Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly
 180 185 190

Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala
 195 200 205

Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
 210 215 220

Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val
 225 230 235 240

Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val
 245 250 255

Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro
 260

5 <210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Epítopo inmunodominante de E6 de HPV
 <400> 24

Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp
 1 5 10 15

15 <210> 25
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Epítopo inmunodominante de E7 de HPV
 <400> 25

Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys
 1 5 10 15

25

ES 2 589 013 T3

<210> 26
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia consenso de E6 de HPV

10

<400> 26

Phe Gln Asp Pro Gln Glu Ser Gly Arg Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr
 1 5 10 15

Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val Tyr Cys
 20 25 30

Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Arg Asp Leu Cys Ile
 35 40 45

Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Cys Asp Lys Cys Leu Lys
 50 55 60

Phe Tyr Ser Lys Ile Ser Glu Tyr Arg His Tyr Cys Tyr Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

Gly Thr Thr Leu Glu Gln Gln Tyr Asn Lys Pro Leu Cys Asp Leu Leu
 85 90 95

Ile Arg Cys Ile Asn Cys Gln Lys Pro Leu Gln Arg His Leu Asp Lys
 100 105 110

Lys Gln Arg Phe His Asn Ile Arg Gly Arg Trp Thr Gly Arg Cys Met
 115 120 125

Ser Cys Cys Arg Ser Ser Arg Thr Arg Arg Glu Thr Gln Leu
 130 135 140

<210> 27
 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Secuencia consenso de E7 de HPV

20

<400> 27

His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro
 1 5 10 15

Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Gly Tyr Gly Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu

ES 2 589 013 T3

20

25

30

Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg
35 40 45

Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu
50 55 60

Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp
65 70 75 80

Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys
85 90 95

Pro

- <210> 28
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia líder de IgE
- <400> 28

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

His Ser

- <210> 29
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de escisión proteolítica
- <400> 29

Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
1 5

- <210> 30
- <211> 1766
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Secuencia de ADN de E1-E2 consenso de genotipo 1a y 1b de HCV
- <400> 30

ES 2 589 013 T3

gaattcgcca ccatggactg gacctggatc ctgttcctgg tggccgctgc aacacgggtg 60
 cacagctacc aagtgaggaa tagcagcggc ctgtaccacg tgaccaacga ctgctccaac 120
 agcagcatcg tgtacgaggc cgccgacatg atcatgcaca cccccggctg tgtgccctgt 180
 gtgagagagg gcaacagctc cagatgctgg gtggccctga ccctaccgt ggcgcccaga 240
 gatggcagcc tgcccaccac caccctgagg agacacgtgg acctgcttgt gggcagcgc 300
 acctgtgta gcgccatgta tgtgggggat ctgtgtggca gcgtgtttct tgtgggccag 360
 ctgttcacct tcagccccag aaggcactgg accgtgcagg actgtaactg ctccatctac 420
 cccggccaca tcaccggcca cagaatggcc tgggacatga tgatgaactg gagccctacc 480
 accgccctgg tgggtgccca gctgctgaga atccctcagg ccatcgtgga catggtggcc 540
 ggagcccact ggggcgtgct ggccggcatc gcctacttca gcatggtggg caactgggcc 600
 aaggtgctcg tgggtgctgct gctgttogcc ggcgtggacg gcagaggcag gaagagaagg 660
 agcgagacc acgtgaccgg cggcacccgc ggcagaacca cagccggcct tgtgggcctg 720
 ttcaccctcg gcgccaagca gaacatccag ctgatcaaca ccaacggcag ctggcacatc 780
 aacagcaccg ccctgaactg taacgacagc ctgaacaccg gctggctggc cggcctgttc 840
 taccagcaca agttcaacag cagcggctgc cccgagagaa tggccagctg tagaccctg 900
 gatgagttcg ccagggctg gggcccacac acctacgcca atggcagcgg ccctgaccag 960
 agaccctact gctggcacta cggccccaga ccctgtggca tcgtgcccgc caagagcgtg 1020
 tgtggccccg tgtactgctt caccctagc cccgtggttg tggcaccac cgacagaagc 1080
 ggagccccca cctacagctg gggcgagAAC gagaccgacg tgctggtgct gaacaacacc 1140
 agaccccccc tgggcaattg gttcggctgt acctggatga acagcaccgg cttcaccaaa 1200
 gtgtgtggcg ccctccctg tgtgatcggc ggagtgggca acaacacct gacctgcccc 1260
 accgactgct tcagaaagca ccccgaggcc acctactcca gatgtggcag cggaccttgg 1320
 ctgacccccca gatgtatggt ggactacccc tacaggctgt ggcactaccc ctgtaccgtg 1380
 aacttcacca tcttcaaagt gaggatgtat gtggggggcg tggagcacag actggaggcc 1440
 gcctgtaatt ggaccagggg cgagagatgt gacctggagg accgggatag aagcgagctg 1500
 tcccctctgc tgctgtccac caccgagtgg caggtgctgc cttgtagctt caccaccctg 1560
 cccgccctga gcaccggcct gatccacctg caccagaaca tcgtggacgt gcagtacctg 1620
 tacggagtgg gctctagcat cgtgtcctgg gccatcaagt gggagtacgt ggtgctgctg 1680
 ttctgctgc tggccgaogc cagagtgtgt agctgcctgt ggatgatgct gctgatcagc 1740
 caggccgagg cctgatgagc ggccgc 1766

<210>31
 <211> 580
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 589 013 T3

<220>

<223> Secuencia de proteína de E1-E2 consenso de genotipo 1a y 1b de HCV

5

<400> 31

```

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

His Ser Tyr Gln Val Arg Asn Ser Ser Gly Leu Tyr His Val Thr Asn
20           25           30

Asp Cys Ser Asn Ser Ser Ile Val Tyr Glu Ala Ala Asp Met Ile Met
35           40           45

His Thr Pro Gly Cys Val Pro Cys Val Arg Glu Gly Asn Ser Ser Arg
50           55           60

Cys Trp Val Ala Leu Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg Asp Gly Ser Leu
65           70           75

Pro Thr Thr Thr Leu Arg Arg His Val Asp Leu Leu Val Gly Ser Ala
85           90           95

Thr Leu Cys Ser Ala Met Tyr Val Gly Asp Leu Cys Gly Ser Val Phe
100          105          110

Leu Val Gly Gln Leu Phe Thr Phe Ser Pro Arg Arg His Trp Thr Val
115          120          125

Gln Asp Cys Asn Cys Ser Ile Tyr Pro Gly His Ile Thr Gly His Arg
130          135          140

Met Ala Trp Asp Met Met Met Asn Trp Ser Pro Thr Thr Ala Leu Val
145          150          155          160

Val Ser Gln Leu Leu Arg Ile Pro Gln Ala Ile Val Asp Met Val Ala
165          170          175

Gly Ala His Trp Gly Val Leu Ala Gly Ile Ala Tyr Phe Ser Met Val
180          185          190

Gly Asn Trp Ala Lys Val Leu Val Val Leu Leu Leu Phe Ala Gly Val
195          200          205

Asp Gly Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Glu Thr His Val Thr Gly Gly
210          215          220

```

ES 2 589 013 T3

Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly
 225 230 235 240

Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile
 245 250 255

Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu
 260 265 270

Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu
 275 280 285

Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly
 290 295 300

Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys
 305 310 315 320

Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly Ile Val Pro Ala Lys Ser Val
 325 330 335

Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro Ser Pro Val Val Val Gly Thr
 340 345 350

Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr
 355 360 365

Asp Val Leu Val Leu Asn Asn Thr Arg Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe
 370 375 380

Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala
 385 390 395 400

Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro
 405 410 415

Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly
 420 425 430

Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg
 435 440 445

Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg
 450 455 460

Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp

ES 2 589 013 T3

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

<210> 33
 <211> 363
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia consenso de E2 de HCV

<400> 33

5

10

ES 2 589 013 T3

Glu Thr His Val Thr Gly Gly Thr Ala Gly Arg Thr Thr Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Val Gly Leu Phe Thr Pro Gly Ala Lys Gln Asn Ile Gln Leu Ile Asn
 20 25 30

Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn Ser Thr Ala Leu Asn Cys Asn Asp
 35 40 45

Ser Leu Asn Thr Gly Trp Leu Ala Gly Leu Phe Tyr Gln His Lys Phe
 50 55 60

Asn Ser Ser Gly Cys Pro Glu Arg Met Ala Ser Cys Arg Pro Leu Asp
 65 70 75 80

Glu Phe Ala Gln Gly Trp Gly Pro Ile Thr Tyr Ala Asn Gly Ser Gly
 85 90 95

Pro Asp Gln Arg Pro Tyr Cys Trp His Tyr Ala Pro Arg Pro Cys Gly
 100 105 110

ES 2 589 013 T3

Ile Val Pro Ala Lys Ser Val Cys Gly Pro Val Tyr Cys Phe Thr Pro
 115 120 125

Ser Pro Val Val Val Gly Thr Thr Asp Arg Ser Gly Ala Pro Thr Tyr
 130 135 140

Ser Trp Gly Glu Asn Glu Thr Asp Val Leu Val Leu Asn Asn Thr Arg
 145 150 155 160

Pro Pro Leu Gly Asn Trp Phe Gly Cys Thr Trp Met Asn Ser Thr Gly
 165 170 175

Phe Thr Lys Val Cys Gly Ala Pro Pro Cys Val Ile Gly Gly Val Gly
 180 185 190

Asn Asn Thr Leu Thr Cys Pro Thr Asp Cys Phe Arg Lys His Pro Glu
 195 200 205

Ala Thr Tyr Ser Arg Cys Gly Ser Gly Pro Trp Leu Thr Pro Arg Cys
 210 215 220

Met Val Asp Tyr Pro Tyr Arg Leu Trp His Tyr Pro Cys Thr Val Asn
 225 230 235 240

Phe Thr Ile Phe Lys Val Arg Met Tyr Val Gly Gly Val Glu His Arg
 245 250 255

Leu Glu Ala Ala Cys Asn Trp Thr Arg Gly Glu Arg Cys Asp Leu Glu
 260 265 270

Asp Arg Asp Arg Ser Glu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Ser Thr Thr Glu
 275 280 285

Trp Gln Val Leu Pro Cys Ser Phe Thr Thr Leu Pro Ala Leu Ser Thr
 290 295 300

Gly Leu Ile His Leu His Gln Asn Ile Val Asp Val Gln Tyr Leu Tyr
 305 310 315 320

Gly Val Gly Ser Ser Ile Val Ser Trp Ala Ile Lys Trp Glu Tyr Val
 325 330 335

Val Leu Leu Phe Leu Leu Leu Ala Asp Ala Arg Val Cys Ser Cys Leu
 340 345 350

Trp Met Met Leu Leu Ile Ser Gln Ala Glu Ala
 355 360

ES 2 589 013 T3

<210> 34
 <211> 3512
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

```

    ggtaccgaat togccacat ggactggacc tggatcctgt tectggtggc cgctgccaca      60
    agagtgcaca gccccagggc ccccaggtgc agagccgtgc ggagcctgct gcgagaccac     120
    tacogggagg tgctgcccc tggcaccttc gtgocggaggc tgggcoctca ggggtggcgg     180
    ctggtgcaga gaggcgacc tgcgccttc agagccctgg tggcccagtg cctggtgtgc     240
    gtgocctggg acgccagacc tccccctgcc gccccctagct tccggcaggt gtccctgctg     300
    aaagaactgg tggcccgggt gctgcagcgg ctgtgcgaga ggggcgcaa gaacgtgctg     360
    gccttcggtc togccctgct ggacggcgcc agaggcggcc ctcccagggc cttaaccacc     420
    tccgtgagaa gctacctgcc caacaccgtg accgacgcc tgagaggcag cggcgcttgg     480
    ggctgctgc tgogcagagt gggcgacgac gtgctggtgc acctgctggc cagatgogcc     540
    ctgttcgtgc tggtcgccc cagctgcgcc taccaggtgt gcggcccacc cctgtaccag     600
    ctgggagccg ccaccagggc cagaccccct cctcacgcct ccggccccag gcgagactg     660
    ggctgcgagc gggcctggaa ccacagcgtg cgggaggccg gcgtgcccct gggcctgcca     720
    gccctggcg ccagaagaag gggcggcagc gccagcagaa gcctgcccct gcccaagcgg     780
    cccagacgcg gagccgccc tgagcccagc agaacccccg tgggcccagg ctcttgggccc     840
    caccctggcc ggaccagagg ccccagcagc cggggcttct gcgtggtgtc ccccgccaga     900
    cccgcccagg aagccacctc cctggaaggc gccctgagcg gcaccaggca cagccacccc     960
    agcgtgggcc gccagcacca cgcggaccc cccagcacct ccaggcccc caggccctgg    1020
    gacacccctt gccccctgt gtacgcccag accaagcact tectgtacag cagcggcgac    1080
    aaagagcagc tggggcccag ctctctgctg tocagcctga ggcctccct gaccggcgct    1140
    aggcgcctgg tggagacat cttctgggc agccggccct ggatgcccgg cacccccagg    1200
    cggctgcca ggctgcccc goggtactgg cagatgaggc ctctgttctt ggaactgctg    1260
    ggcaaccacg cccagtgcc ctacggcgtg ctgctgaaaa cccactgccc cctgagagcc    1320
    gccgtgacc cagccgccc agtgtgcgcc agagagaagc ctcaggcag cgtggccgct    1380
    cccgaggaag aggacaccga ccccagacgc ctggtgcagc tgctgcggca gcacagcagc    1440
    ccttggcagg tgtacggctt cgtgcgggccc tgccctgagaa ggctggtgcc ccttggcctg    1500
    tgggagcagc ggcacaacga gcggcggttt ctgocggaaca ccaagaagtt catcagcctg    1560
    ggaagcacg ccaagctgtc cctgcaggaa ctgacctgga agatgagcgt gcggggctgc    1620
    gcctggctga gaagatcccc tggcgtgggc tgogtgctg ccgcccagca ccggctgcgg    1680
    
```

ES 2 589 013 T3

gaggaaatcc tggccaagtt cctgcactgg ctgatgagcg tgtacgtggt ggagctgctg 1740
agatccttct tctacgtgac cgagaccacc ttccagaaga actacctgtt cttctaccgg 1800
aagagcgtgt ggagcaagct gcagagcatc ggcacccggc agcacctgaa gcgggtgcag 1860
ctgagagagc tgtccgaggg cgaagtgagg cagcaccggg aggccagacc tgccctgctg 1920
accagccggc tgcggttcat ccccaagccc gacggcctgc ggcccatcgt gaacatggac 1980
tacgtggtgg gcgccaggac cttccggcgg gagaagcggg ccgagcggct gacctcgagg 2040
gtgaaggccc tgttcagcgt gctgaactac gagcgggcca ggcgccagg cctgctgggc 2100
gccagcgtgc tgggcctgga cgacatccac cgggcctggc ggacctcgt gctgagagtg 2160
cgggcccagg acccccctcc cgagctgtac ttcgtgaagg tggacgtgac aggcgcctac 2220
gacaccatcc cccaggaccg gctgaccgag gtgatcgcca gcatcatcaa gcccagaac 2280
acctactgcg tgcggagata cgcctggtg cagaaggccg cccacggcca cgtgcggaag 2340
gccttcaaga gccacgtgag caccctgacc gacctgcagc cctacatgcg gcagttcgtg 2400
gcccacctgc aggaaaccag cccctgcgg gatgcccgtg tgatcgagca gacgacgac 2460
ctgaacgagg ccagcagcgg cctgttcgac gtgttcctga gattcatgtg ccaccacgcc 2520
gtgcggatcc ggggcaagag ctacgtgcag tgccagggca tcccacaggg cagcatcctg 2580
tccaccctgc tgtgctccct gtgctacggc gacatggaaa acaagctgtt cgccggcatc 2640
aggcgggacg gactgctgct gagactggtg gacgacttcc tgctggtgac cccccacctg 2700
accacgcca agaccttct gcggaccctg gtgcgcggcg tgcccagta cggtgcgtg 2760
gtgaacctga gaaagaccgt ggtgaactc cccgtggagg acgaggccct gggcggcaca 2820
gccttcgtgc agatgcctgc ccatggactg ttccttggc ggggctgct gctggacacc 2880
cggaccctgg aagtgcagag cgactacagc agctacgcc ggaccagcat ccgggcctcc 2940
ctgaccttca acaggggctt caaggccggc aggaacatgc ggcggaagct gtttggcgtg 3000
ctgcggtga agtgccacag cctgtttctg tacctgcagg tgaacagcct gcagaccgtg 3060
tgcaccaaca totacaagat cctgctgctg caggcctacc ggttccacgc ctgctgctg 3120
cagctgccct ttcaccagca ggtgtggaag aaccctacct tcttcctgcg ggtgatcagc 3180
gacaccgcca gcctgtgcta cagcatcctg aaggccaaga acgcccggcat gacccctggc 3240
gccaaaggag ccgcccggacc tctgccagc gaggcctgc agtggtctg ccaccaggcc 3300
tttctgctga agctgaccgg gcaccgggtg acctacgtgc cctgctggg cagcctgccc 3360
accgccaga cccagctgtc ccggaagctg cctggcacca cctgacagc cctggaagcc 3420
gccgccaacc ccgcccctgc ctccgacttc aagaccatcc tggactacc ctacgacgtg 3480
cccgactacg cctgatgagc ggccgcgagc tc 3512

<210> 35
<211> 1158
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 589 013 T3

<400> 35

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

His Ser Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg
 20 25 30

Ser His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu
 35 40 45

Gly Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe
 50 55 60

Arg Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg
 65 70 75 80

Pro Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu
 85 90 95

Leu Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn
 100 105 110

Val Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro
 115 120 125

Pro Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val
 130 135 140

Thr Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg
 145 150 155 160

Val Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe
 165 170 175

Val Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu
 180 185 190

Tyr Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser
 195 200 205

Gly Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val
 210 215 220

ES 2 589 013 T3

Arg Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg
 225 230 235 240

Arg Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg
 245 250 255

Arg Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser
 260 265 270

Trp Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys
 275 280 285

Val Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly
 290 295 300

Ala Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His
 305 310 315 320

His Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr
 325 330 335

Pro Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser
 340 345 350

Gly Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg
 355 360 365

Pro Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly
 370 375 380

Ser Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro
 385 390 395 400

Gln Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn
 405 410 415

His Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu
 420 425 430

Arg Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro
 435 440 445

Gln Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg
 450 455 460

Leu Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly
 465 470 475 480

ES 2 589 013 T3

Phe Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly
 485 490 495
 Ser Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile
 500 505 510
 Ser Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys
 515 520 525
 Met Ser Val Arg Gly Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly
 530 535 540
 Cys Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys
 545 550 555 560
 Phe Leu His Trp Leu Met Ser Val Tyr Val Val Glu Leu Leu Arg Ser
 565 570 575
 Phe Phe Tyr Val Thr Glu Thr Thr Phe Gln Lys Asn Tyr Leu Phe Phe
 580 585 590
 Tyr Arg Lys Ser Val Trp Ser Lys Leu Gln Ser Ile Gly Ile Arg Gln
 595 600 605
 His Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg
 610 615 620
 Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 625 630 635 640
 Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val
 645 650 655
 Val Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr
 660 665 670
 Ser Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg
 675 680 685
 Arg Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His
 690 695 700
 Arg Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro
 705 710 715 720
 Pro Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr

ES 2 589 013 T3

Phe Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe
 980 985 990

Gly Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Tyr Leu Gln V
 995 1000 1005

Asn Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu
 1010 1015 1020

Leu Gln Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe
 1025 1030 1035

His Gln Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile
 1040 1045 1050

Ser Asp Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn
 1055 1060 1065

Ala Gly Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro
 1070 1075 1080

Ser Glu Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys
 1085 1090 1095

Leu Thr Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu
 1100 1105 1110

Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr
 1115 1120 1125

Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp
 1130 1135 1140

Phe Lys Thr Ile Leu Asp Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1145 1150 1155

<210> 36
 <211> 1707
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Secuencia consenso de HA de gripe H5N1

10

<400> 36

ES 2 589 013 T3

atggaaaaga tcgtgctgct gttcgccatc gtgagcctgg tgaagagcga ccagatctgc 60
atcggctacc acgccaacaa cagcaccgag caggtggaca ccatcatgga aaaaaactg 120
accgtgaccc acgcccagga catcctggaa aagaccaca acggcaagct gtgcgacctg 180
gacggcgtga agcccctgat cctgcgggac tgcagcgtgg cggctggct gctgggcaac 240
cccatgtgcg acgagttcat caactgccc gagtggagct acatcgtgga gaaggccaac 300
cccgtgaacg acctgtgcta cccggcgac ttcaacgact acgaggaact gaagcacctg 360
ctgtcccgga tcaaccactt cgagaagatc cagatcatcc ccaagagcag ctggtccagc 420
cacgaggcca gcctgggctg gagcagcgcc tgccatacc agggcaagtc cagcttcttc 480
cggaactggt tgtggctgat caagaagaac agcacctacc ccaccatcaa gcggagctac 540
aacaacacca accaggaaga tctgctggtc ctgtggggca tccaccacc caacgacgcc 600
gccgagcaga ccaagctgta ccagaacccc accacctaca tcagcgtggg caccagcacc 660
ctgaaccagc ggctggtgcc ccgatcgcc acccggcca aggtgaacgg ccagagcggc 720
cggatggaat tcttctggac catcctgaag cccaacgatg ccatcaactt cgagagcaac 780
ggcaacttca tcgccccga gtacgcctac aagatcgtga agaagggcga cagcaccatc 840
atgaagagcg agctggaata cggcaactgc aacaccaagt gccagacccc catggggcgc 900
atcaacagca gcatgccctt ccacaacatc caccacctga ccatcggcga gtgccccaa 960
tacgtgaaga gcaacaggct ggtgctggcc accggcctgc ggaacagccc ccagcgggag 1020
cggcgggccc ccgcccggg cctgttcggc gccatcgccg gcttcatcga gggcggctgg 1080
cagggcatgg tggacgggtg gtacggctac caccacagca atgagcaggg cagcggctac 1140
gccgccgaca aagagagcac ccagaaggcc atcgacggcg tcaccaacaa ggtgaacagc 1200
atcatcgaca agatgaacac ccagttcgag gccgtgggccc gggagttcaa caacctggaa 1260
cggcggatcg agaacctgaa caagaaaatg gaagatggct tcctggacgt gtggacctac 1320
aacgccgagc tgctggtgct gatggaaaac gagcggaccc tggacttcca cgacagcaac 1380
gtgaagaacc tgtacgaca agtgcgctg cagctgcggg acaacgcaa agagctgggc 1440
aacggctgct tcgagttcta ccacaagtgc gacaacgagt gcatggaaag cgtgcggaac 1500
ggcacctacg actaccccc gtacagcgag gaagcccggc tgaagcggga ggaaatcagc 1560
ggcgtgaaac tggaaagcat cggcatctac cagatcctga gcatctacag caccgtggcc 1620
agcagcctgg ccctggccat catggtggcc ggccagacc tgtggatgtg cagcaacggc 1680
agcctgcagt gccgatctg catctag 1707

<210> 37
<211> 568
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia consenso de HA de gripe H5N1

<400> 37

ES 2 589 013 T3

Met Glu Lys Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val Ser Leu Val Lys Ser
 1 5 10 15

Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn Ser Thr Glu Gln Val
 20 25 30

Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr His Ala Gln Asp Ile
 35 40 45

Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Asp Leu Asp Gly Val Lys
 50 55 60

Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly Trp Leu Leu Gly Asn
 65 70 75 80

Pro Met Cys Asp Glu Phe Ile Asn Val Pro Glu Trp Ser Tyr Ile Val
 85 90 95

Glu Lys Ala Asn Pro Val Asn Asp Leu Cys Tyr Pro Gly Asp Phe Asn
 100 105 110

Asp Tyr Glu Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Arg Ile Asn His Phe Glu
 115 120 125

Lys Ile Gln Ile Ile Pro Lys Ser Ser Trp Ser Ser His Glu Ala Ser
 130 135 140

Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Gln Gly Lys Ser Ser Phe Phe
 145 150 155 160

Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Ser Thr Tyr Pro Thr Ile
 165 170 175

Lys Arg Ser Tyr Asn Asn Thr Asn Gln Glu Asp Leu Leu Val Leu Trp
 180 185 190

Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln Thr Lys Leu Tyr Gln
 195 200 205

Asn Pro Thr Thr Tyr Ile Ser Val Gly Thr Ser Thr Leu Asn Gln Arg
 210 215 220

Leu Val Pro Arg Ile Ala Thr Arg Ser Lys Val Asn Gly Gln Ser Gly
 225 230 235 240

Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro Asn Asp Ala Ile Asn
 245 250 255

ES 2 589 013 T3

Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu Tyr Ala Tyr Lys Ile
 260 265 270
 Val Lys Lys Gly Asp Ser Thr Ile Met Lys Ser Glu Leu Glu Tyr Gly
 275 280 285
 Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Met Gly Ala Ile Asn Ser Ser
 290 295 300
 Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile Gly Glu Cys Pro Lys
 305 310 315 320
 Tyr Val Lys Ser Asn Arg Leu Val Leu Ala Thr Gly Leu Arg Asn Ser
 325 330 335
 Pro Gln Arg Glu Arg Arg Ala Ala Ala Arg Gly Leu Phe Gly Ala Ile
 340 345 350
 Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp Gly Trp Tyr
 355 360 365
 Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Asp Lys
 370 375 380
 Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Val Thr Asn Lys Val Asn Ser
 385 390 395 400
 Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly Arg Glu Phe
 405 410 415
 Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Lys Met Glu Asp
 420 425 430
 Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu Val Leu Met
 435 440 445
 Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ser Asn Val Lys Asn Leu
 450 455 460
 Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Arg Asp Asn Ala Lys Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu Cys Met Glu
 485 490 495
 Ser Val Arg Asn Gly Thr Tyr Asp Tyr Pro Gln Tyr Ser Glu Glu Ala
 500 505 510

ES 2 589 013 T3

Arg Leu Lys Arg Glu Glu Ile Ser Gly Val Lys Leu Glu Ser Ile Gly
 515 520 525

Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser Ser Leu Ala
 530 535 540

Leu Ala Ile Met Val Ala Gly Leu Ser Leu Trp Met Cys Ser Asn Gly
 545 550 555 560

Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile
 565

<210> 38
 <211> 1466
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia consenso de NA de gripe H1N1 y H5N1

<400> 38

ggtagcgaat tcgccaccat ggactggacc tggatcctgt tcctggtggc cgctgccacc 60
 cgggtgcaca gcatgaaccc caaccagaag atcatcacca tcggcagcat ctgcatggtg 120
 atcggcatcg tgagcctgat gctgcagatc ggcaacatga tcagcatctg ggtgtcccac 180
 agcatccaga ccggcaacca gcaccaggcc gagcccatca gcaacaccaa ctttctgacc 240
 gagaaggcgg tggccagcgt gaccctggcc ggcaacagca gcctgtgcc catcagcggc 300
 tgggccgtgt acagcaagga caacagcatc cggatcggca gcaagggcga cgtgttcgtg 360
 atccgggagc cttcatcag ctgcagccac ctggaatgcc ggaccttctt cctgaccag 420
 ggggccctgc tgaacgaaa gcacagcaac ggcaccgtga aggacagaag ccctaccgg 480
 accctgatga gctgccccgt gggcgaggcc cccagcccct acaacagccg gttcgagagc 540
 gtggcctggt ccgccagcgc ctgccacgac ggcaccagct ggctgaccat cggcatcagc 600
 ggcctgaca acggcgccgt ggccgtgctg aagtacaacg gcatcatcac cgacaccatc 660
 aagagctggc ggaacaacat cctgcggacc caggaaagcg agtgcgcctg cgtgaacggc 720
 agctgcttca ccgtgatgac cgacggcccc agcaacggcc aggccagcta caagatcttc 780
 aagatgaaa agggcaaggt ggtgaagagc gtggagctgg acgcccccaa ctaccactac 840
 gaggaatgca gctgctaccc cgacgccggc gagatcacct gcgtgtgcc ggacaactgg 900
 cacggcagca accggccctg ggtgtccttc aaccagaacc tggaatacca gatcggctac 960
 atctgcagcg gcgtgttcgg cgacaacccc aggcccaacg atggcaccgg cagctgcggc 1020
 cctgtgagcg ccaacggcgc ctacggcgtg aagggttca gttcaagta cggcaacggc 1080

ES 2 589 013 T3

```
gtgtggatcg gccggaccaa gagcaccaac agcagatccg gcttcgagat gatctgggac 1140
cccaacggct ggaccgagac cgacagcagc ttcagcgtga agcaggacat cgtggccatc 1200
accgactggt ccggctacag cggcagcttc gtgcagcacc ccgagctgac cggcctggac 1260
tgcattccggc cctgcttttg ggtggagctg atcagaggca ggcccaaaga gagcaccatc 1320
tggaccagcg gcagcagcat cagcttttgc ggcgtgaaca gcgacaccgt gagctggtcc 1380
tggcccagcg gcgccgagct gcccttcacc atcgacaagt acccctacga cgtgcccgac 1440
tacgcctgat gagcggccgc gagctc 1466
```

```
5 <210> 39
  <211> 476
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <223> Secuencia consenso de NA de gripe H1N1 y H5N1

  <400> 39
```

ES 2 589 013 T3

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

His Ser Met Asn Pro Asn Gln Lys Ile Ile Thr Ile Gly Ser Ile Cys
 20 25 30

Met Val Ile Gly Ile Val Ser Leu Met Leu Gln Ile Gly Asn Met Ile
 35 40 45

Ser Ile Trp Val Ser His Ser Ile Gln Thr Gly Asn Gln His Gln Ala
 50 55 60

Glu Pro Ile Ser Asn Thr Asn Phe Leu Thr Glu Lys Ala Val Ala Ser
 65 70 75 80

Val Thr Leu Ala Gly Asn Ser Ser Leu Cys Pro Ile Ser Gly Trp Ala
 85 90 95

Val Tyr Ser Lys Asp Asn Ser Ile Arg Ile Gly Ser Lys Gly Asp Val
 100 105 110

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

Thr Phe Phe Leu Thr Gln Gly Ala Leu Leu Asn Asp Lys His Ser Asn
 130 135 140

Gly Thr Val Lys Asp Arg Ser Pro Tyr Arg Thr Leu Met Ser Cys Pro
 145 150 155 160

ES 2 589 013 T3

Val Gly Glu Ala Pro Ser Pro Tyr Asn Ser Arg Phe Glu Ser Val Ala
165 170 175

Trp Ser Ala Ser Ala Cys His Asp Gly Thr Ser Trp Leu Thr Ile Gly
180 185 190

Ile Ser Gly Pro Asp Asn Gly Ala Val Ala Val Leu Lys Tyr Asn Gly
195 200 205

Ile Ile Thr Asp Thr Ile Lys Ser Trp Arg Asn Asn Ile Leu Arg Thr
210 215 220

Gln Glu Ser Glu Cys Ala Cys Val Asn Gly Ser Cys Phe Thr Val Met
225 230 235 240

Thr Asp Gly Pro Ser Asn Gly Gln Ala Ser Tyr Lys Ile Phe Lys Met
245 250 255

Glu Lys Gly Lys Val Val Lys Ser Val Glu Leu Asp Ala Pro Asn Tyr
260 265 270

His Tyr Glu Glu Cys Ser Cys Tyr Pro Asp Ala Gly Glu Ile Thr Cys
275 280 285

Val Cys Arg Asp Asn Trp His Gly Ser Asn Arg Pro Trp Val Ser Phe
290 295 300

Asn Gln Asn Leu Glu Tyr Gln Ile Gly Tyr Ile Cys Ser Gly Val Phe
305 310 315 320

Gly Asp Asn Pro Arg Pro Asn Asp Gly Thr Gly Ser Cys Gly Pro Val
325 330 335

Ser Ala Asn Gly Ala Tyr Gly Val Lys Gly Phe Ser Phe Lys Tyr Gly
340 345 350

Asn Gly Val Trp Ile Gly Arg Thr Lys Ser Thr Asn Ser Arg Ser Gly
355 360 365

Phe Glu Met Ile Trp Asp Pro Asn Gly Trp Thr Glu Thr Asp Ser Ser
370 375 380

Phe Ser Val Lys Gln Asp Ile Val Ala Ile Thr Asp Trp Ser Gly Tyr
385 390 395 400

Ser Gly Ser Phe Val Gln His Pro Glu Leu Thr Gly Leu Asp Cys Ile

ES 2 589 013 T3

	405		410		415										
Arg	Pro	Cys	Phe	Trp	Val	Glu	Leu	Ile	Arg	Gly	Arg	Pro	Lys	Glu	Ser
			420					425					430		
Thr	Ile	Trp	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Ile	Ser	Phe	Cys	Gly	Val	Asn	Ser
		435					440					445			
Asp	Thr	Val	Ser	Trp	Ser	Trp	Pro	Asp	Gly	Ala	Glu	Leu	Pro	Phe	Thr
	450					455					460				
Ile	Asp	Lys	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Val	Pro	Asp	Tyr	Ala				
465					470					475					

5
 <210> 40
 <211> 875
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Secuencia consenso de M1 de gripe H1N1 y H5N1
 <400> 40

```

ggtaccggat cgcaccat ggactggacc tggattctgt tcctggtggc cgctgccacc      60
cgggtgcaca gcatgagcct gctgaccgag gtggagacct acgtgctgtc catcatcccc      120
agcggccctc tgaaggccga gatcgcccag cggctggaag atgtgttcgc cggcaagaac      180
accgacctgg aagccctgat ggaatggctg aaaaccggc ccatcctgag cccctgacc      240
aagggcatcc tgggcttctg gttcaccctg accgtgccca gcgagcgggg cctgcagcgg      300
cggagattcg tgcagaacgc cctgaacggc aacggcgacc ccaacaacat ggaccgggcc      360
gtgaagctgt acaagaagct gaagcgggag atcaccttcc acggcgccaa agaggtggcc      420
ctgagctaca gcacaggcgc cctggccagc tgcattggcc tgatctaaa ccggatgggc      480
accgtgacca ccgaggtggc cttcggcctg gtgtgcgcca cctgcgagca gatcgccgac      540
agccagcaca gatcccaccg gcagatggcc accaccacca acccctgat ccggcacgag      600
aaccggatgg tcctggcctc caccaccgcc aaggccatgg aacagatggc cggcagcagc      660
gagcaggccg ccgaagccat ggaagtggcc agccaggcca ggcagatggt gcaggccatg      720
cggaccatcg gcacccaccc cagcagcagc gccggactgc gggacgacct gctggaaaac      780
ctgcaggcct accagaaacg gatgggcgtg cagatgcagc ggttcaagta ccctacgac      840
gtgcccgact acgcctgatg agcggccgag agctc                                     875
    
```

15
 <210> 41
 <211> 279
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia consenso de M1 de gripe H1N1 y H5N1

5

<400>41

ES 2 589 013 T3

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

His Ser Met Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Tyr Val Leu Ser Ile
20 25 30

Ile Pro Ser Gly Pro Leu Lys Ala Glu Ile Ala Gln Arg Leu Glu Asp
35 40 45

Val Phe Ala Gly Lys Asn Thr Asp Leu Glu Ala Leu Met Glu Trp Leu
50 55 60

Lys Thr Arg Pro Ile Leu Ser Pro Leu Thr Lys Gly Ile Leu Gly Phe
65 70 75 80

Val Phe Thr Leu Thr Val Pro Ser Glu Arg Gly Leu Gln Arg Arg Arg
85 90 95

Phe Val Gln Asn Ala Leu Asn Gly Asn Gly Asp Pro Asn Asn Met Asp
100 105 110

Arg Ala Val Lys Leu Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Glu Ile Thr Phe His
115 120 125

Gly Ala Lys Glu Val Ala Leu Ser Tyr Ser Thr Gly Ala Leu Ala Ser
130 135 140

Cys Met Gly Leu Ile Tyr Asn Arg Met Gly Thr Val Thr Thr Glu Val
145 150 155 160

Ala Phe Gly Leu Val Cys Ala Thr Cys Glu Gln Ile Ala Asp Ser Gln
165 170 175

His Arg Ser His Arg Gln Met Ala Thr Thr Thr Asn Pro Leu Ile Arg
180 185 190

His Glu Asn Arg Met Val Leu Ala Ser Thr Thr Ala Lys Ala Met Glu
195 200 205

Gln Met Ala Gly Ser Ser Glu Gln Ala Ala Glu Ala Met Glu Val Ala
210 215 220

Ser Gln Ala Arg Gln Met Val Gln Ala Met Arg Thr Ile Gly Thr His

ES 2 589 013 T3

ggtaccgaat tgcaccat ggactggacc tggatcctgt tcttgggtgc tgccgccacc 60
 aggggtgcaca gcagcctgct gaccgaggtg gagacccccca cccggaacga gtggggctgc 120
 cgggtgcagcg acagcagcga ccggggcagg aagcggagaa gcgccagcca gggcaccaag 180
 cggagctacg agcagatgga aacaggcggc gagcggcaga acgccaccga gatccgggcc 240
 agcgtgggca gaatggtcgg cggcatcggc cggttctaca tccagatgtg caccgagctg 300
 aagctgtccg actacgaggg ccggctgatc cagaacagca tcaccatcga gcggatggtg 360
 ctgtccgcct tcgacgagcg gcggaacaga tacctggaag agcaccocag cgcgggcaag 420
 gaccccaaga aaaccggcgg acccatctac cggcggaggg acggcaagtg ggtgcgggag 480
 ctgatcctgt acgacaaaga ggaaatccgg cggatctggc ggcaggccaa caacggcgag 540
 gacgccacag ccggcctgac ccacctgatg atctggcaca gcaacctgaa cgacgccacc 600
 taccagogga caagggctct ggtccggacc ggcattggacc cccggatgtg cagcctgatg 660
 cagggcagca cactgcccag aagaagcggg gccgctggcg cagccgtgaa gggcgtgggc 720
 accatggtga tggaactgat ccggatgatc aagcggggca tcaacgaccg gaatttttgg 780
 aggggcgaga acggcaggcg gaccocggatc gcctacgagc ggatgtgcaa catcctgaag 840
 ggcaagtcc agacagccgc ccagcgggcc atgatggacc aggtccggga gagccggaac 900
 ccgggcaacg ccgagatcga ggacctgatc ttctggcca gaagcgcocct gatcctgcgg 960
 ggcagcgtgg ccacaagag ctgcctgcc gccctgctgt acggactggc cgtggccagc 1020
 ggctacgact tcgagcggga gggctacagc ctggtcggca tcgaccocct ccggctgctg 1080
 cagaactccc aggtgttcag cctgatccgg cccaacgaga accccgcca caagtcccag 1140
 ctggtctgga tggcctgcca cagcgcgcgc ttcgaggatc tgagagtgag cagcttcac 1200

 cggggcacca gagtggtgcc caggggccag ctgtccacca gggcgtgca gatcggcagc 1260
 aacgagaaca tggaagccat ggacagcaac accctggaac tgcggagccg gtactgggcc 1320
 atccggacca gaagcggcgg caacaaccaac cagcagcggg ccagcgcocg acagatcagc 1380
 gtgcagocca cttctccgt gcagcggaac ctgcccttcg agagggccac catcatggcc 1440
 gccttcaccg gcaacaccga gggccggacc agcagatgc ggaccgagat catcaggatg 1500
 atggaaagcg ccaggcccgga ggacgtgagc ttccagggca gggcgtggt cgagctgtcc 1560
 gatgagaagg ccaccaacc catcgtgcc agcttcgaca tgaacaacga gggcagctac 1620
 ttcttcggcg acaacccga ggaatacgac aactaccct acgacgtgcc cgactagcc 1680
 tgatgagcgg ccgcgagctc 1700

<210> 43
 <211> 554
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>

ES 2 589 013 T3

<223> Secuencia consenso de M2E-NP de gripe H5N1

<400> 43

```

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

His Ser Ser Leu Leu Thr Glu Val Glu Thr Pro Thr Arg Asn Glu Trp
 20           25           30

Gly Cys Arg Cys Ser Asp Ser Ser Asp Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser
 35           40           45

Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Gly Gly
 50           55           60

Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met Val
 65           70           75           80

Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys Leu
 85           90           95

Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu Arg
 100          105          110

Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Arg Tyr Leu Glu Glu
 115          120          125

His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile Tyr

```

5

ES 2 589 013 T3

Phe Glu Asp Leu Arg Val Ser Ser Phe Ile Arg Gly Thr Arg Val Val
 385 390 395 400

Pro Arg Gly Gln Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn Glu
 405 410 415

Asn Met Glu Ala Met Asp Ser Asn Thr Leu Glu Leu Arg Ser Arg Tyr
 420 425 430

Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg Ala
 435 440 445

Ser Ala Gly Gln Ile Ser Val Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg Asn
 450 455 460

Leu Pro Phe Glu Arg Ala Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn Thr
 465 470 475 480

Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met Glu
 485 490 495

Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe Glu
 500 505 510

Leu Ser Asp Glu Lys Ala Thr Asn Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp Met
 515 520 525

Asn Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr Asp
 530 535 540

Asn Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 545 550

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 35 y fragmentos de la SEQ ID NO: 35 que comprende 1140 o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 35, en la que dichos fragmentos son inmunógenos que potencian respuestas inmunitarias celulares contra hTERT.
2. La proteína de la reivindicación 1, en la que el fragmento de la SEQ ID NO: 35 no comprende la secuencia líder de IgE.
- 10 3. Una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de la reivindicación 1.
- 15 4. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, en la que la secuencia de nucleótidos se selecciona del grupo que consiste en: la SEQ ID NO: 34; fragmentos de la SEQ ID NO: 34 que comprenden 3420 o más nucleótidos de la SEQ ID NO: 34 y secuencias que tienen al menos un 95 % de similitud con la SEQ ID NO: 34.
5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3 o 4, que comprende una secuencia que tiene al menos un 98 % de similitud con la SEQ ID NO: 34.
- 20 6. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3 o 4, que comprende una secuencia que tiene al menos un 99 % de similitud con la SEQ ID NO: 34.
- 25 7. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en la que el fragmento de la SEQ ID NO: 34 no comprende una secuencia codificante para la secuencia líder de IgE.
8. La molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en la que dicha molécula es un plásmido.
- 30 9. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, o una proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
10. Una composición farmacéutica inyectable que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, o una proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
- 35 11. Una composición de la reivindicación 9 o 10, para su uso en un método de inducción de una respuesta inmunitaria terapéutica o profiláctica en un individuo contra hTERT.
- 40 12. Una vacuna recombinante que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, o una proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.
13. La vacuna recombinante de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 30 o la SEQ ID NO: 22.
- 45 14. Un patógeno atenuado vivo que comprende una molécula de ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8 o una proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2.

```

1 MDWTWILFLVAAAATRVHSRVKGRKNYQHLWRWGTM LGM L M I C S A A E K L W V T V Y Y G V P V W K E A T T T L F C A S D A K A Y D T E V H N V W A T H A C E Y 2 E 1 - B
1 MDWTWILFLVAAAATRVHS-----E-EKLVWTVVYGGVPPWKEATTTLFCASDAKAHHAEAHNVWA THAC EK2P-B

91 VPTDNPQEVVLENTENFNMWKNMNV EQMHED I I S L W D Q S L K P C V K L T P L C V T L N C T -----DLSGEKMEKGEIKNCSFN EY2E1-B
63 VPTDNPQEVVLENTENFNMWKNMNV DQMHED I I S L W D Q S L K P C V K L T P L C V T L N C T N A T Y T N S D S K N S T S N S S L E D S G K G D M N - C S F D E K 2 P - B

167 ITTSIRDVKQKEYALFYKLDVVPIDNDNTSYRLISQNTSVITQACP KVSFEPIIHYCAPAGFAILKCN DKKFN GTGPTCNVSTVQC THG EY2E1-B
152 VTTSIDKKKTEYAI FDKLDVMNIGNG--RYTLNQN TSVITQACP KMSFEPIIHYCTPAGYAILKCN DNKFN GTGPTCNVSTIQCTHG EK2P-B
V2 loop
257 IRPVVSTQLLLNGSLAEE-EVVRSENF T N N A K T I I V Q L N E S V E I N C T R P N N T R K S I H I G P G Q A F Y T T G E I I G D I R Q A H C N I S R A K W N N E Y 2 E 1 - B
240 IKPVVSTQLLLNGSLAEGGEV I I R S E N L T D N A K T I I V Q L K E P V E I N C T R P N N T R K S I H M G P G A A F Y A R G E V I G D I R Q A H C N I S R G R W N D E K 2 P - B
V3 loop
346 TLKQIVKLLREQFGNKTI VFNQSSGGRPRIVMHSFNCGGEFFYCN T T Q L F N S T W N V N G T W N N T E G ---N D T I T L P C R I K Q I I N M W Q E V G E Y 2 E 1 - B
330 TLKQIAKKLREQF-NK T I S L N Q S S G G D L E I V M H T F N C G G E F F Y C N T T Q L F N S T W N E N D T T W N T A G S N N N E T I T L P C R I K Q I I N R W Q E V G E K 2 P - B

433 KAMYAPP I R G Q I R C S S N I T G L L L T R D G G N N N T N E T E I F R P G G G D M R D N W R S E L Y K Y K V V K I E P L G V A P T K A K R R V V Q R E K R A V G I G A M F L E Y 2 E 1 - B
419 KAMYAPP I S G P I N C L S N I T G L L L T R D G G D N N - N T I E T F R P G G G D M R D N W R S E L Y K Y K V V R I E P L G I A P T K A K R R V V Q R E K R A V G I G A M F L E K 2 P - B
Cleavage site

523 GFLGAPGSTMGAASMTLTVQARQLL SGIVQQQNLLRAIEAQQHL L Q L T W G I K Q L Q A R V L A V E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I C T T T V P W E Y 2 E 1 - B
508 GFLGAAGSTMGAASVTLTVQARLLL SGIVQQQNLLRAIEAQQHL L Q L T W G I K Q L Q A R V L A M E R Y L K D Q Q L L G I W G C S G K L I C T T N V P W E K 2 P - B

613 NASWSNKS L D E I W D N M T W M E W E R E I D N Y T S L I Y T L I E E S Q N Q E K N E Q E L L E L D K W A S L W N W F D I T N W L W Y I K I F I M I V G G L I G L R I V F A E Y 2 E 1 - B
598 NASWSNKS L D K I W H N M T W M E W D R E I D N Y T K L I Y T L I E A S Q I Q E K N E Q E L L E L D S W A S L W S W F D I S K W L W Y I G V F I I V I G G L V G L K I V F A E K 2 P - B
.....

703 VLSIYPYDVPDYA EY2E1-B
688 VLSIVNRVRQVTRV EK2P-B
.....

```

FIG. 1

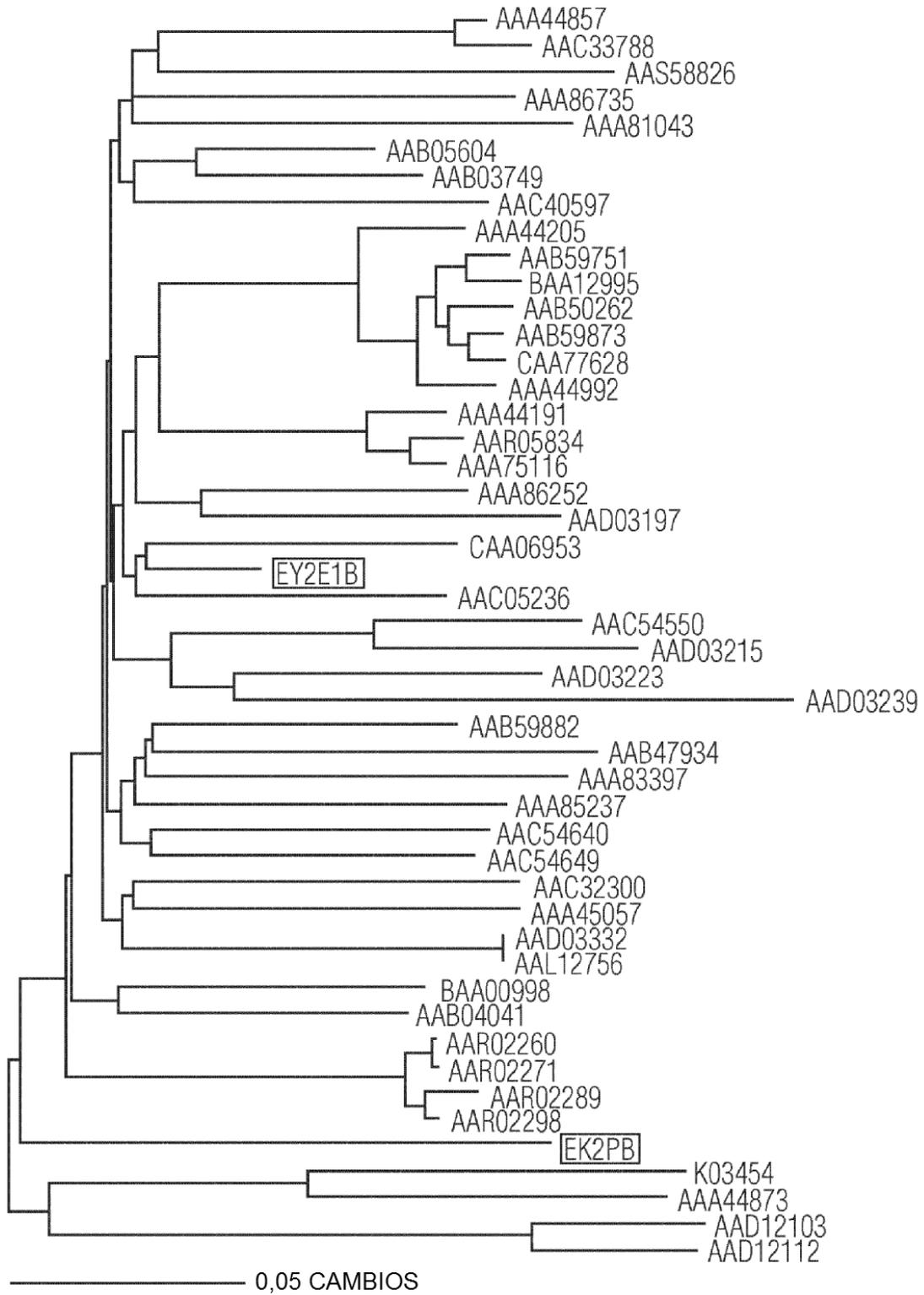


FIG. 2



FIG. 3A

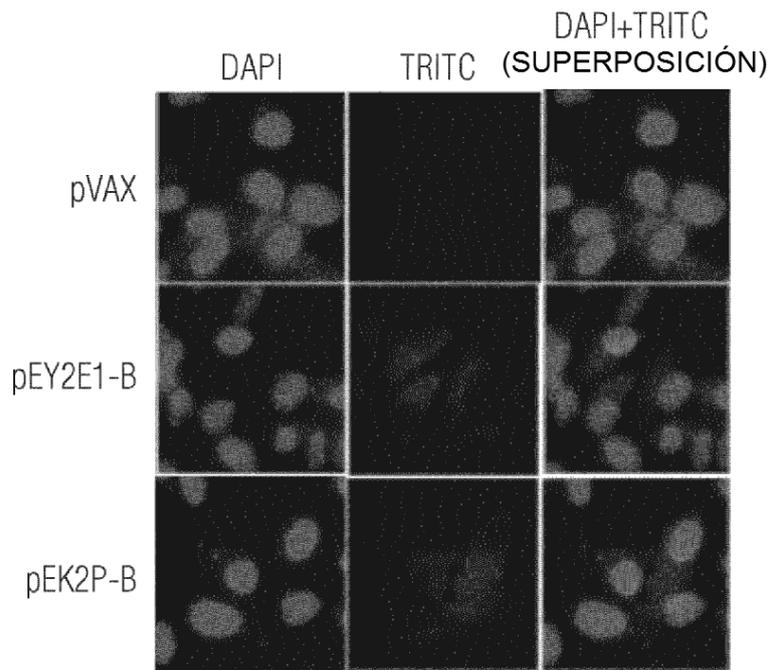


FIG. 3B

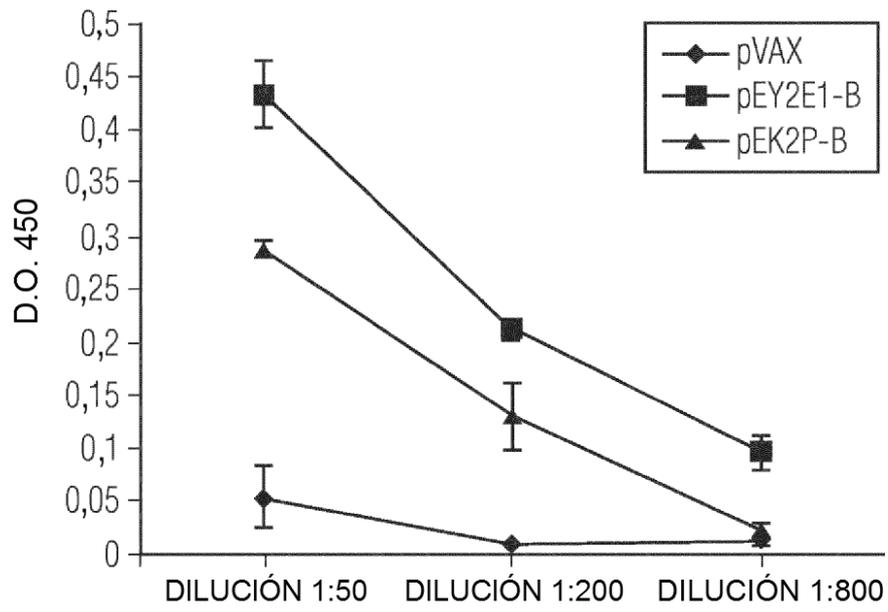


FIG. 4A

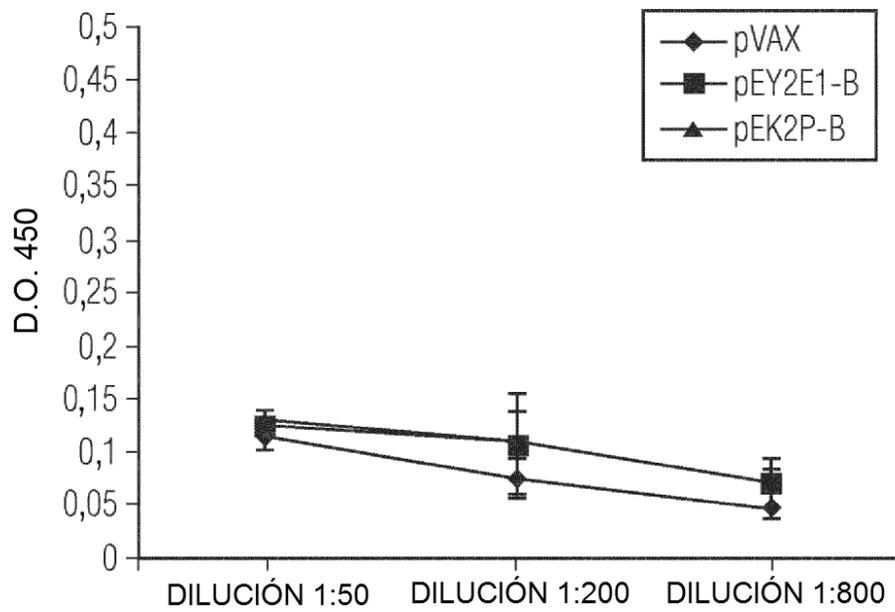


FIG. 4B

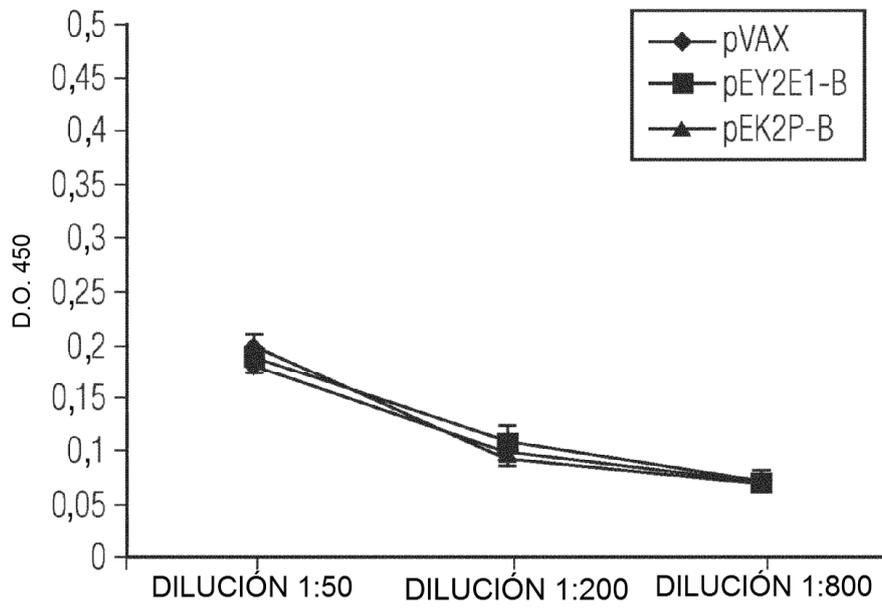


FIG. 4C

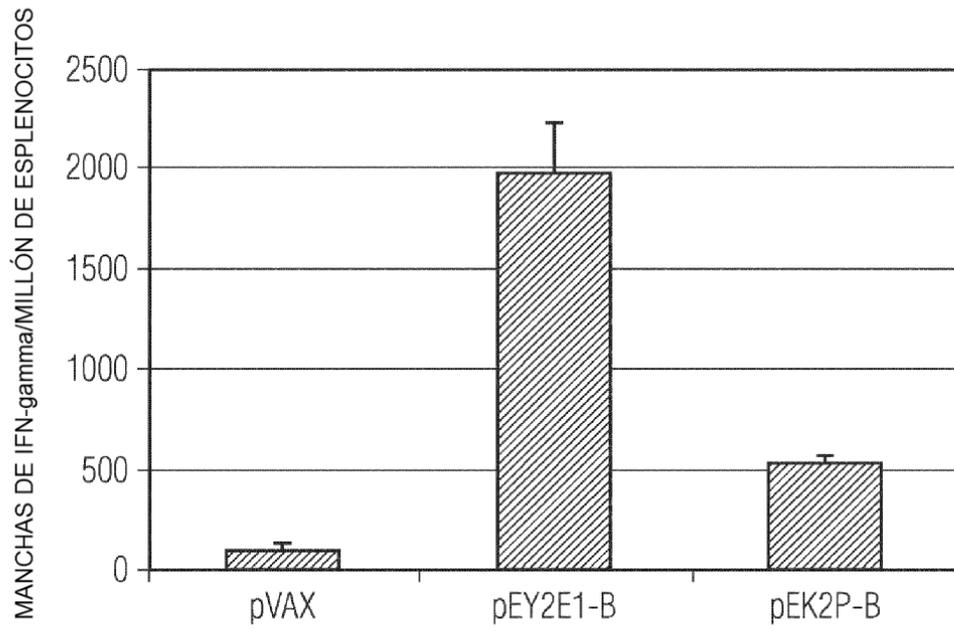


FIG. 5A

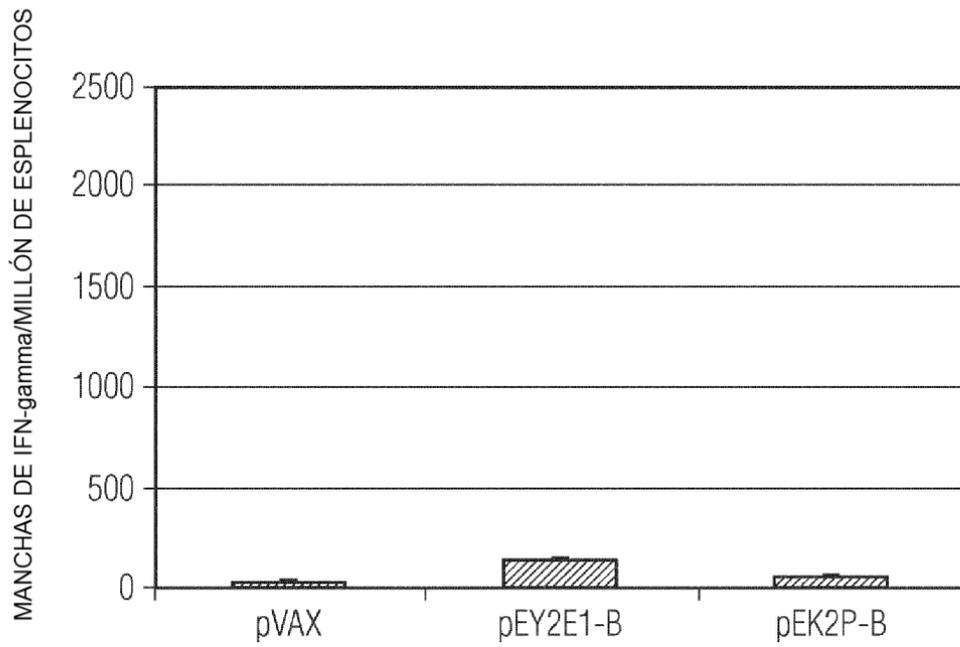


FIG. 5B

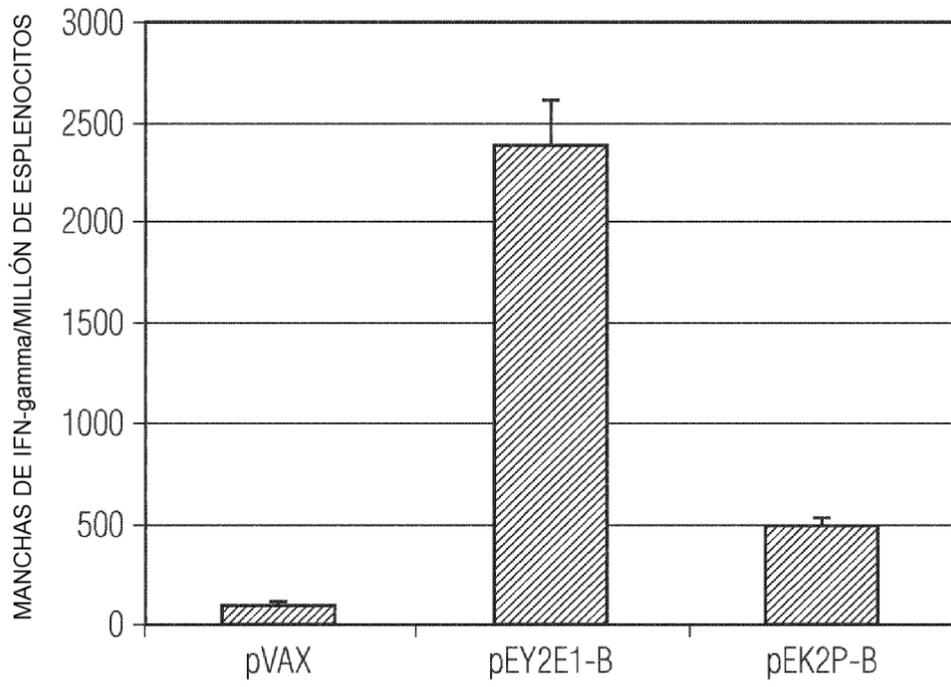


FIG. 5C

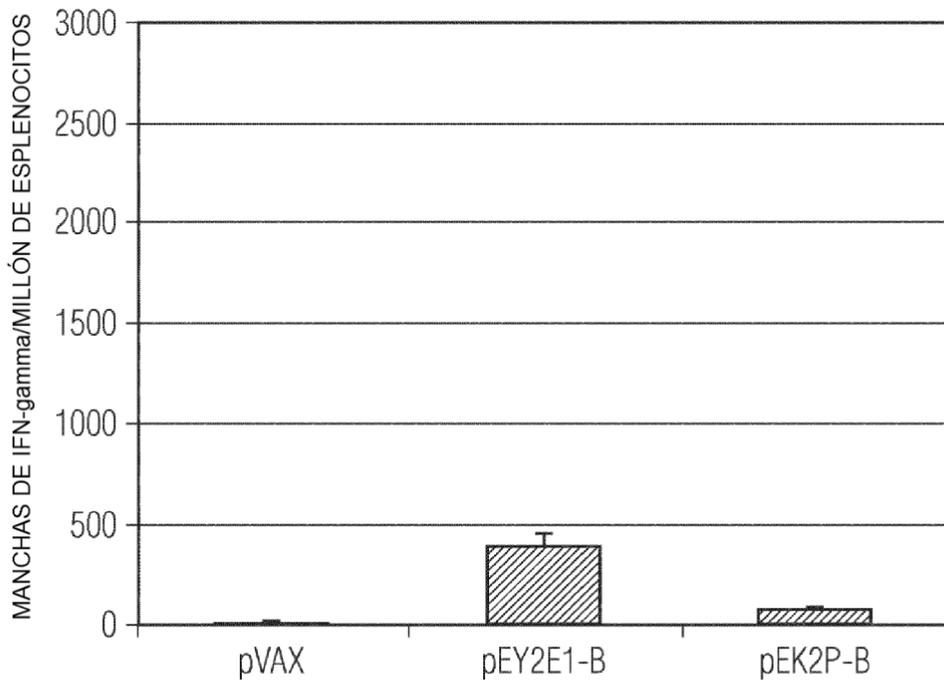


FIG. 5D

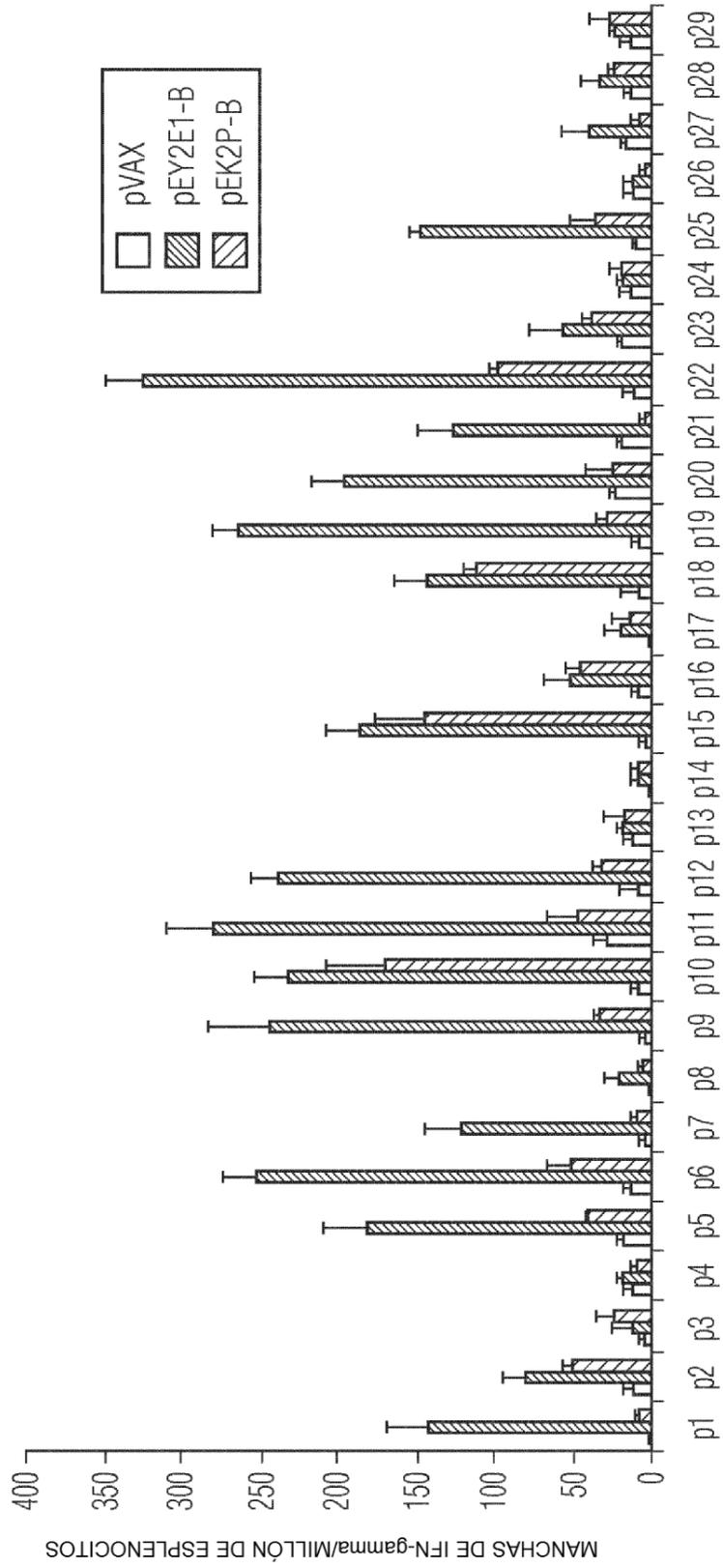


FIG. 5E

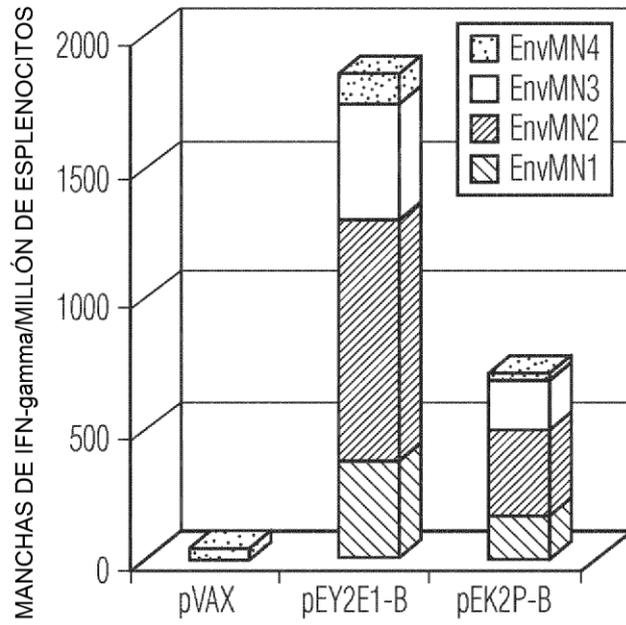


FIG. 6A

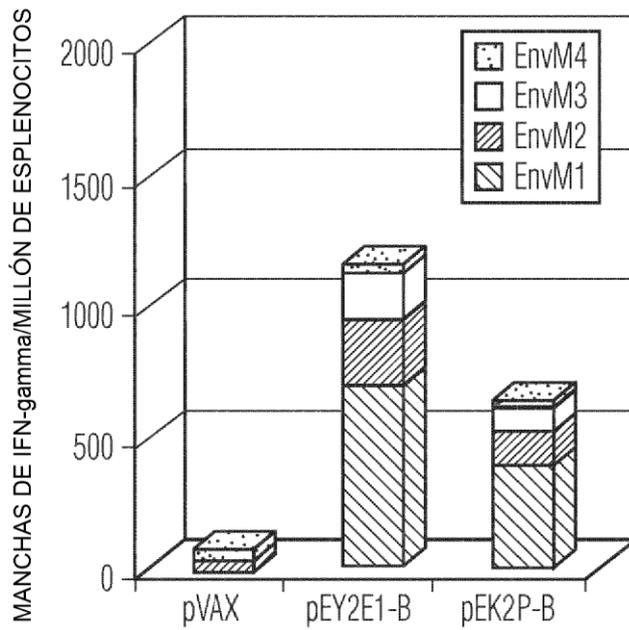


FIG. 6B

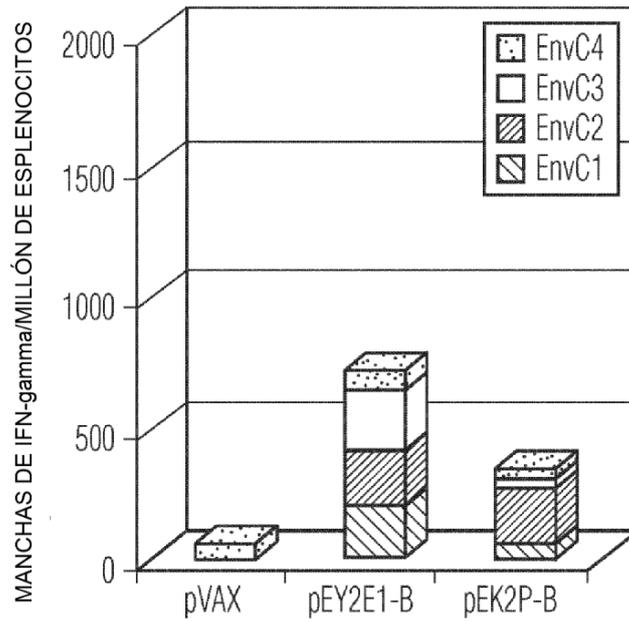


FIG. 6C

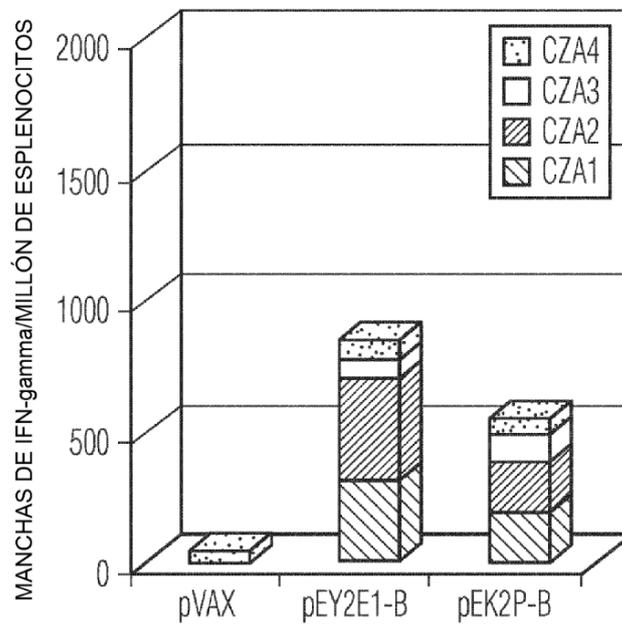


FIG. 6D

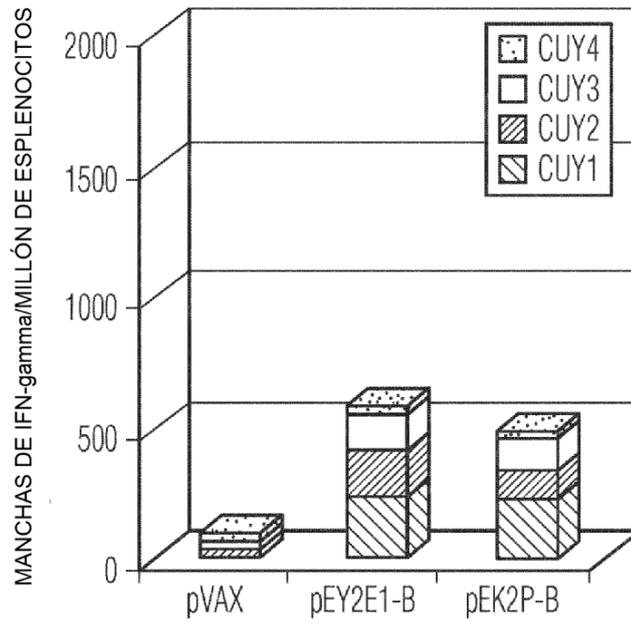


FIG. 6E

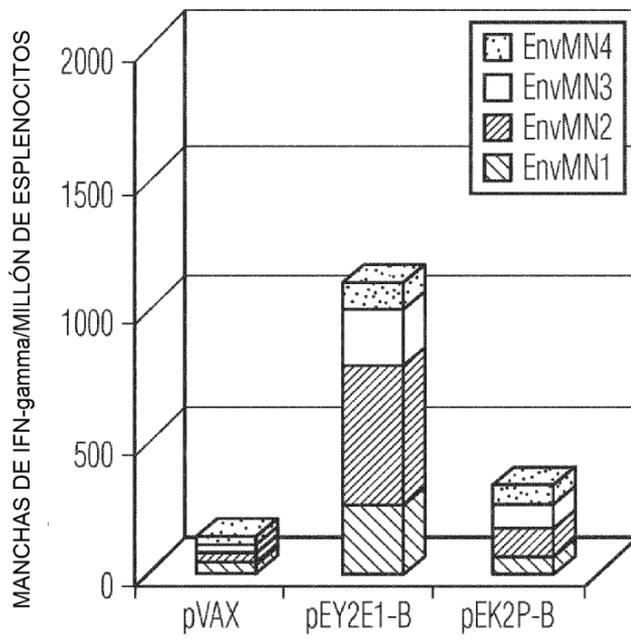


FIG. 6F

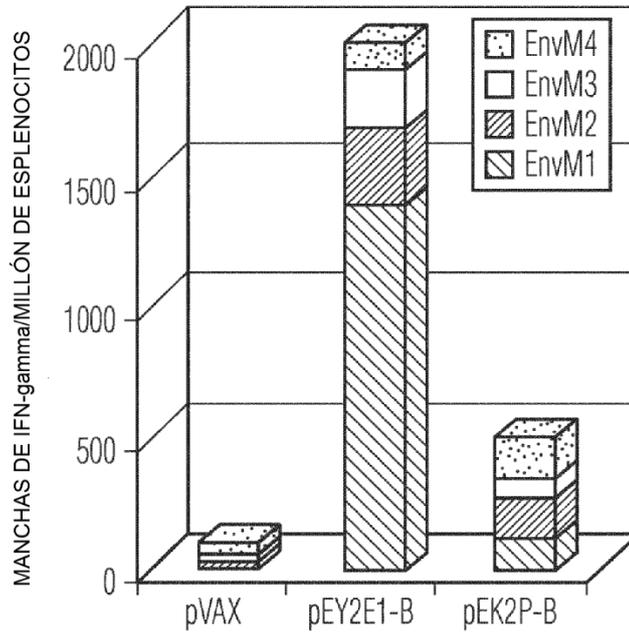


FIG. 6G

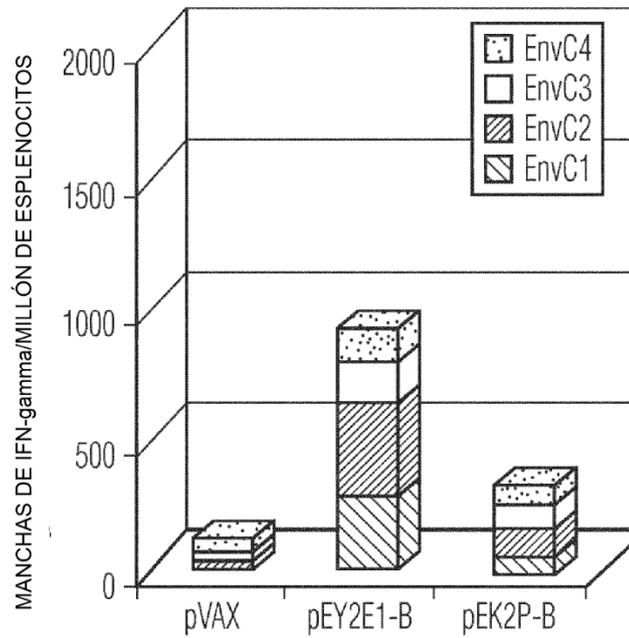


FIG. 6H

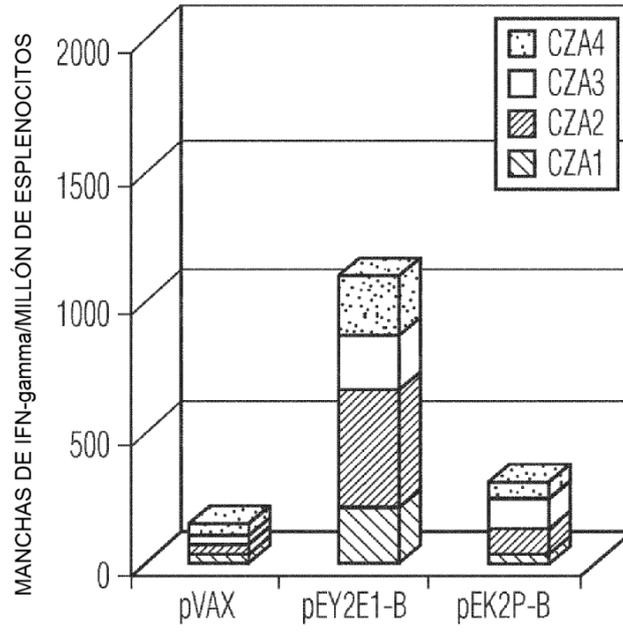


FIG. 6I

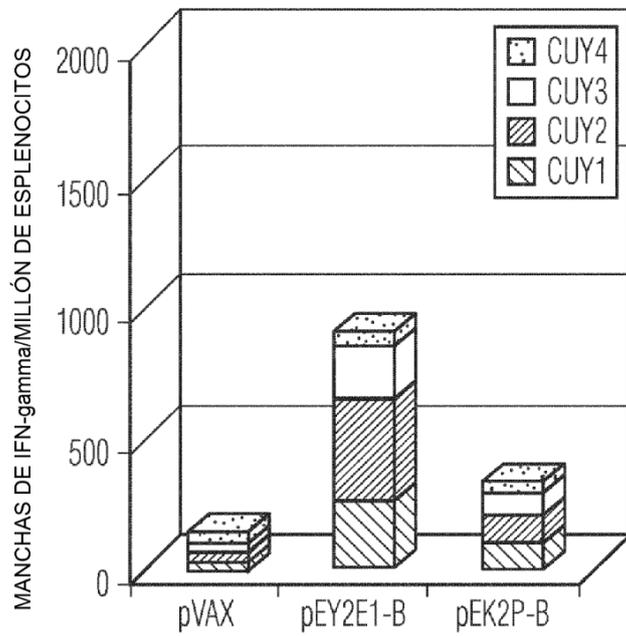


FIG. 6J

ELISpot de IFN-gamma específico de env de MN de subtipo B en ratones BalB/C

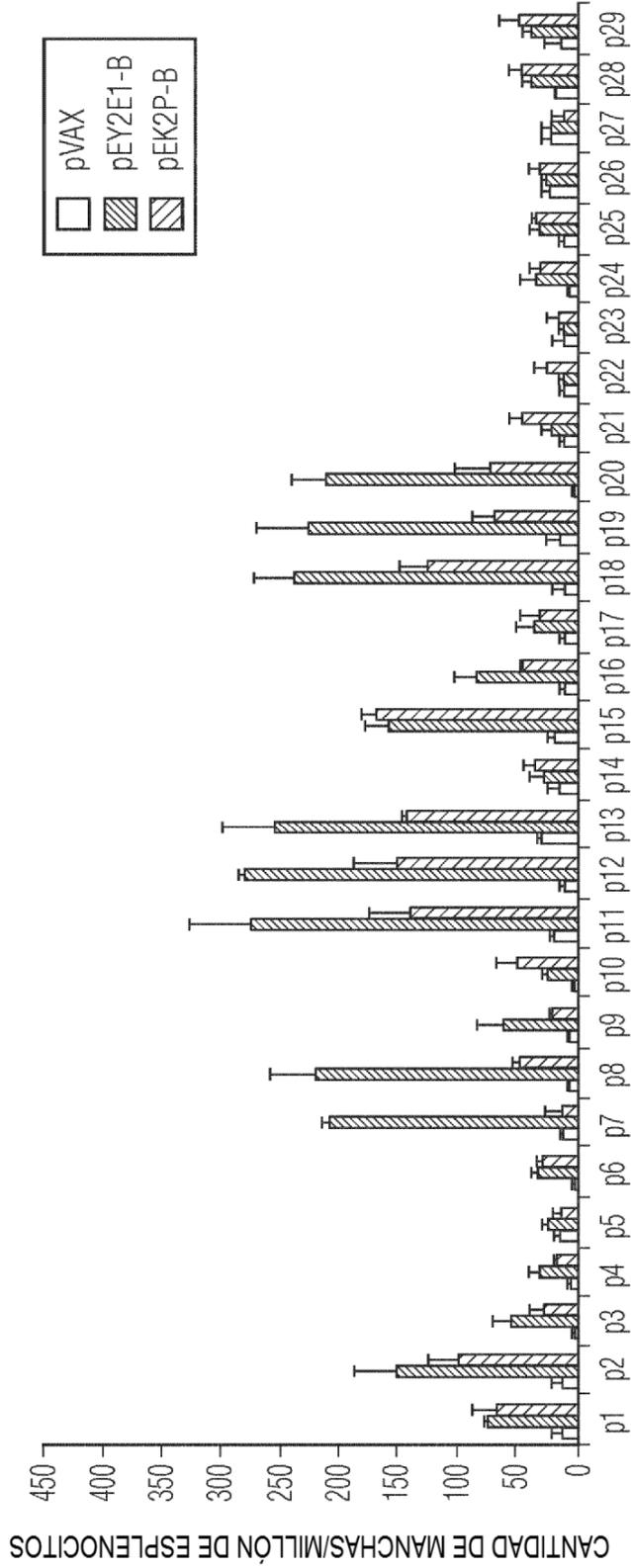


FIG. 7A

ELISpot de IFN-gamma específico de env de MN de subtipo B en ratones transgénicos HLA-A2.1

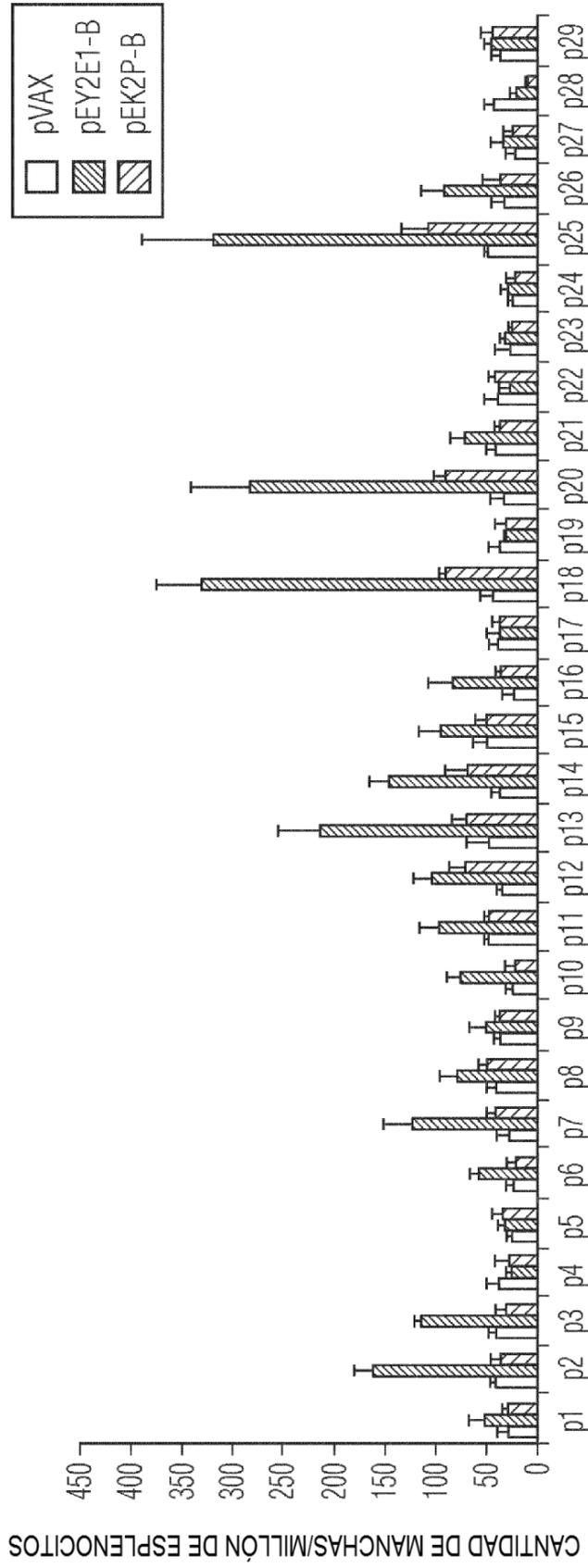


FIG. 7B

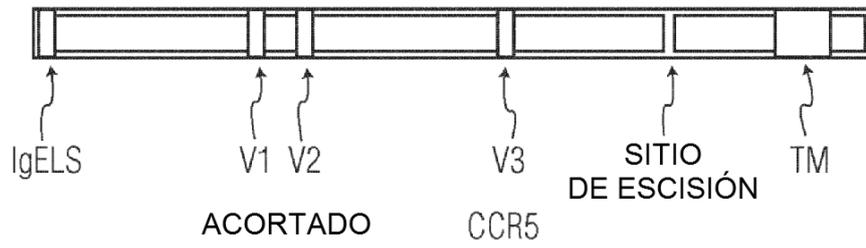


FIG. 8

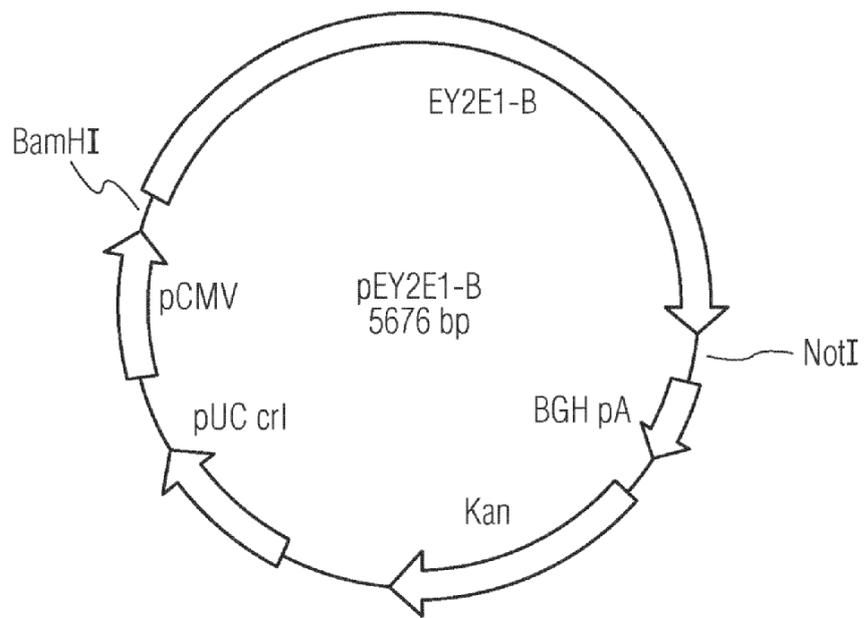


FIG. 9

ELISpot de IFN-gamma específico de env consenso de subtipo B

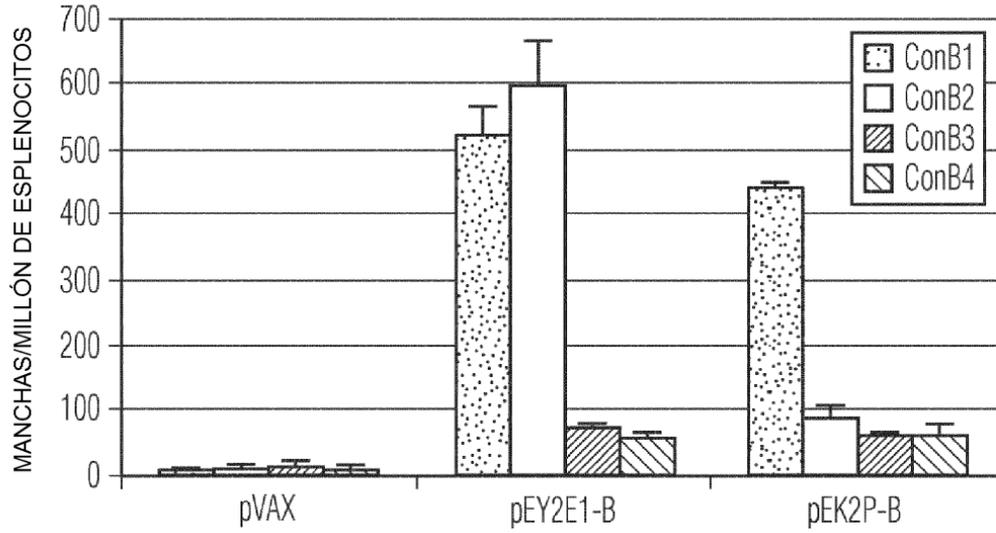


FIG. 10A

ELISpot de IFN-gamma específico de env consenso de subtipo B

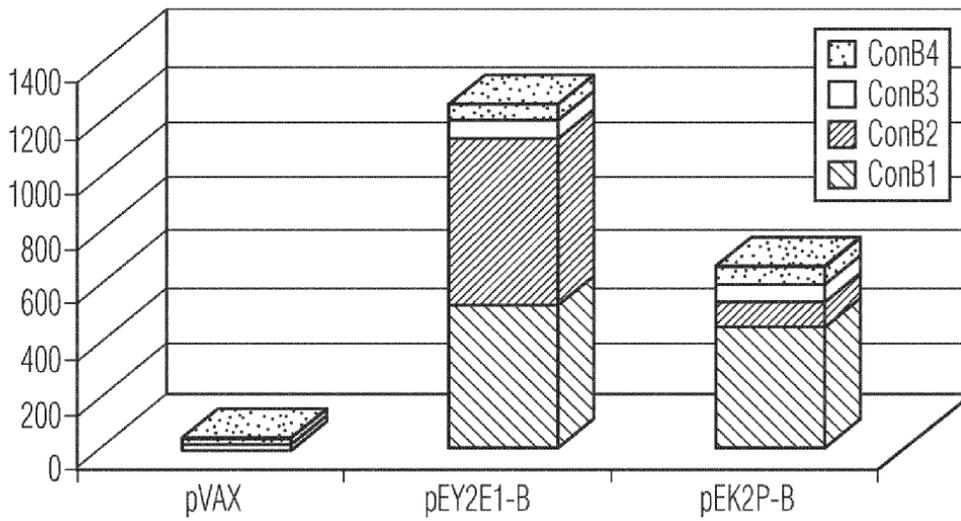


FIG. 10B

ELISpot de IFN-gamma específico de env de MN de subtipo B

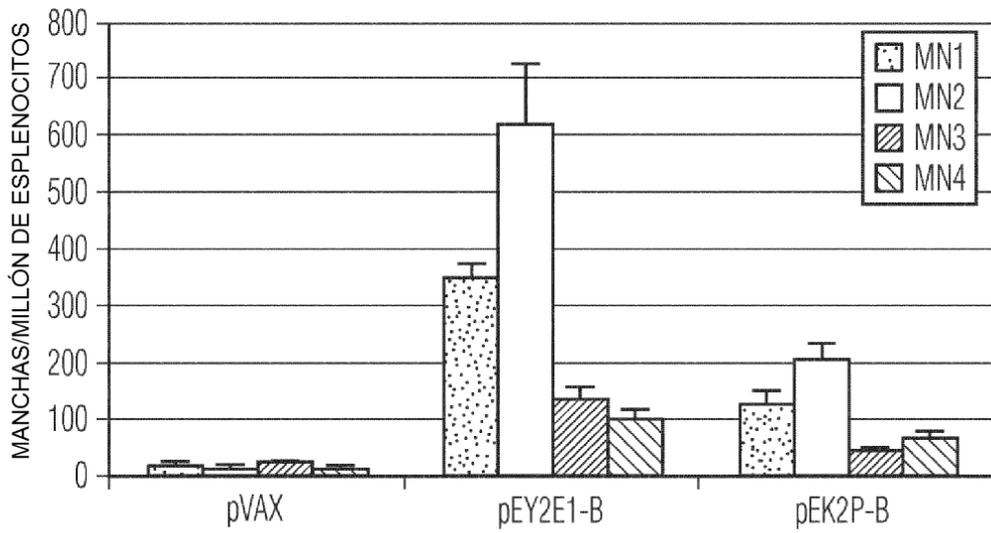


FIG. 11A

ELISpot de IFN-gamma específico de env de MN de subtipo B

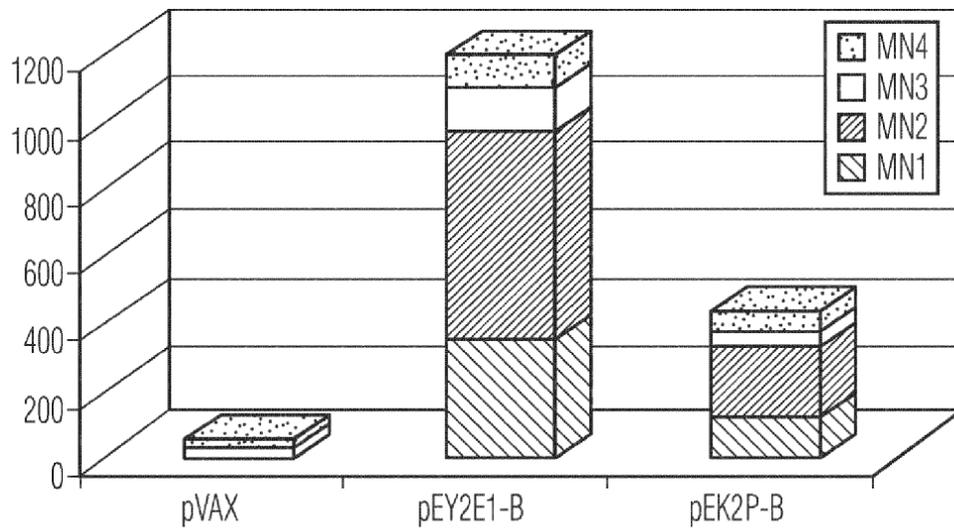


FIG. 11B

ELISpot de IFN-gamma específico de env consenso de subtipo C

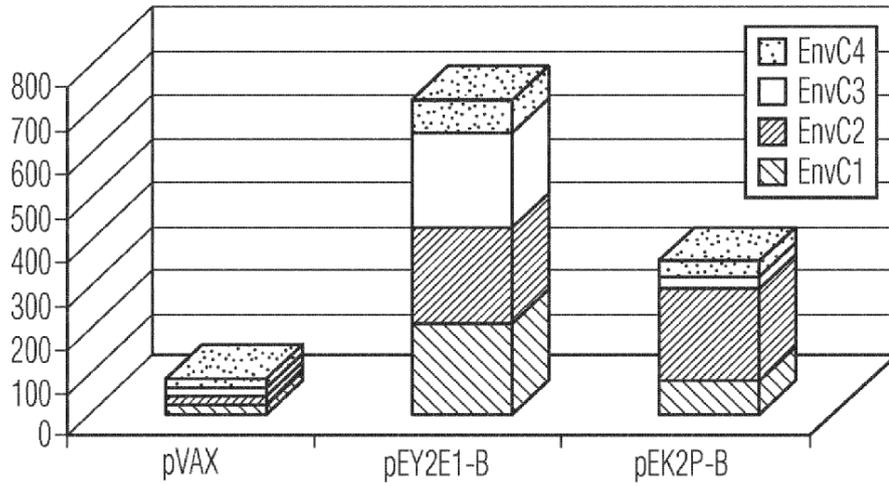


FIG. 12A

ELISpot de IFN-gamma específico de env de grupo M

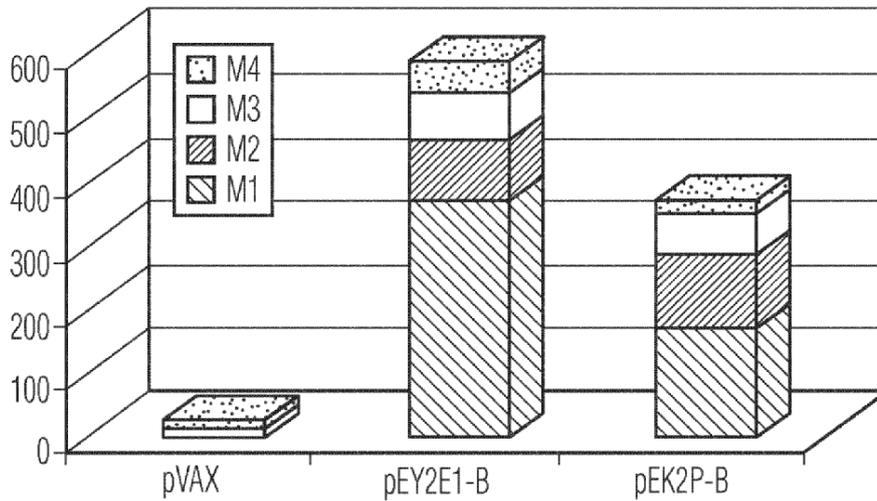


FIG. 12B

ELISpot de IFN-gamma específico de env de subtipo C C1.C.UY.01 TRA3011

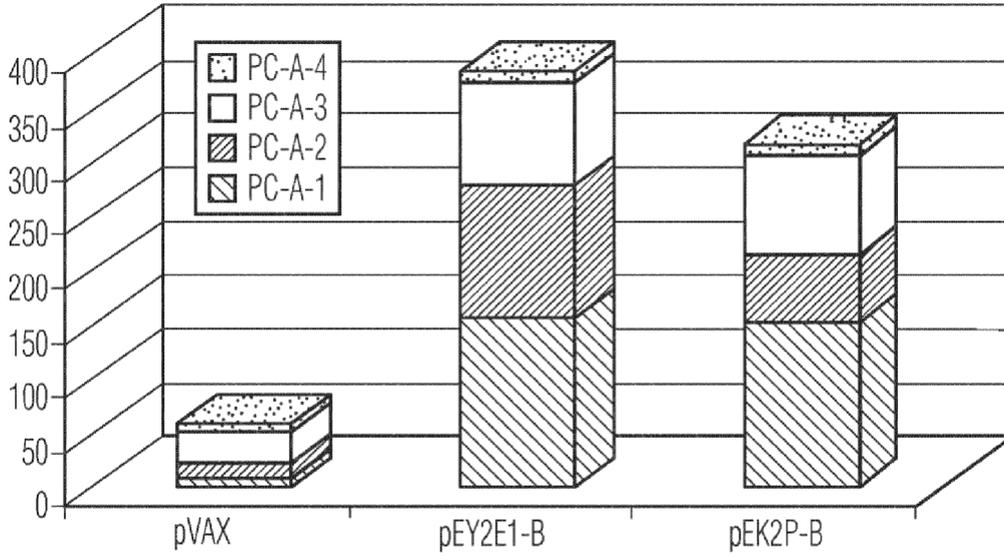


FIG. 12C

ELISpot de IFN-gamma específico de env de subtipo C C.ZA.01.J54Ma

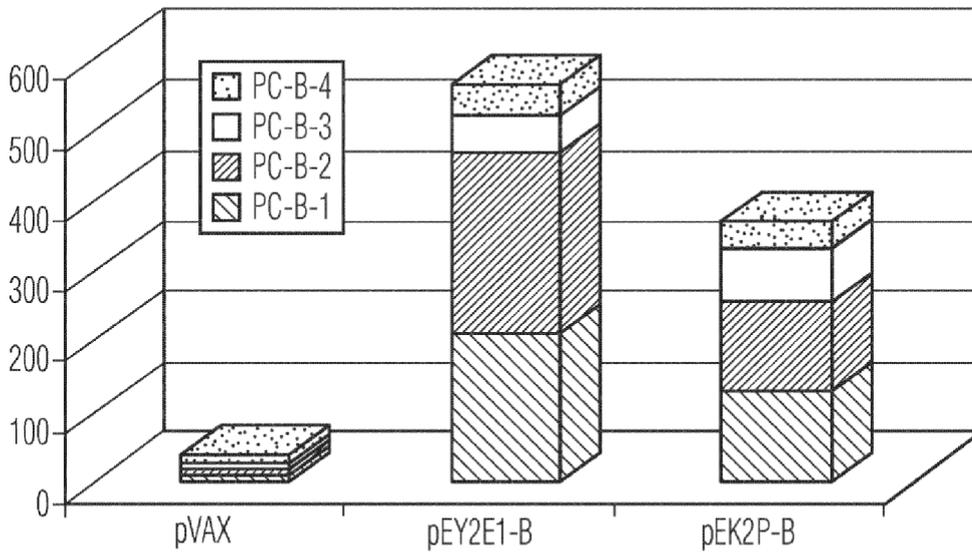


FIG. 12D

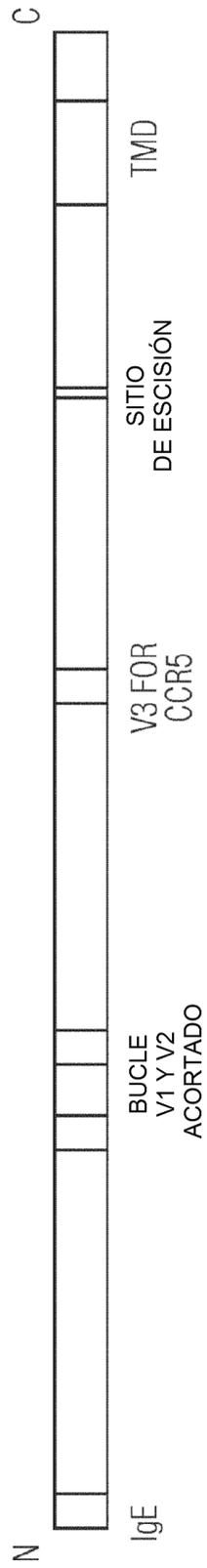


FIG. 13

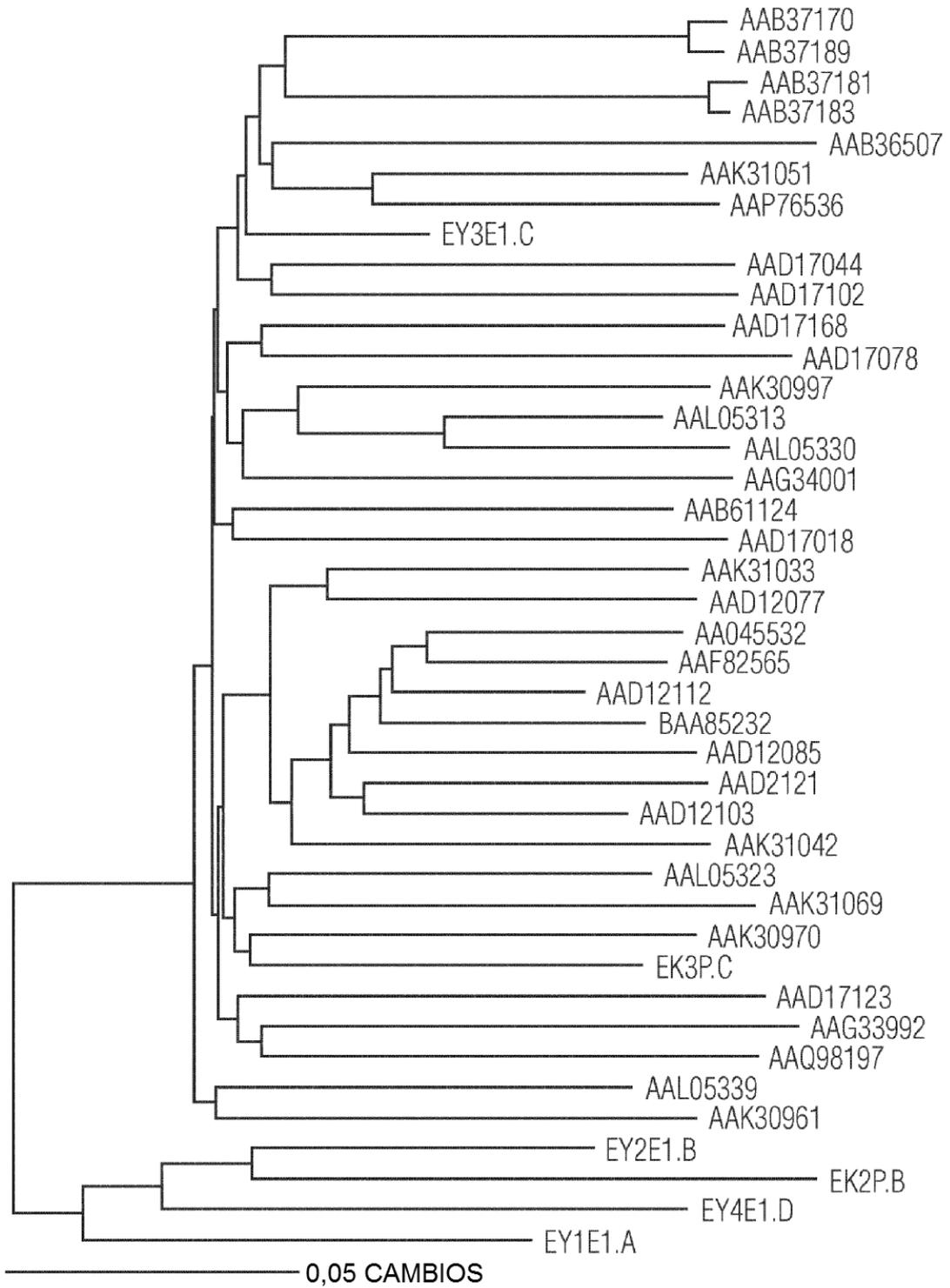


FIG. 14

ELISpot de IFN- γ específico de env consenso de subtipo C

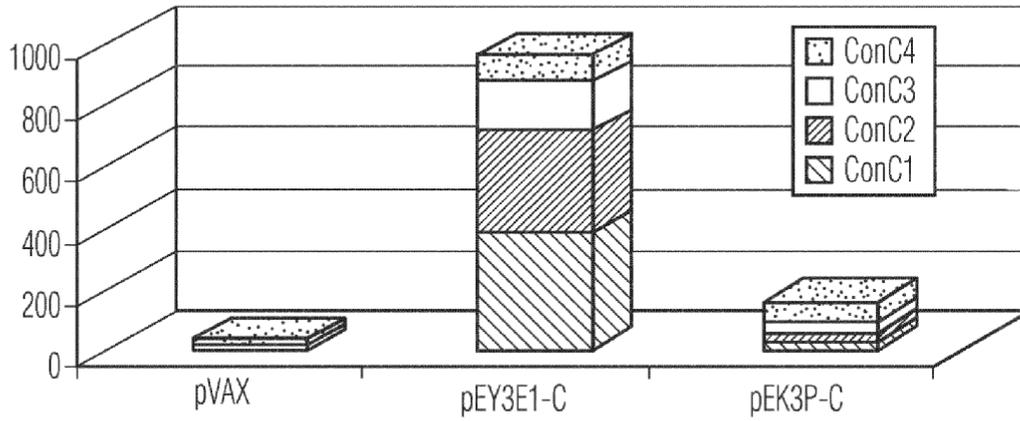


FIG. 15A

ELISpot de IFN- γ específico de env consenso de subtipo C

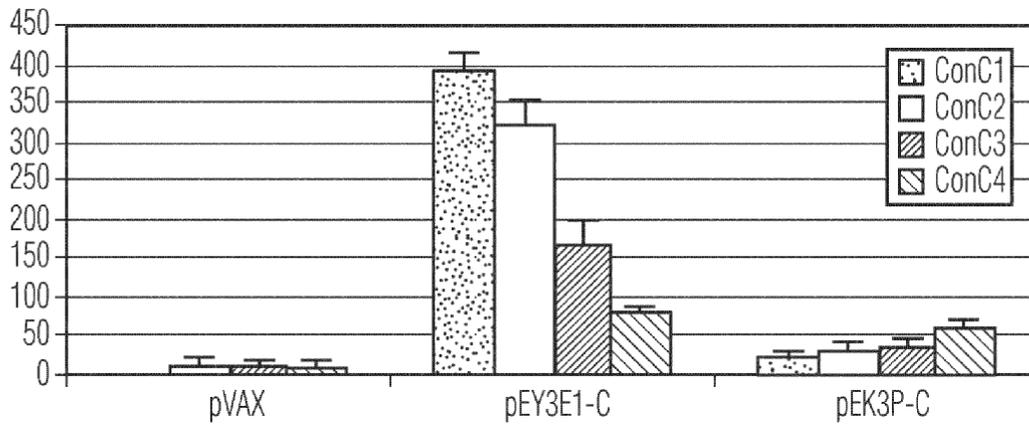


FIG. 15B

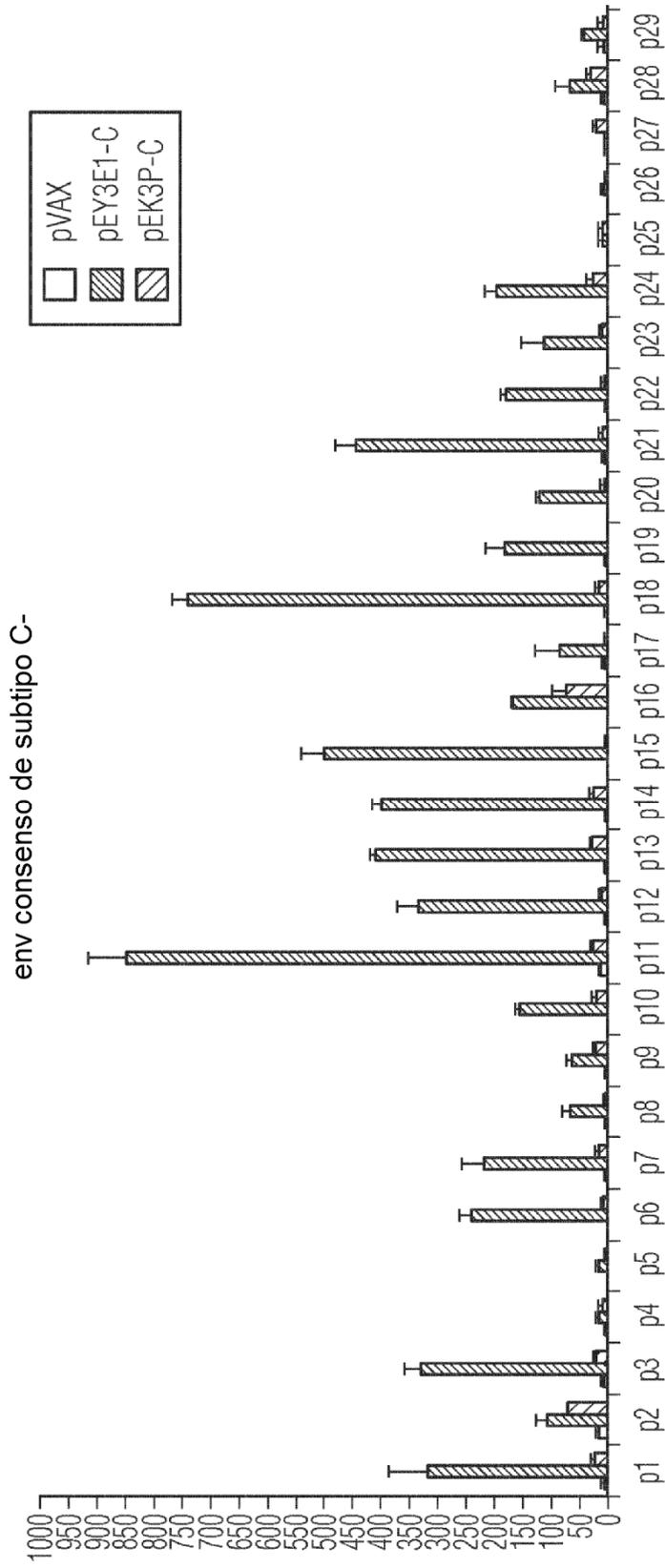


FIG. 16

ELISpot de IFN- γ específico de env de subtipo C (Uruguay)

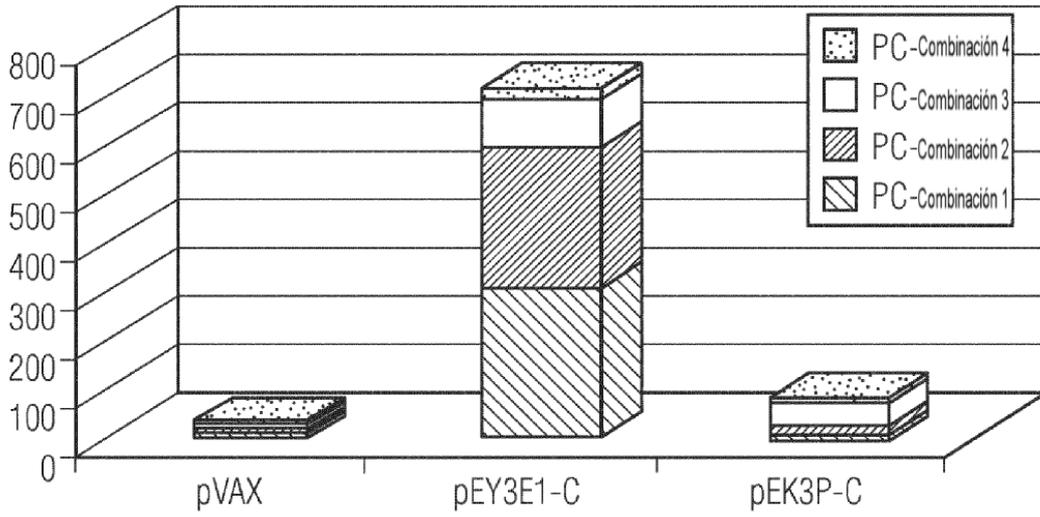


FIG. 17A

ELISpot de IFN- γ específico de env de subtipo C (Uruguay)

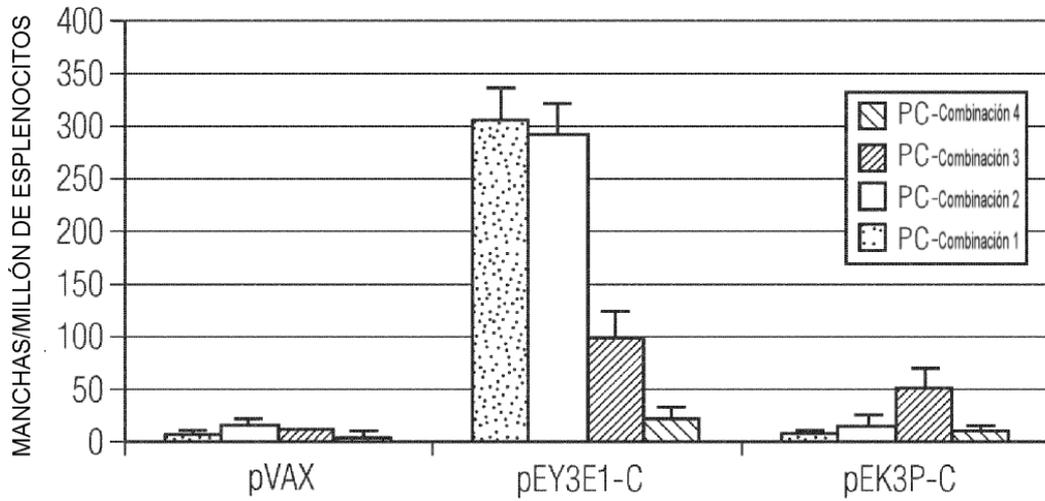


FIG. 17B

ELISpot de IFN-γ específico de env de subtipo C (Sudáfrica)

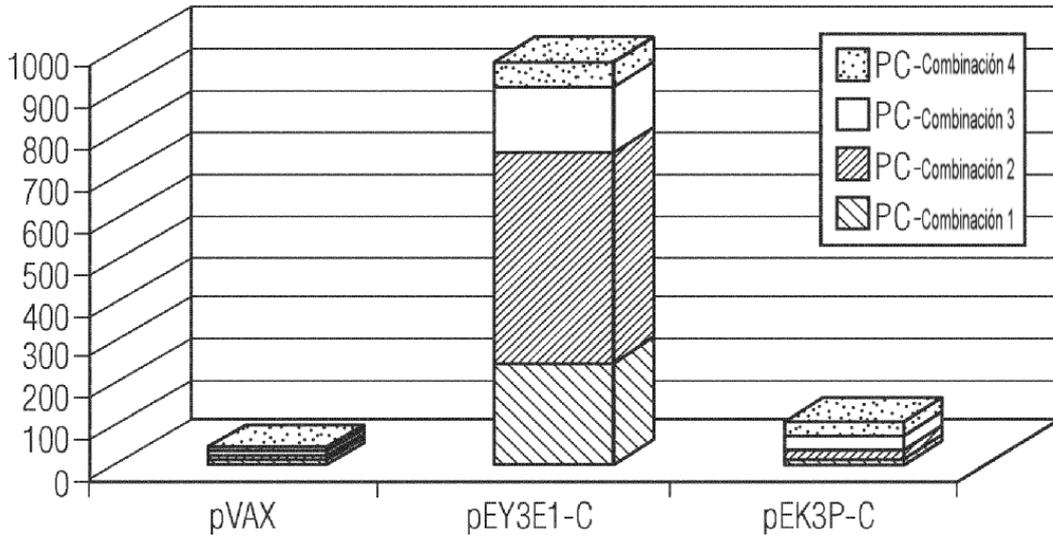


FIG. 17C

ELISpot de IFN-γ específico de env de subtipo C (Sudáfrica)

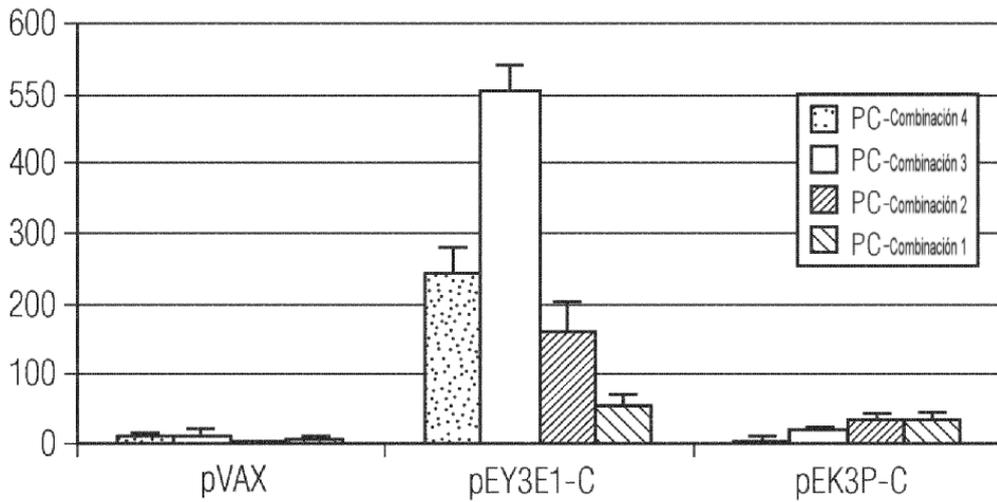


FIG. 17D

ELISpot de IFN-γ específico de env de subtipo C (Uruguay)

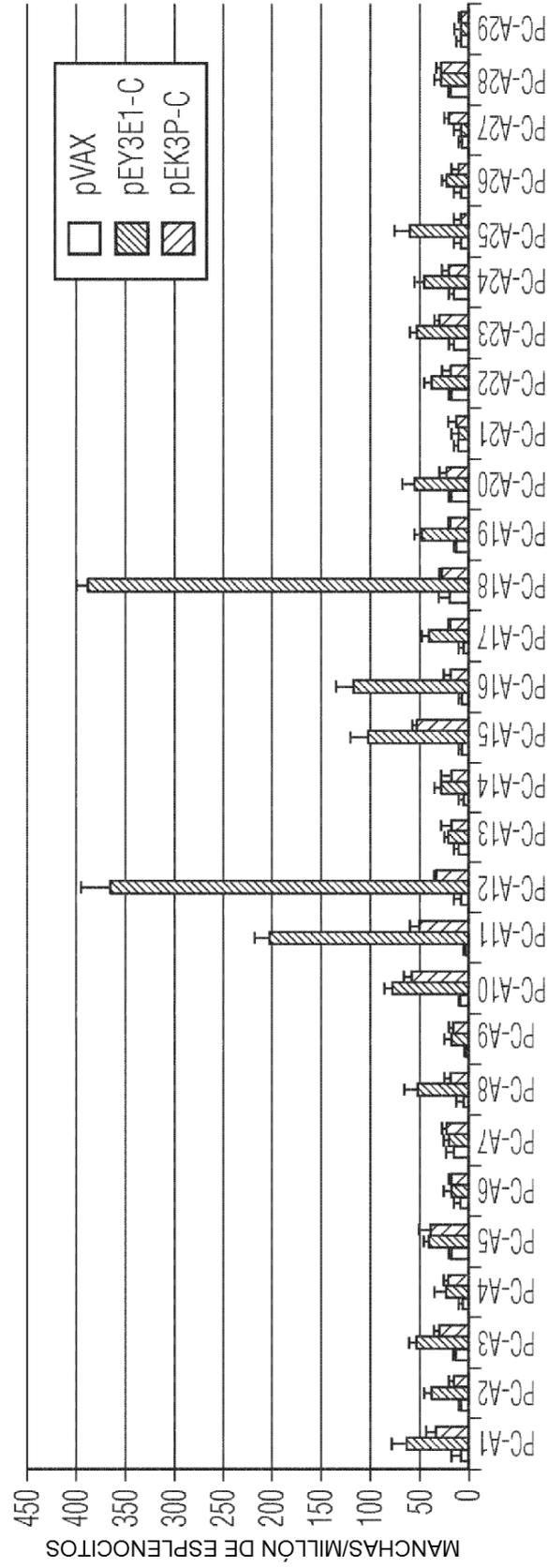


FIG. 18A

ELISpot de IFN-γ específico de env de subtipo C (Sudáfrica)

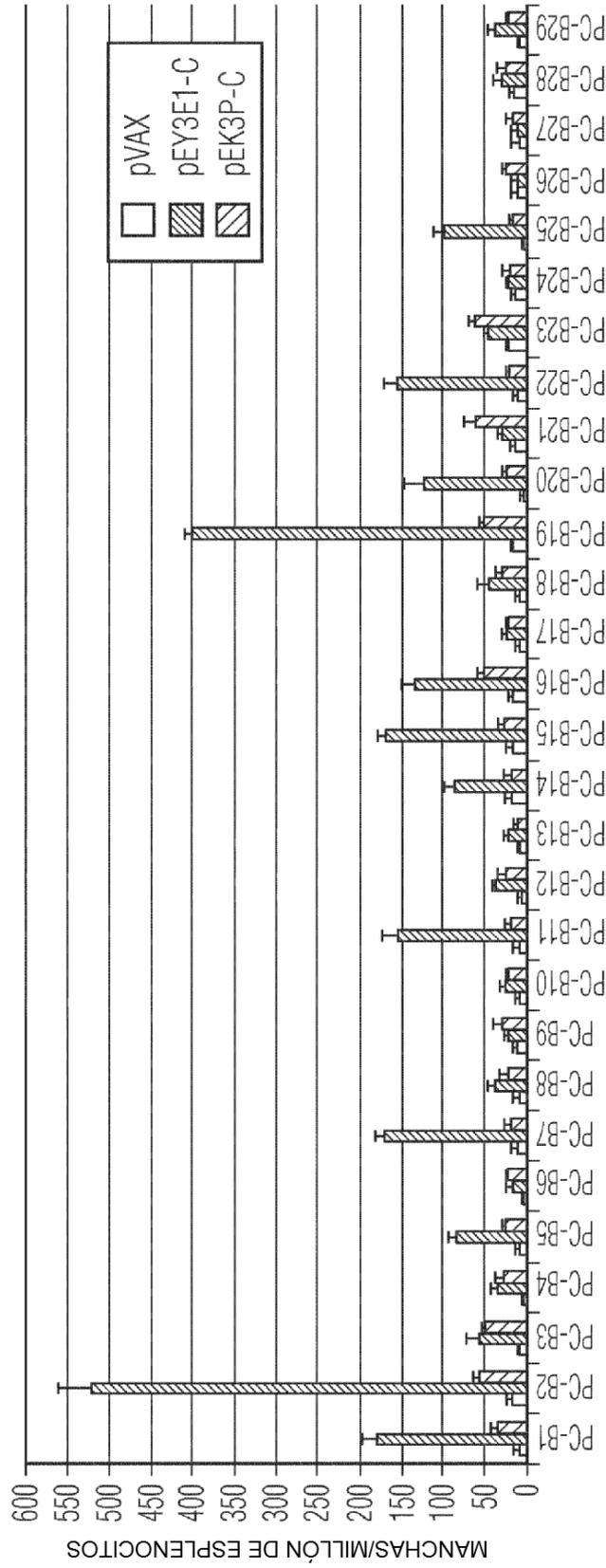


FIG. 18B

ELISpot de IFN- γ específico de env consenso de subtipo B

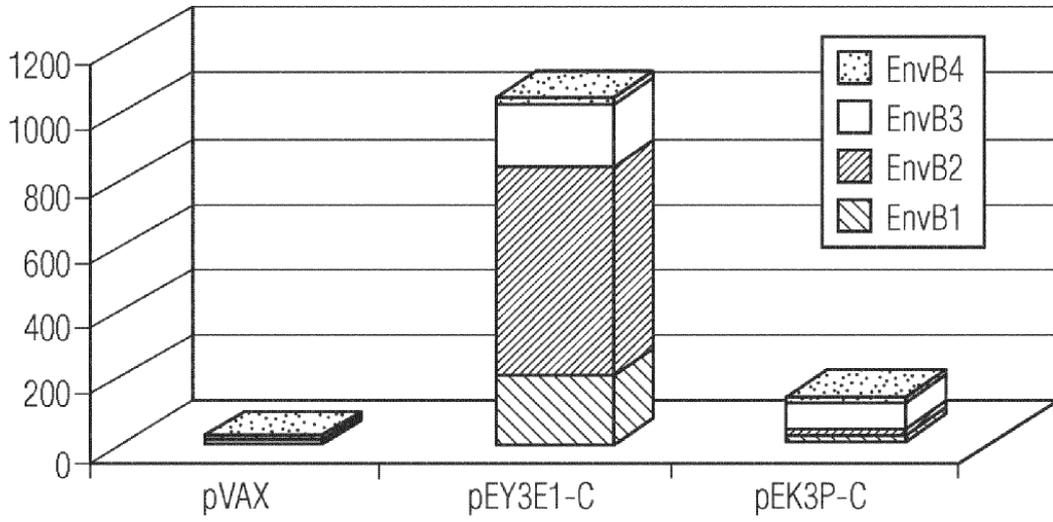


FIG. 19A

ELISpot de IFN- γ específico de env consenso de subtipo B

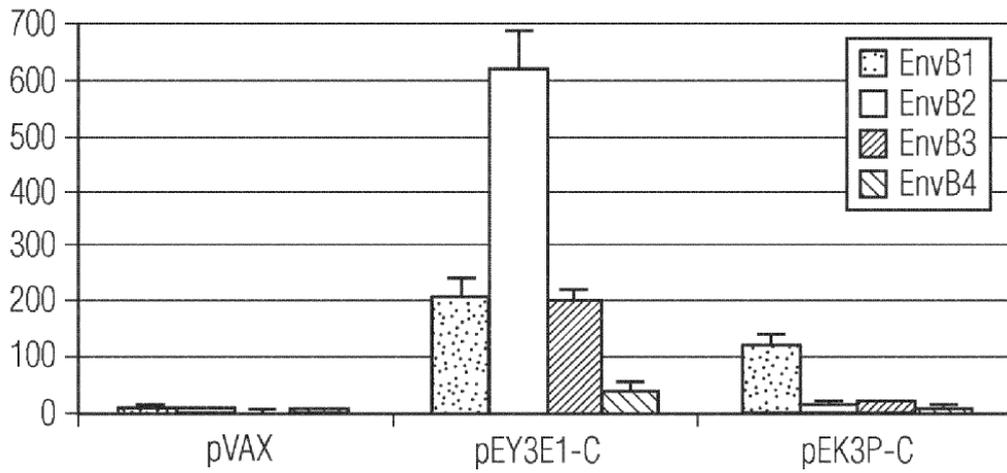


FIG. 19B

ELISpot de IFN-γ específico de env de subtipo B (EE.UU.)

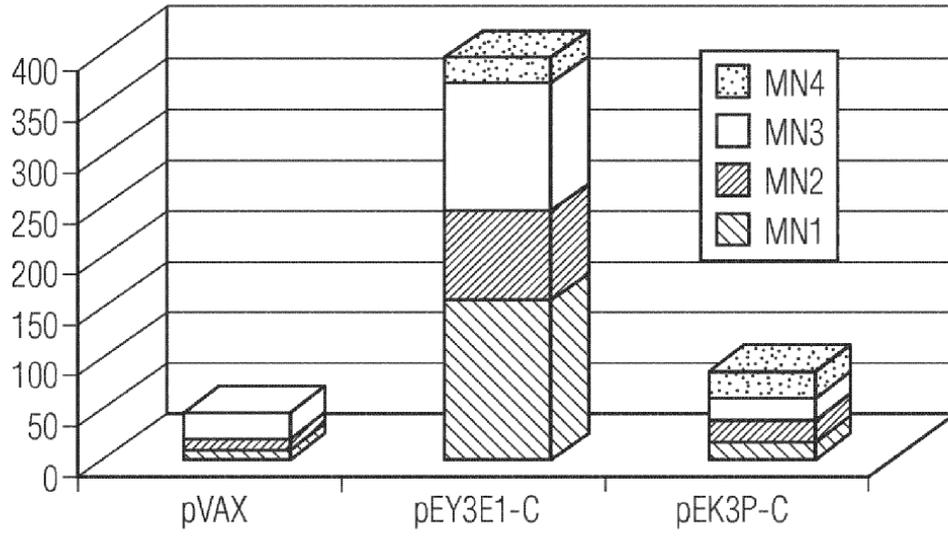


FIG. 19C

ELISpot de IFN-γ específico de env de subtipo B (EE.UU.)

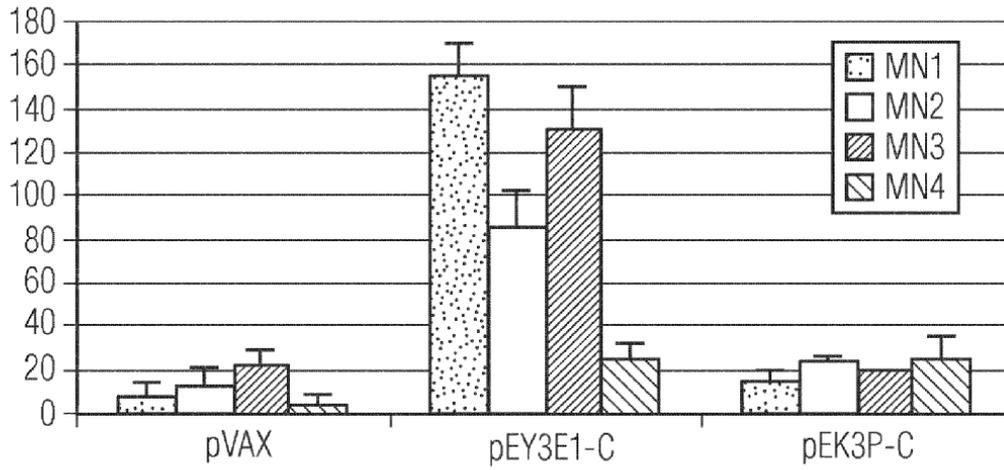


FIG. 19D

ELISpot de IFN- γ específico de env de grupo M

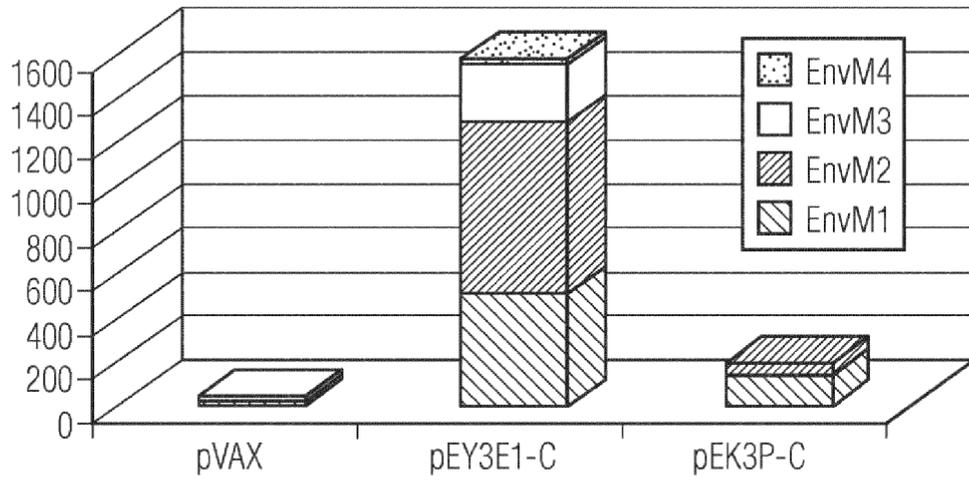


FIG. 19E

ELISpot de IFN- γ específico de env de grupo M

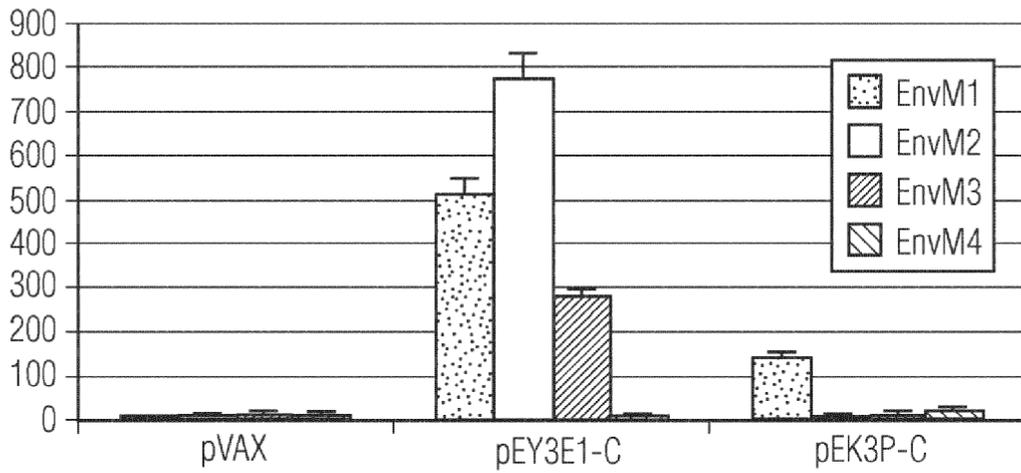


FIG. 19F

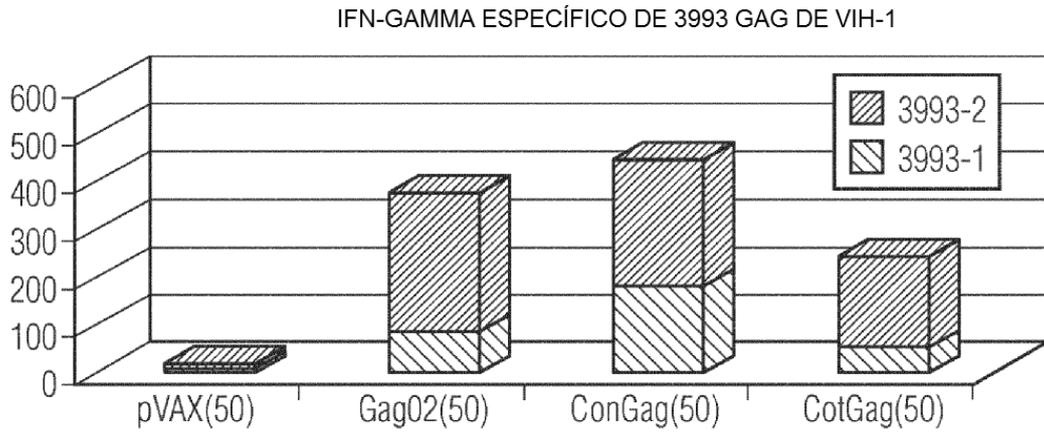


FIG. 20A

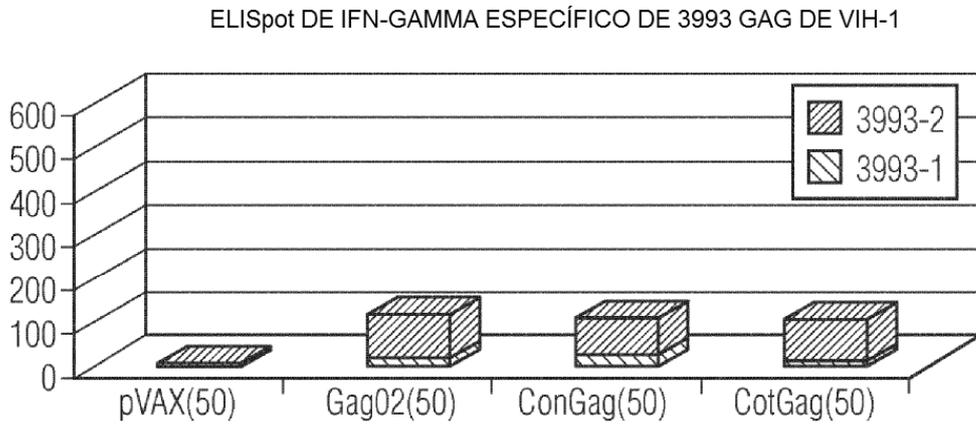


FIG. 20B

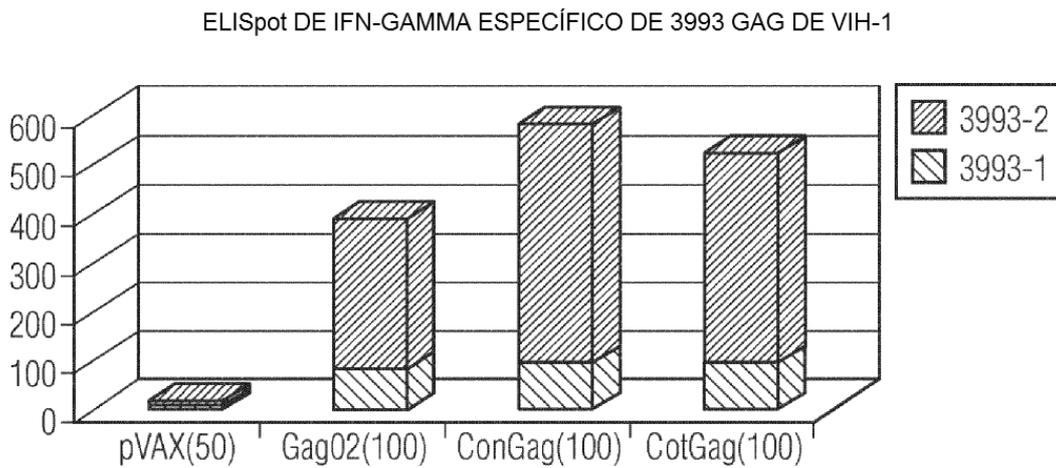


FIG. 20C

E DE IFN-GAMMA ESPECÍFICO DE 3993 GAG DE VIH-1

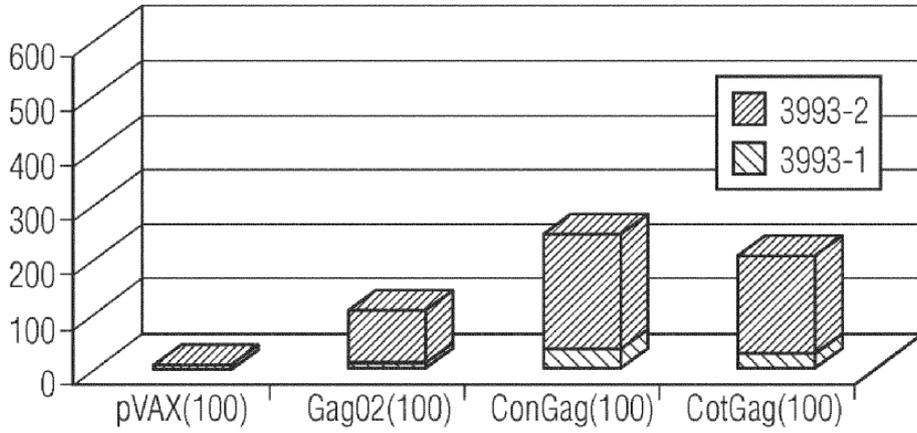


FIG. 20D

E DE IFN-GAMMA ESPECÍFICO DE 3993 GAG DE VIH-1

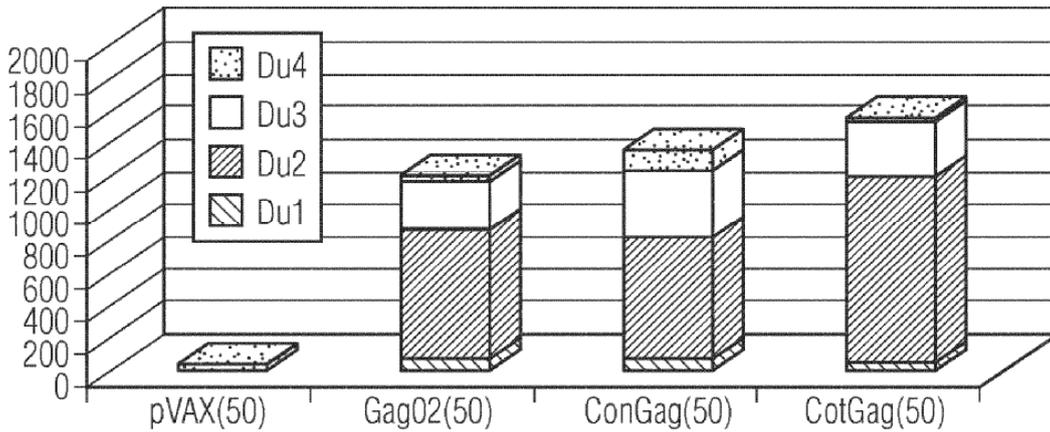


FIG. 20E

E DE IFN-GAMMA ESPECÍFICO DE 3993 Du GAG DE VIH-1

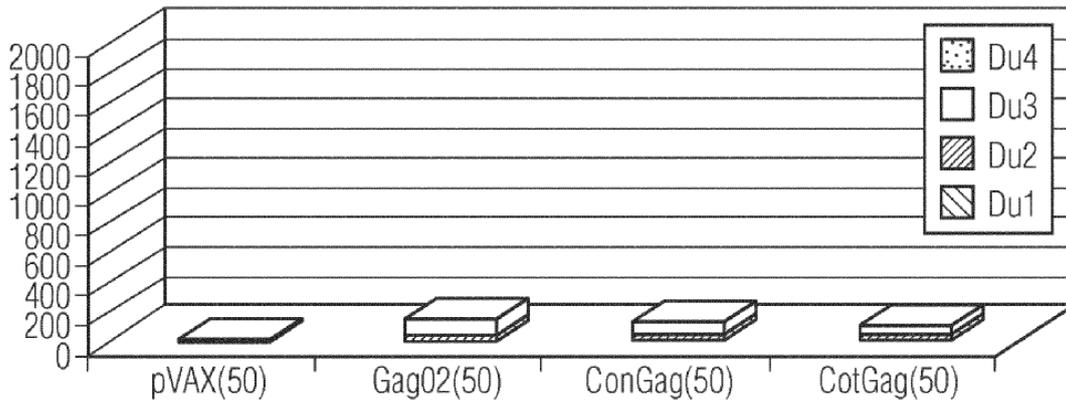


FIG. 20F

IFN-gamma específico de Du gag de VIH-1

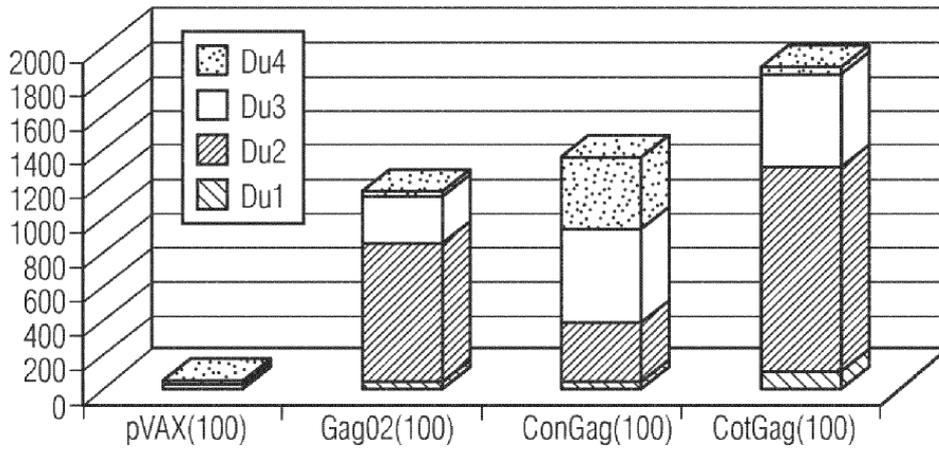


FIG. 20G

E de IFN-gamma específico de Du gag de VIH-1

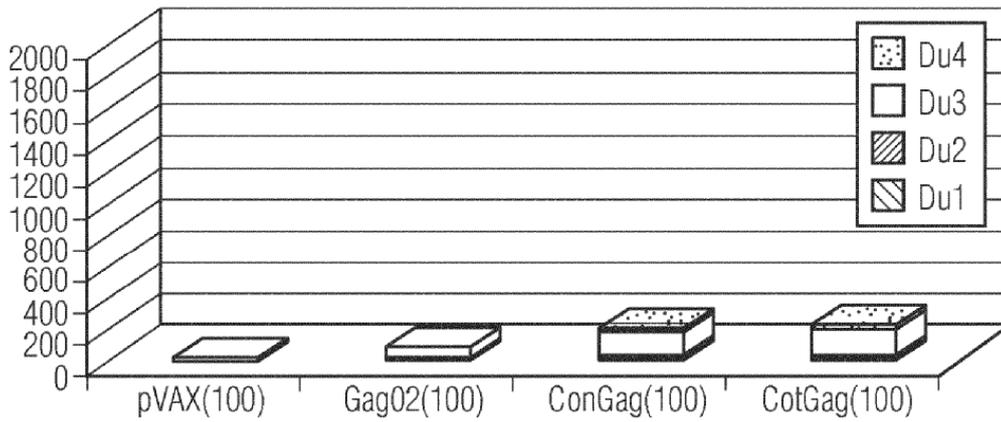


FIG. 20H

E de IFN-gamma específico de gag consenso de clado A de VIH-A

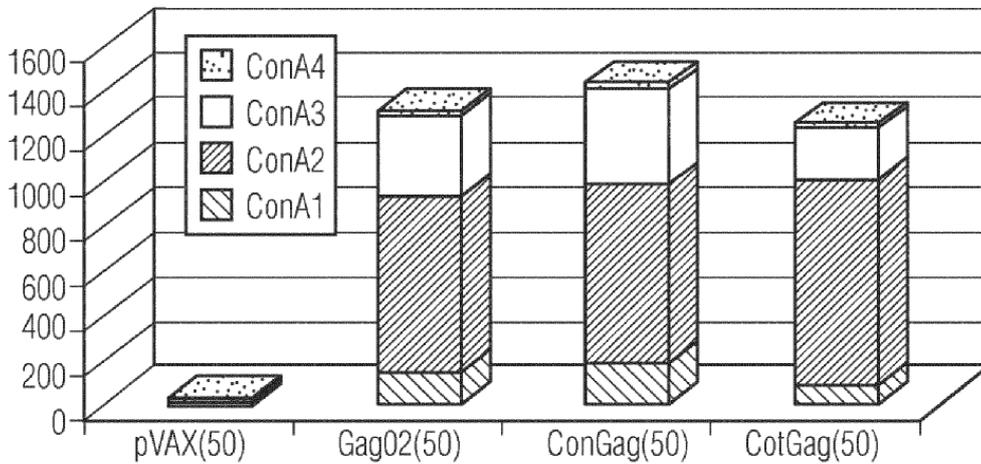


FIG. 20I

IFN-gamma específico de gag consenso de clado A de VIH-1

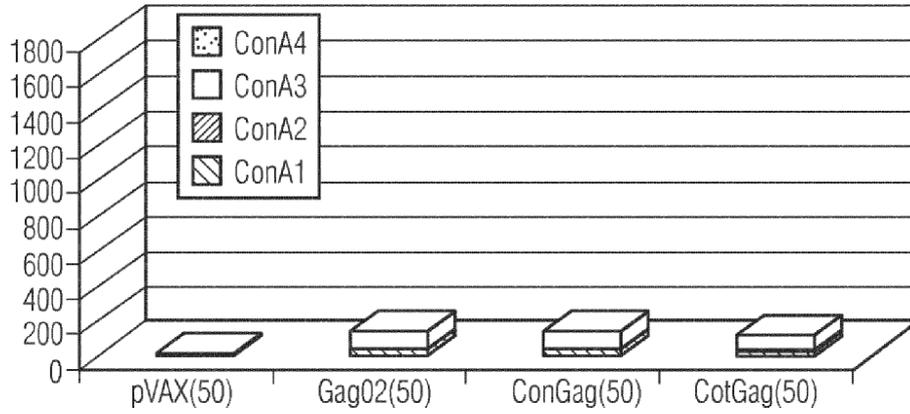


FIG. 20J

IFN-gamma específico de gag consenso de clado A de VIH-1

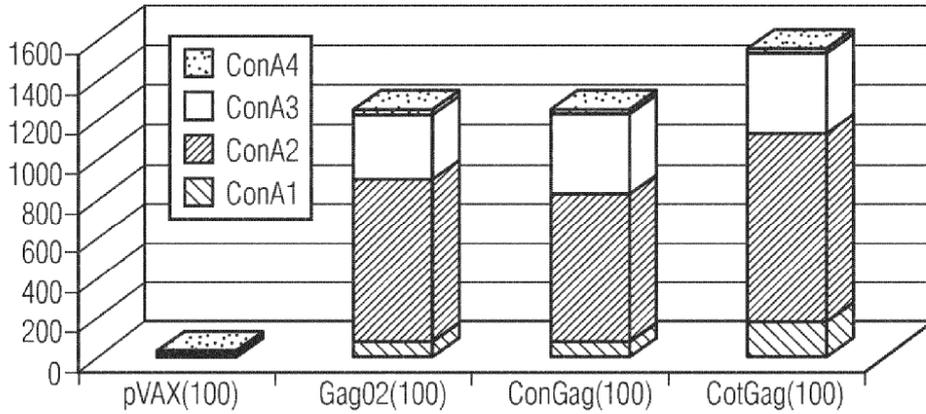


FIG. 20K

IFN-gamma específico de gag consenso de clado A de VIH-1

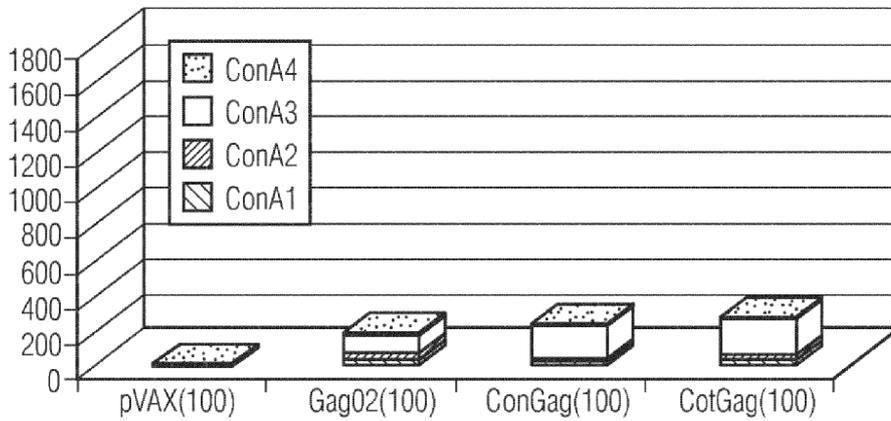


FIG. 20L

IFN-gamma específico de gag consenso de clado B de VIH-1

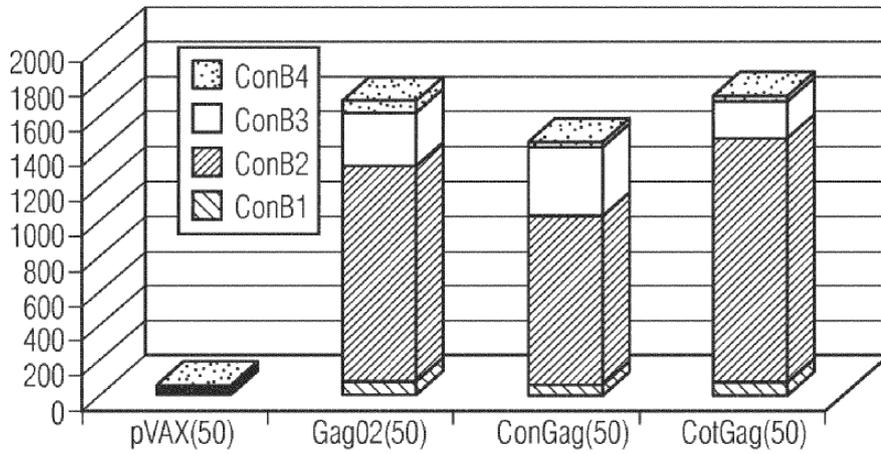


FIG. 20M

IFN-gamma específico de gag consenso de clado B de VIH-1

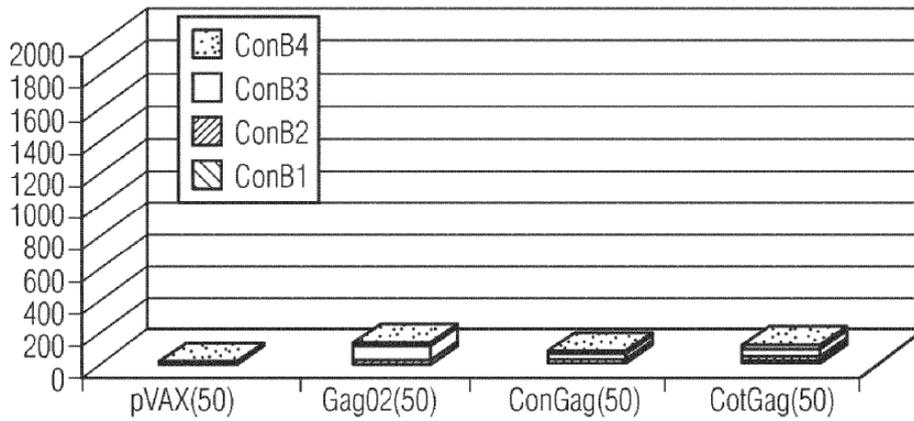


FIG. 20N

IFN-gamma específico de gag consenso de clado B de VIH-1

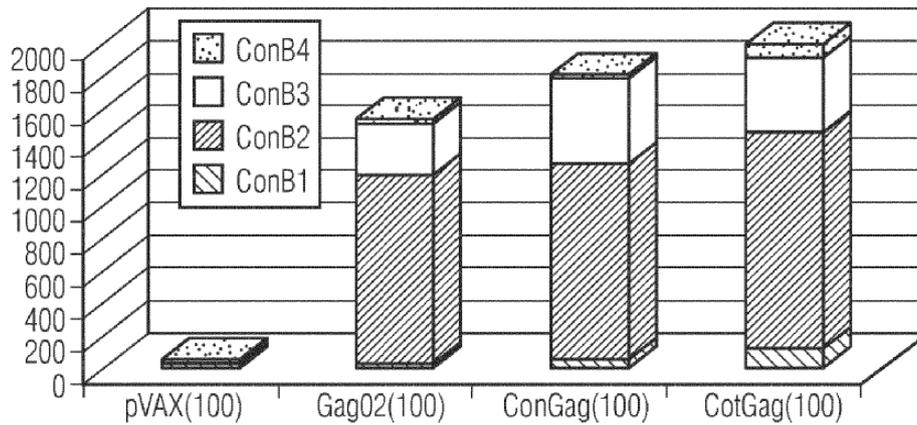


FIG. 20O

IFN-gamma específico de gag consenso de clado B de VIH-1

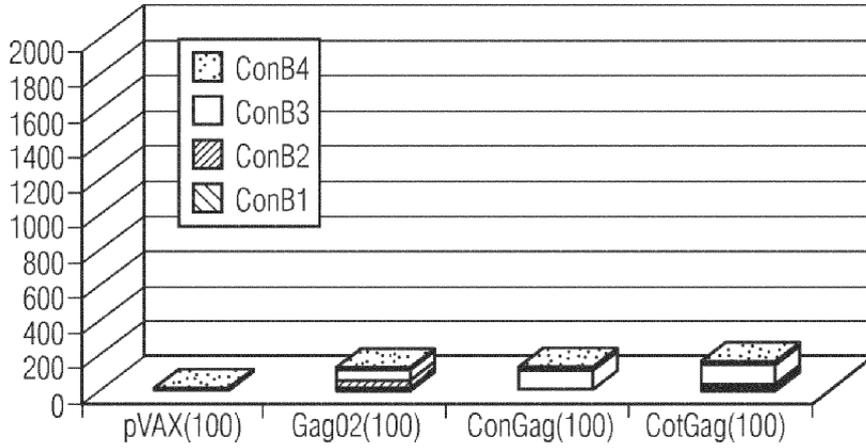


FIG. 20P

ELIS de IFN-gamma específico de gag de grupo M de VIH-1

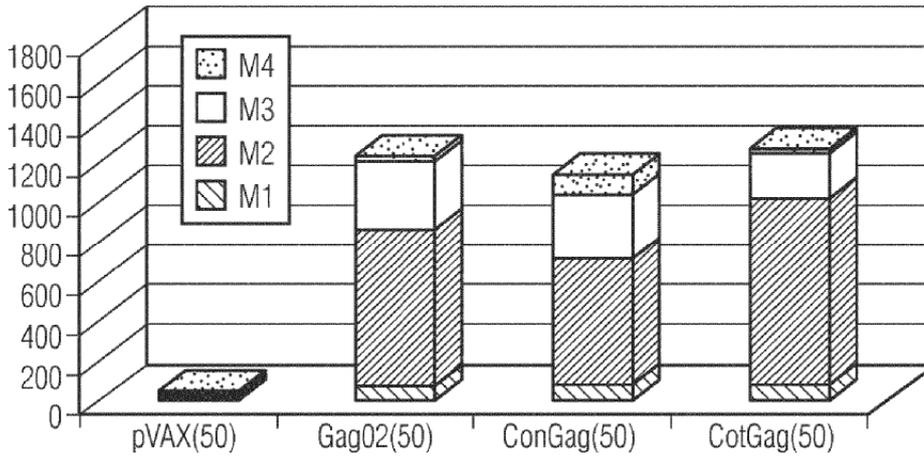


FIG. 20Q

ELIS de IFN-gamma específico de gag de grupo M de VIH-1

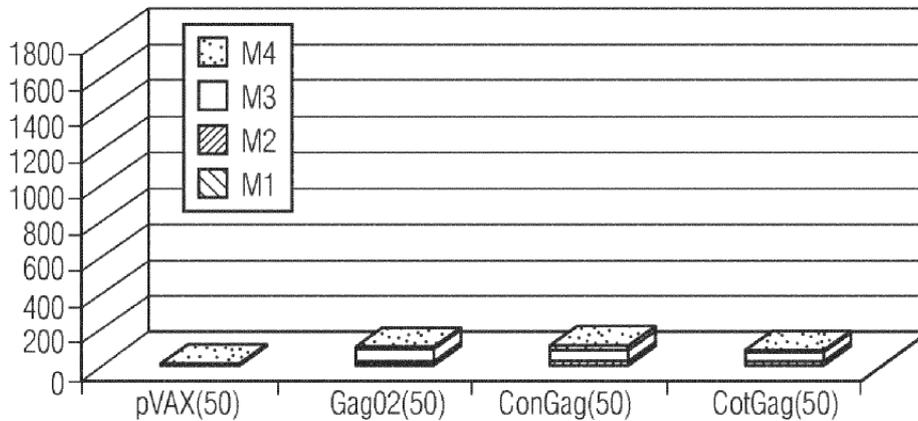


FIG. 20R

ELIS de IFN-gamma específico de gag de grupo M de VIH-1

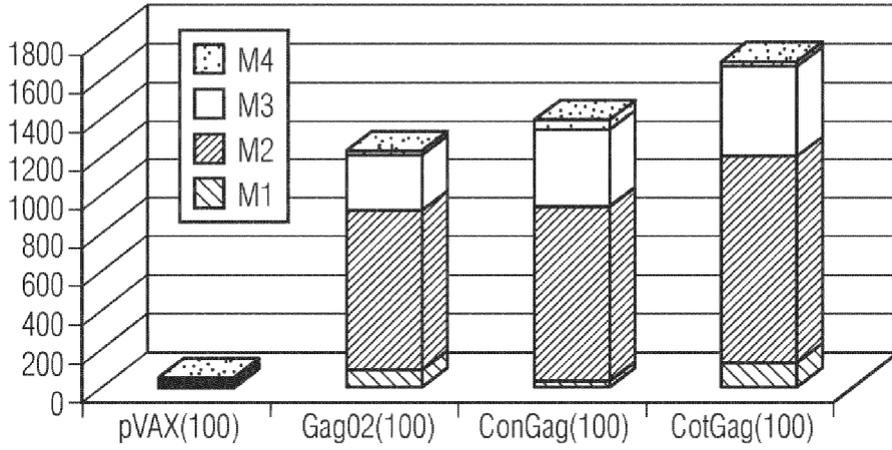


FIG. 20S

ELIS de IFN-gamma específico de gag de grupo M de VIH-1

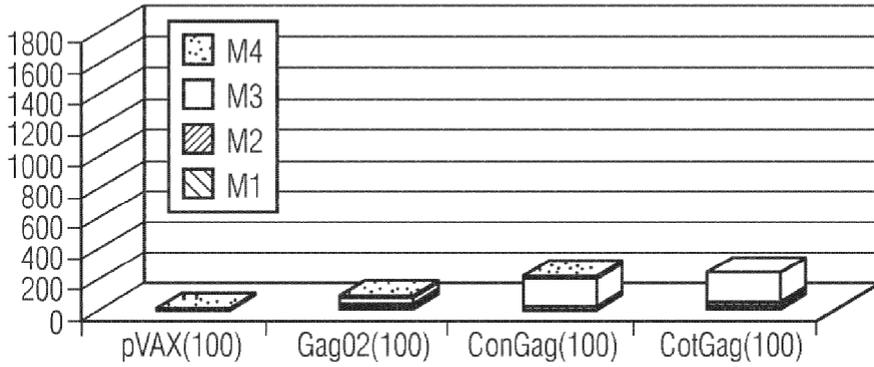


FIG. 20T

ELIS de IFN-gamma específico de gag de grupo M de VIH-1

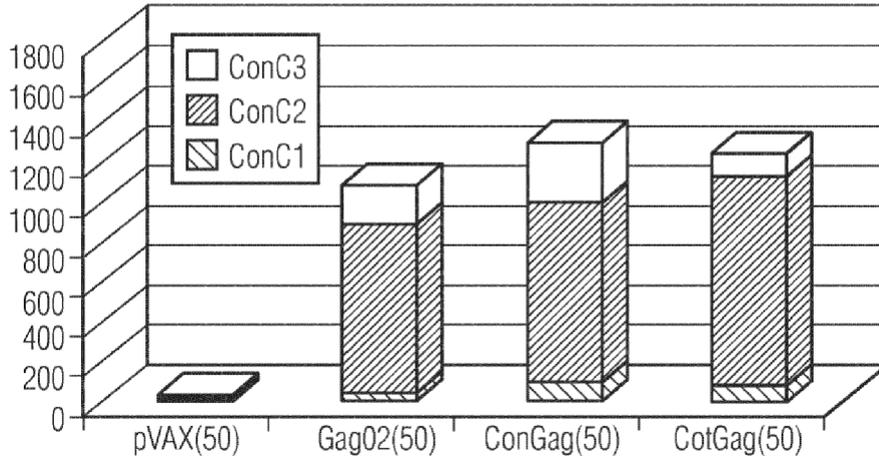


FIG. 20U

ELIS de IFN-gamma específico de gag consenso de clado C de VIH-1

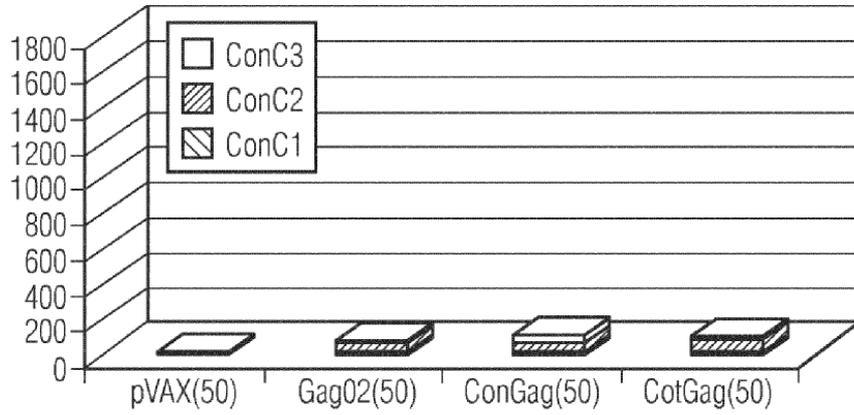


FIG. 20V

ELIS de IFN-gamma específico de gag consenso de clado C de VIH-1

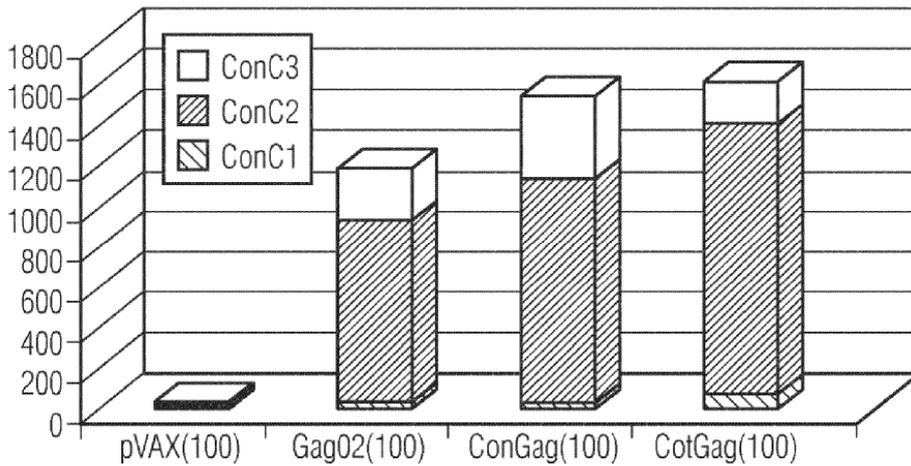


FIG. 20W

ELIS de IFN-gamma específico de gag consenso de clado C de VIH-1

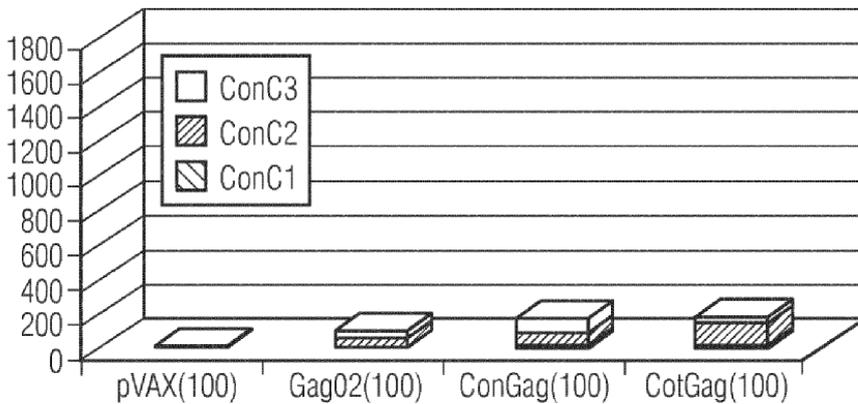


FIG. 20X

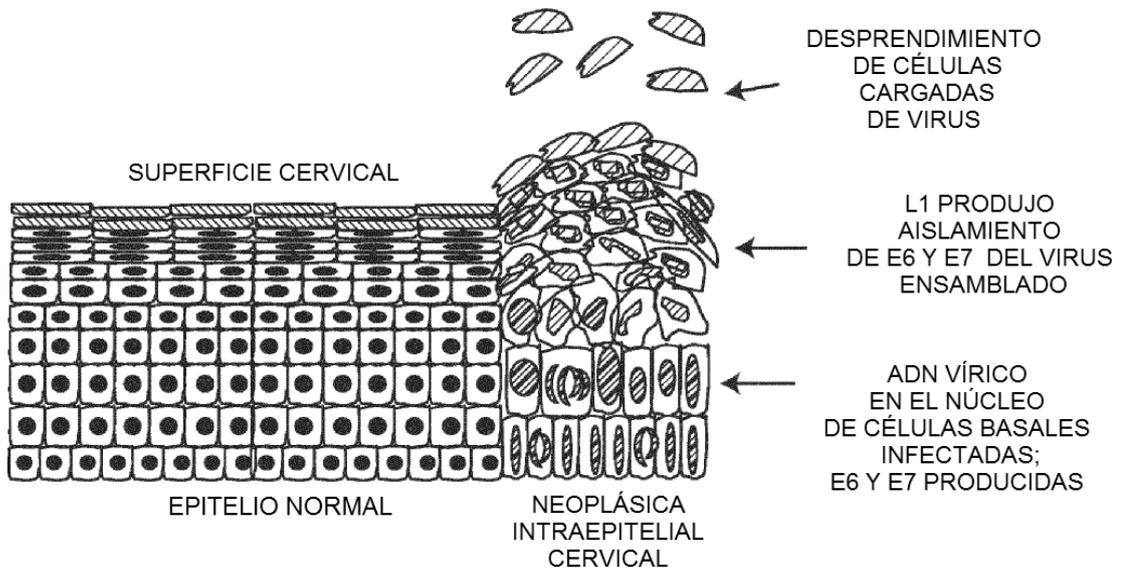


FIG. 21

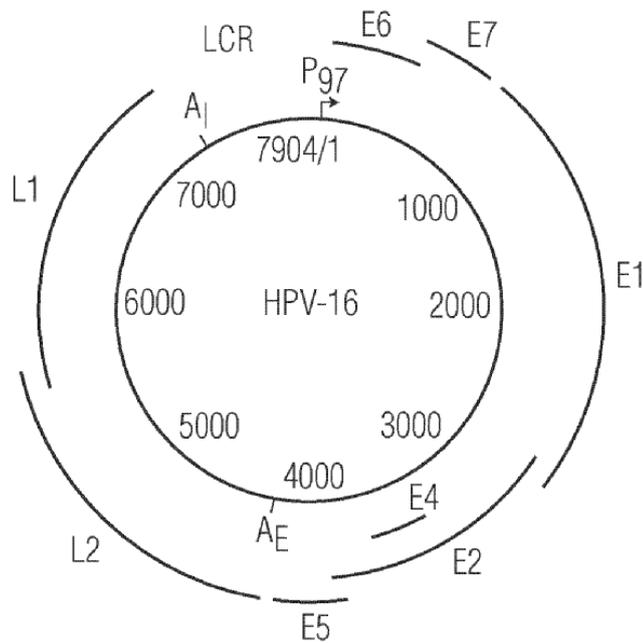


FIG. 22

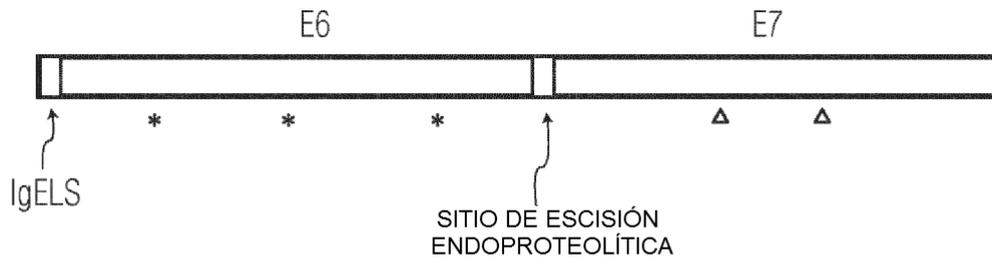


FIG. 23

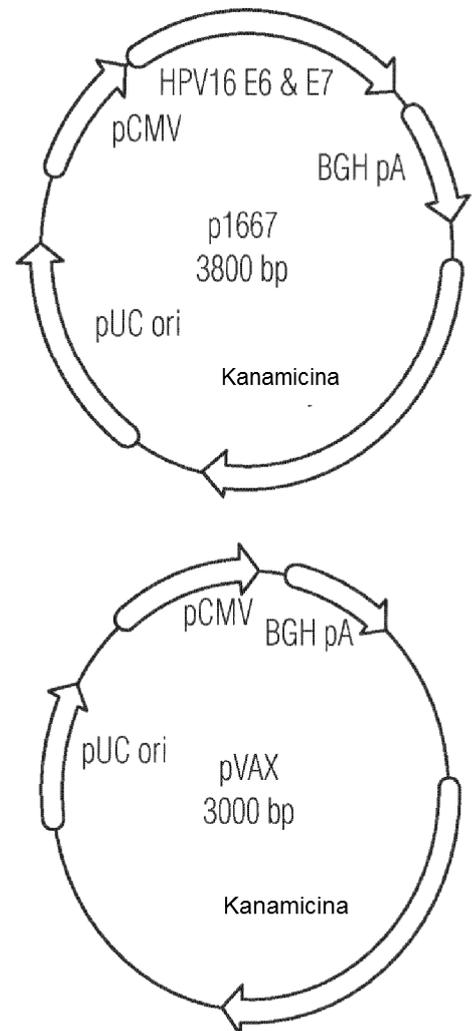


FIG. 24

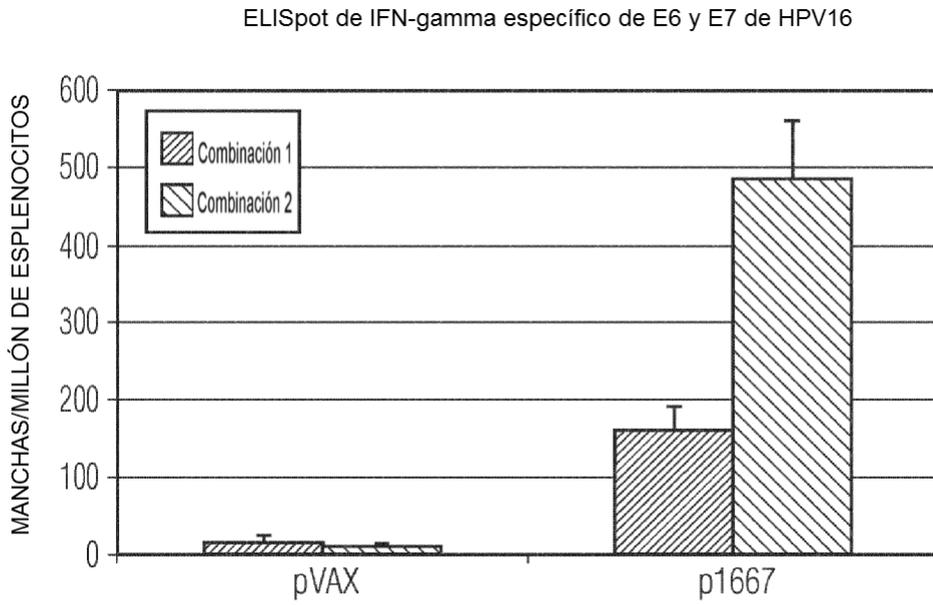


FIG. 25A

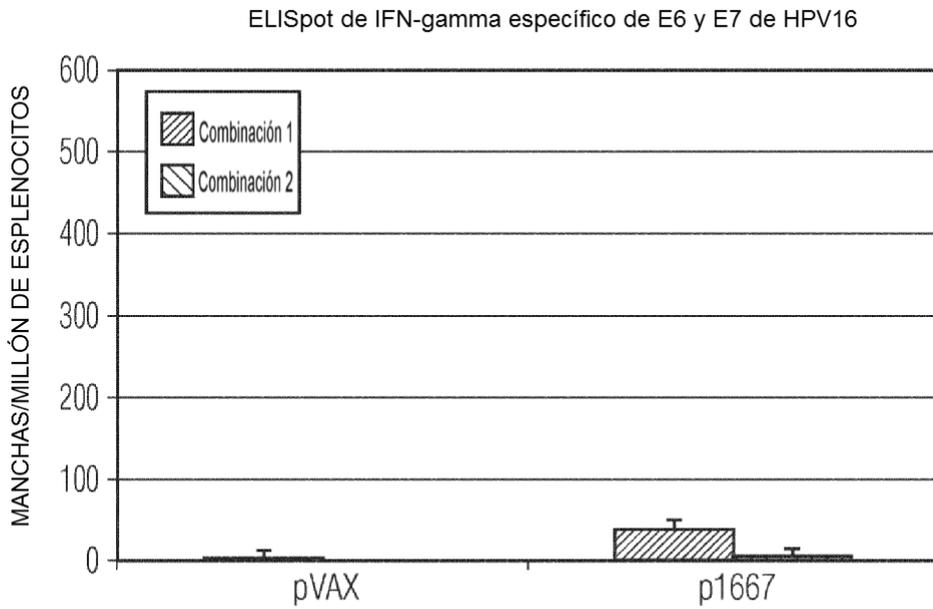


FIG. 25B

ELISpot de IFN-gamma específico de E6 y E7 de HPV16

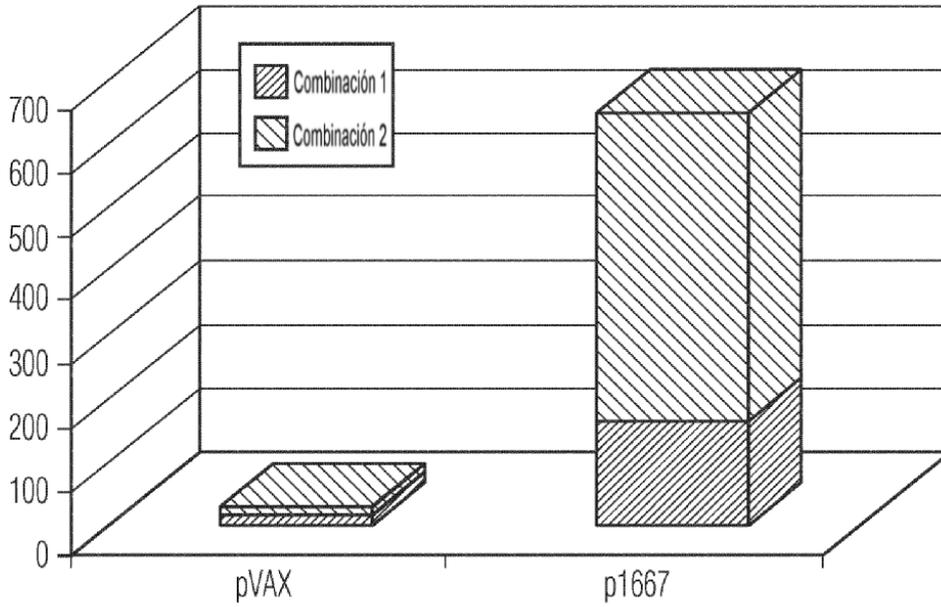


FIG. 25C

ELISpot de IFN-gamma específico de E6 y E7 de HPV16

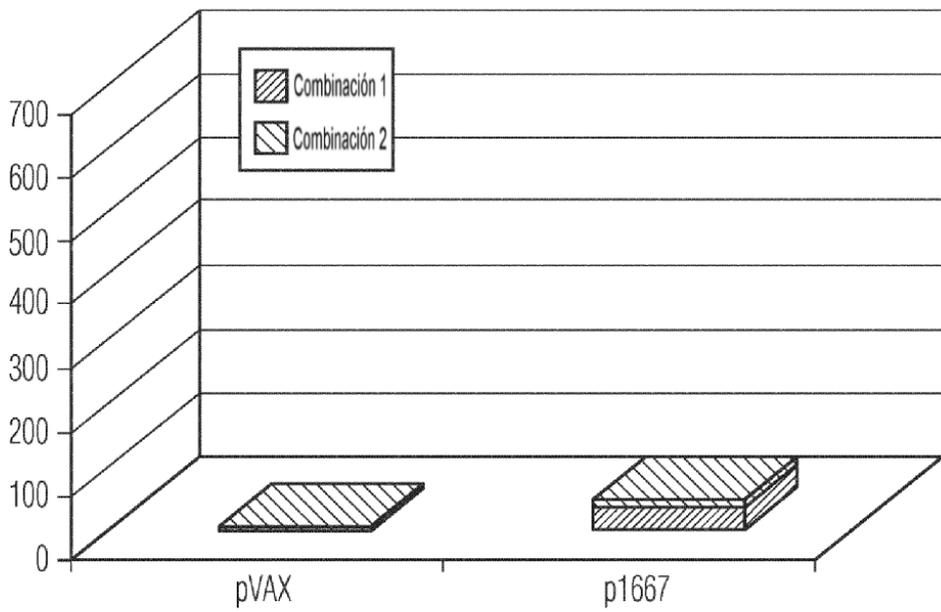


FIG. 25D

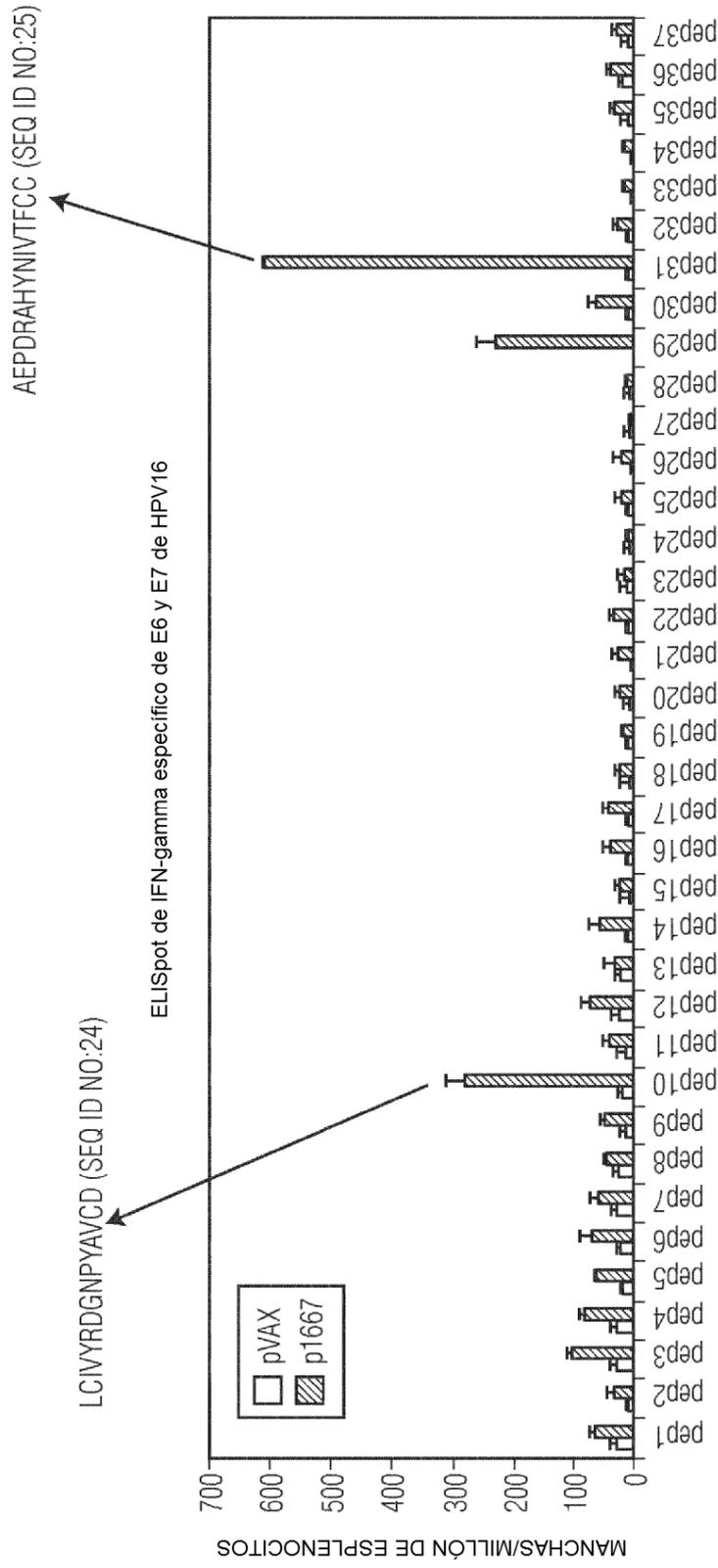


FIG. 26

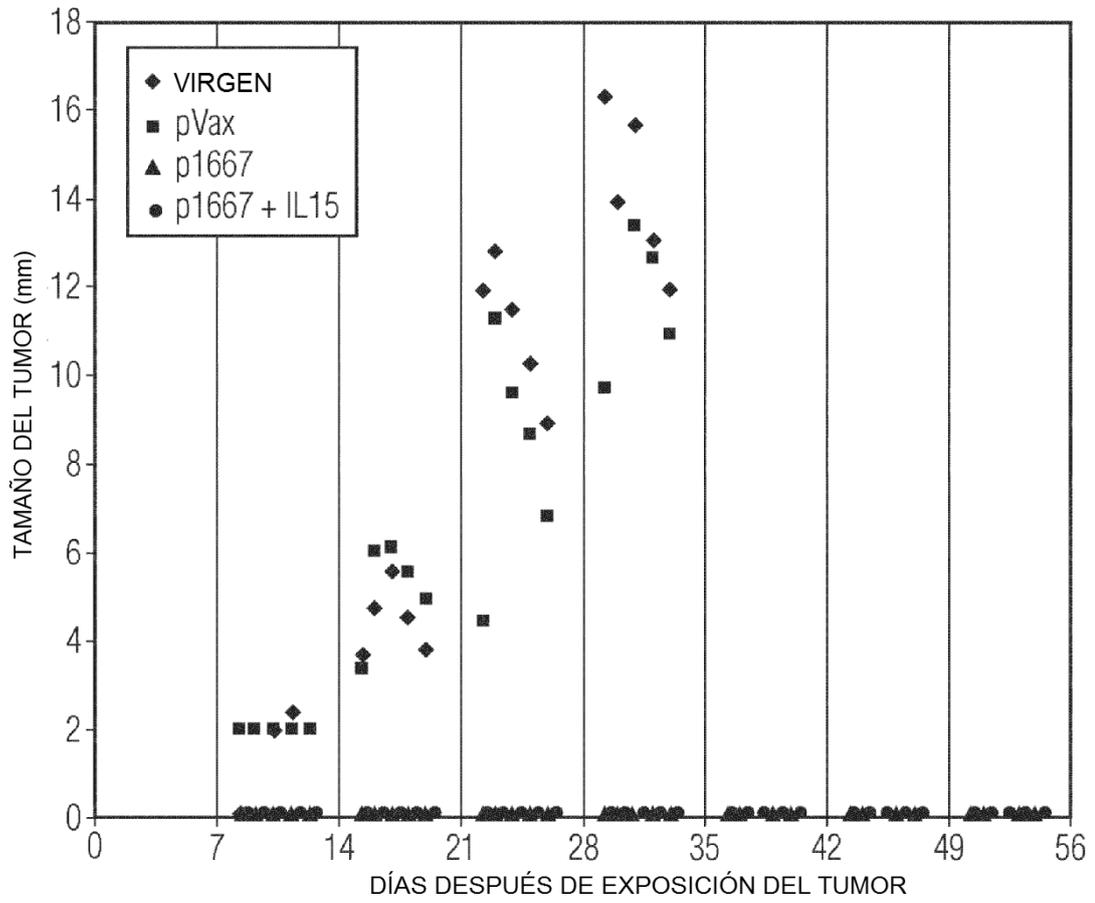


FIG. 27

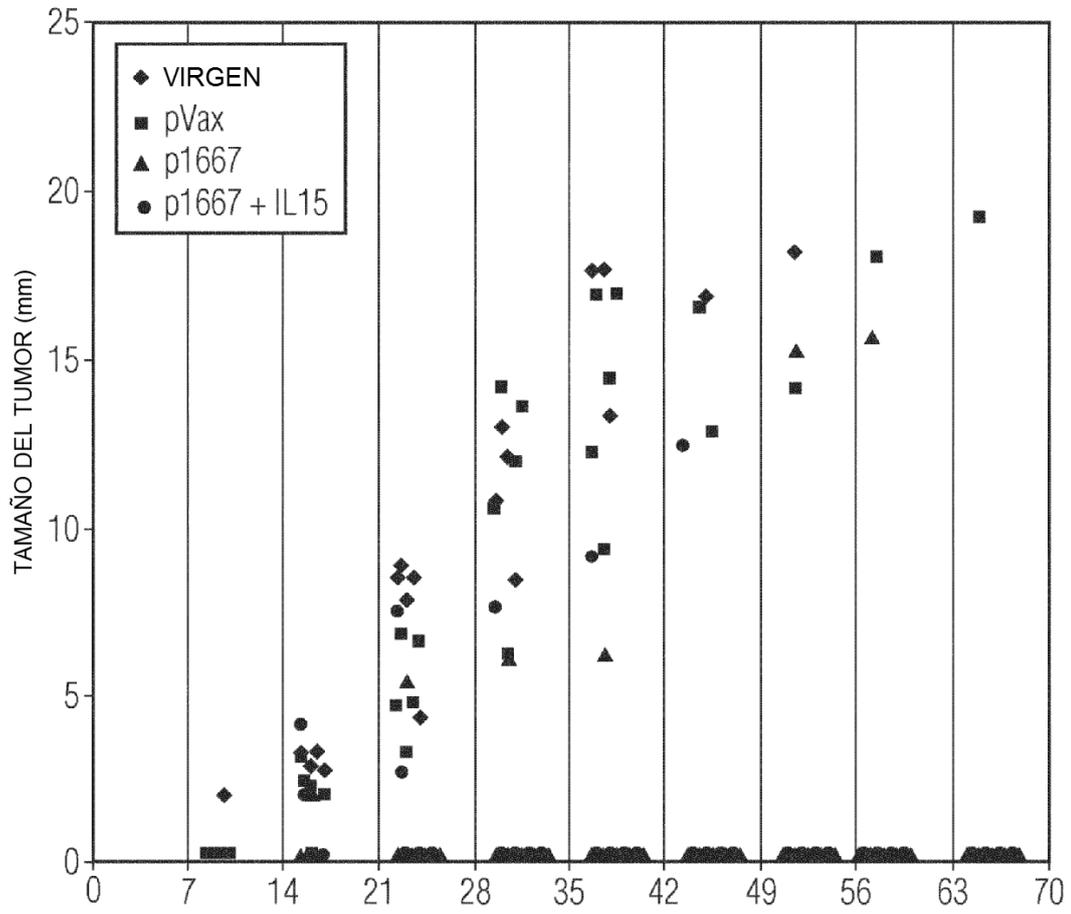


FIG. 28

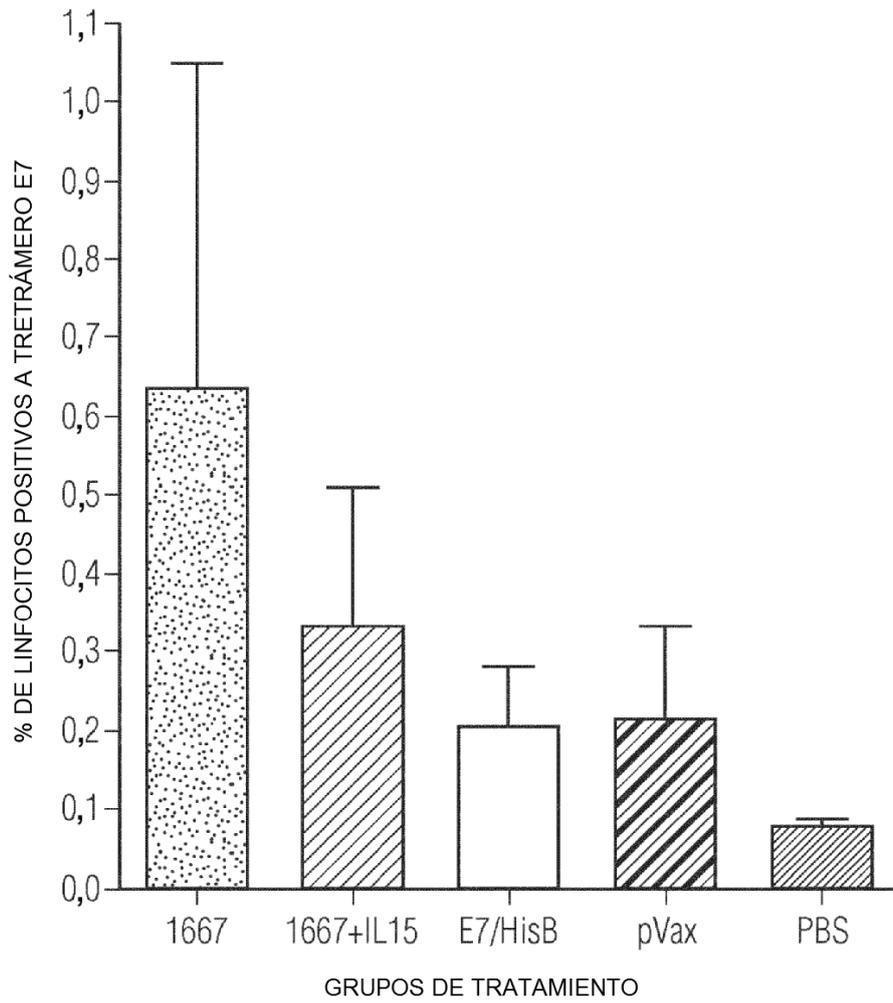


FIG. 29

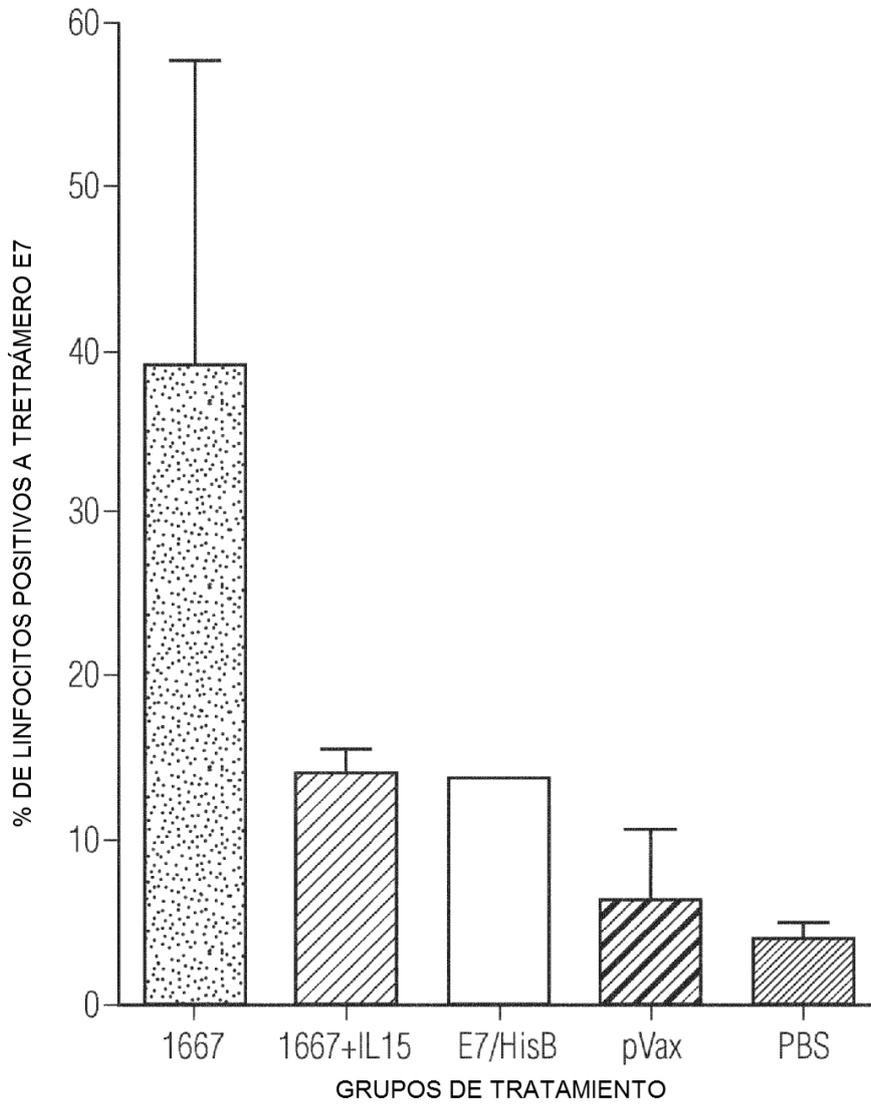


FIG. 30

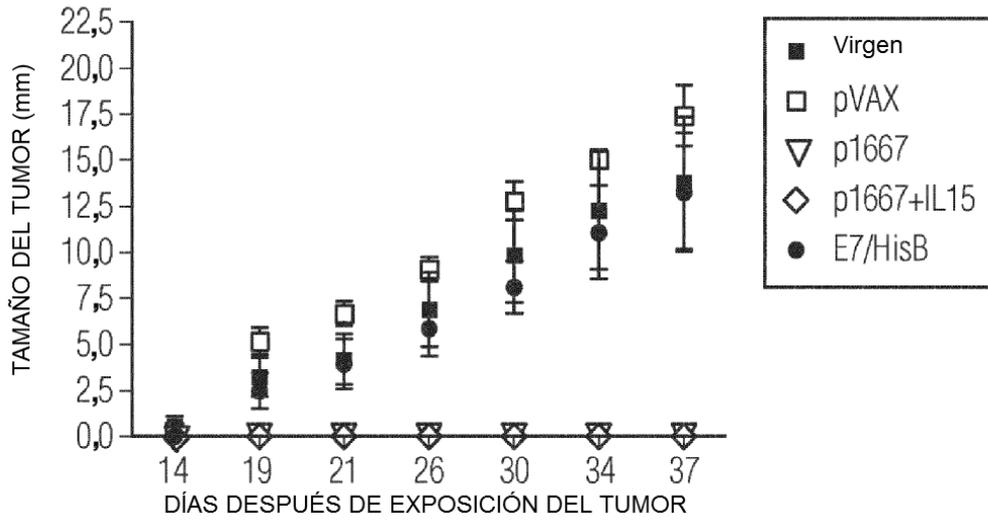


FIG. 31

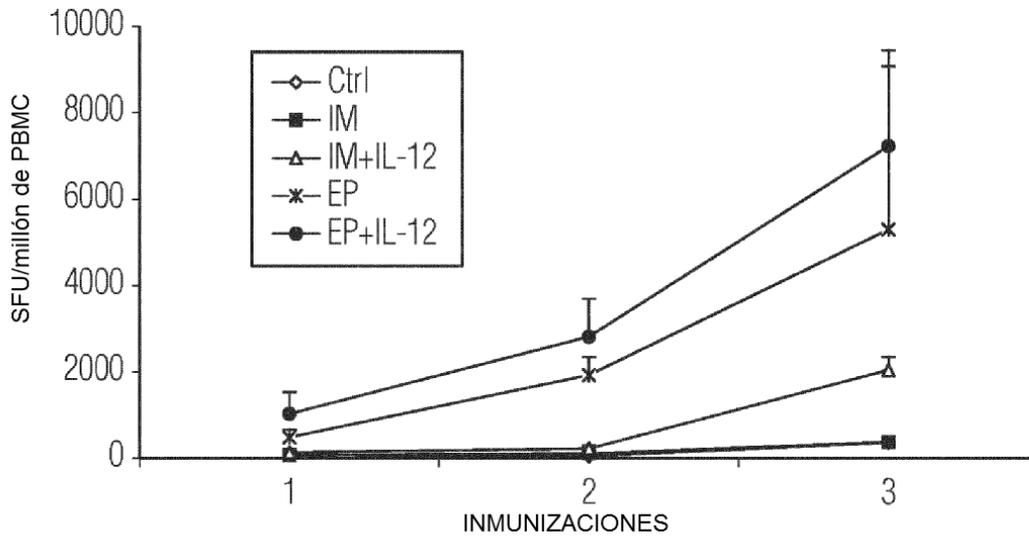


FIG. 32

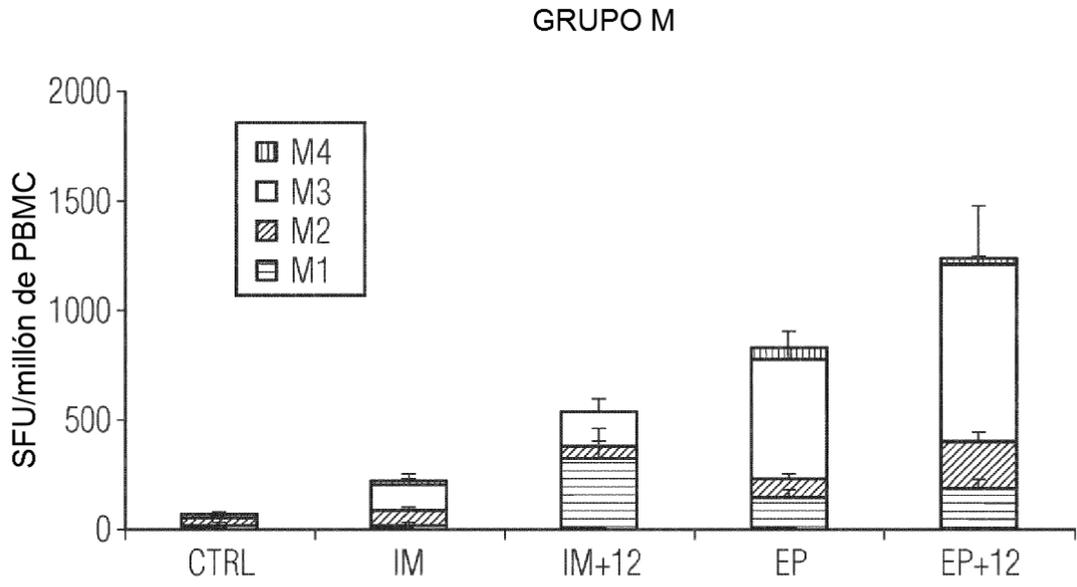


FIG. 33

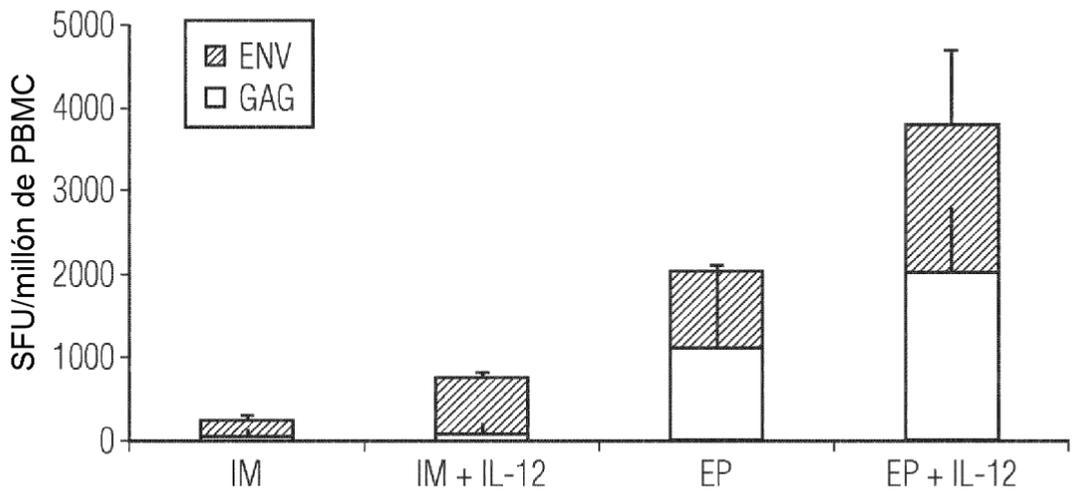


FIG. 34